

REVISTA

ASEBIR

3^{er} CONGRESO ASEBIR

**Libro de
ponencias y
comunicaciones**

*Zaragoza,
de 17 y 18 de
Noviembre de 2005*

III CONGRESO
ASEBIR Hotel Palafox
Zaragoza, 17-18 de Noviembre de 2005

ASEBIR

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción



DPTO. ATENCIÓN AL CLIENTE: 902.20.30.70
PEDIDOS: 902.20.30.90
CONSULTAS: mdalmau@izasa.es
carmenruiz@izasa.es



Medios para Reproducción Asistida

Procesamiento de esperma:

- Capacitación, congelación (Test Yolk buffer)
- Conservación a 4°C SIN CONGELAR

Medios completos (10% SSS)

PVP 7 y 10%, PBS, Tyrode's
Aceite mineral



Diagnóstico Preimplantación

Sondas FISH MultiVysion PGT y MultiVysion PB:
enumeración de cromosomas en blastómero y
corpúsculo polar.

Otras sondas:
centroméricas, loci específicas y subteloméricas

ASEBIR

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ÍNDICE

Pág. Vol. 10 • Nº 2 • Diciembre 2005

EDITORIAL:

Carta de bienvenida. A.L. González-Utor y A. Urries 4

COMITÉ DE HONOR, ORGANIZADOR Y CIENTÍFICO 5

PROGRAMA DEL CONGRESO..... 6

PONENCIAS

• Valoración del gameto masculino. E. Gómez 8

• Criterios asebir de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos. M.J. Torelló 8

• Estado actual de la criopreservación de embriones. MV. Hurtado de Mendoza 8

• Congelación de ovocitos: estudios controlados y perspectivas futuras. F. Marina y AC. Cobo 9

• *Guidelines* asebir en el laboratorio de embriología clínica. M. Bonada..... 9

• Bioética en el laboratorio de reproducción asistida. MI. Marijuan 9

• Aspectos legales en el laboratorio de reproducción asistida humana. C. Romeo..... 9

• Diagnóstico Genético Preimplantacional. Aplicaciones actuales. A. Veiga..... 9

• Mitocondria y fertilidad masculina. C. Díez..... 10

• Multifish en meiosis en biopsia testicular. F. Vidal..... 10

• Impronta genómica. C. Camprubí..... 10

• Investigación aplicada: Clonación del Bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*). J. Folch 10

• Investigación en embriones humanos. M. Sandalinas..... 10

• El laboratorio de Reproducción Asistida en Medicina Regenerativa. A. Bernad 10

• Aula virtual. *Assisted hatching* con eliminación de fragmentos. G. Calderón 10

COMUNICACIONES ORALES 12

COMUNICACIONES EN PÓSTER..... 46

AGRADECIMIENTOS..... 83

EDITA.

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

JUNTA DIRECTIVA.

Presidente: *Antonio L. González Utor*
 Secretaria: *Begoña Arán*
 Tesorero: *Manuel Ardoy*
 Vocales: *Carmen Ochoa,*
Nieves Cremades, Esther Fernández,
Mark Grossmann, M^a V. Hurtado de Mendoza,
Jorge Cuadros, Juan Manuel Moreno y
M^a José de los Santos

COORDINACIÓN

DE LA REVISTA.

Nieves Cremades
Mark Grossmann
M^a Victoria Hurtado de Mendoza

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES.

ASEBIR

Secretaría ASEBIR:

c/ Fdez. Caro, 44 - 28027 MADRID
 Tel. 91 367 89 94 - Fax 91 377 49 65

DISEÑO, MAQUETACIÓN e IMPRESIÓN.

RECCO Imagen y Desarrollo, S.L.L.

c/ Albarracín, 56 - 28037 Madrid
 Tel. 91 754 00 26 - Fax 91 754 16 05
 E-mail: juanmanuel@recco-sll.com

Depósito Legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

Soporte Válido: 78-R-CM

III Congreso ASEBIR. Zaragoza 2005

Apreciados / as compañeros / as:

Parecía lejano, pero por fin ha llegado.

En su día os prometimos que trabajaríamos duro, y podéis estar seguros de que así lo hemos hecho, pero no ha existido mayor recompensa a nuestro trabajo que el comprobar el alto nivel de asistencia y participación con que nos habéis honrado. Referencia de ello son las numerosas comunicaciones presentadas, las cuales ostentan un grado científico más que aceptable, siendo un indicativo más de la profesionalidad científica que existe dentro de nuestro colectivo.

Una mención especial merecen los ponentes y los miembros de los distintos comités y vocalías (Organizador, Científico, de Publicaciones, de Congresos, etc.) que han trabajado, y sufrido, por el éxito de este Congreso.

¡Ah! Y no nos olvidemos de las entidades colaboradoras, casas comerciales siempre amigas, que han sabido estar a nuestro lado, apoyándonos en todo lo que hemos necesitado y sin cuya participación difícilmente hubiéramos podido sacarlo adelante.

Ahora sólo esperamos que todos juntos sepamos aprovechar este trabajo conjunto y disfrutar de este evento desde todas sus vertientes, no sólo desde la faceta científica, en un entorno tan gratificante como es esta ciudad, que esperamos que desde ahora, sea también vuestra ciudad.

¡Bienvenidos a Zaragoza!

Antonio Urries

Presidente Comité Organizador

Antonio L. González-Utor

Presidente de ASEBIR

III Congreso ASEBIR. Zaragoza 2005

PRESIDENCIA DE HONOR

D^a Pilar Noeno

Consejera de Salud y Consumo del Gobierno de Aragón

D^a Pilar Muro

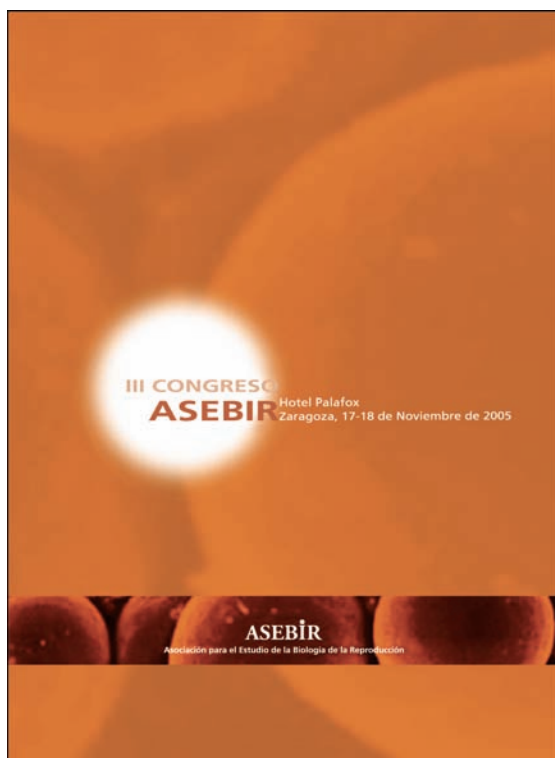
Presidenta del Grupo Hospitalario Quirón.

D. Antonio L. González-Utor

Presidente de ASEBIR

D. Antonio Urries

Presidente del Comité Organizador



COMITÉ ORGANIZADOR

PRESIDENTE

Antonio Urries

VIPRESIDENTA

Concha Leal

SECRETARÍA

Carolina Roméu

VOCALES

Julián Sánchez Rubio

José A. Duque

Francisco Monzón

Ignacio González

José I. Gutiérrez

Pedro M^a Ventura

Sofía Ainsa

Pilar Madero

Cristina C. Duque

Javier Alfonso

COMITÉ CIENTÍFICO

Begoña Arán

María Bonada

José I. Gutiérrez

Miren Mandiola

Juan Manuel Moreno García

Carmen Ochoa

María José de los Santos

Joan Sarquella

PROGRAMA CIENTÍFICO PRECONGRESO



Miércoles 16

Salón de Actos Clínica Quirón. Zaragoza. Avda. Gómez Laguna, 82 (La Floresta)

19:00-21:00	<p>REUNIÓN GRUPO DE INTERÉS: <i>DGP (35 pax aprox)</i></p> <p>OBJETIVOS: Puesta al día de los ciclos de DGP realizados en España, recogidos hasta ese momento, así como creación de un listado de los centros de FIV que ofrecen estas técnicas. Convocar a todas aquellas personas interesadas en participar directamente en las tareas del Grupo de interés, propuestas.</p> <p>PROGRAMA:</p>
19:00-19:15	PRESENTACIÓN DE LA JORNADA. Carles Giménez, Carmen Rubio y Esther Fernández.
19:15-20:00	Puesta en común de los datos de DGP que se han recogido previos a la reunión. Recogida de formularios que queden por entregar.
20:00- 20:30	Exposición por parte de CEIFER, de la propuesta al grupo de trabajo de diagnóstico genético preimplantacional de la asociación para el estudio de la biología de la reproducción de un “Ensayo piloto de un programa de control de calidad externo para FISH en espermatozoides” .
20:30-21:00	Presentación de propuestas para participar en el Grupo de interés de DGP. Conclusiones y cartera de trabajo para la siguiente reunión.

PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO

Jueves 17 ASEBIR

08:00-08:45	ENTREGA DE DOCUMENTACIÓN / PÓSTERS
08:45-09:00	<p>INAUGURACIÓN OFICIAL DEL CONGRESO</p> <p>Dª Pilar Noeno. Consejera de Salud y Consumo del Gobierno de Aragón Dª Pilar Muro. Presidenta del Grupo Hospitalario Quirón D. Antonio L. González-Utor. Presidente de ASEBIR D. Antonio Urries. Presidente del Comité Organizador</p>
09:00	<p>SESION I: GAMETOS Y EMBRIONES. CRIOPRESERVACIÓN</p> <p>Moderadores: Mª. Bonada y Mª J. de los Santos</p>
09:00-09:20	<p>VALORACIÓN DEL GAMETO MASCULINO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA.</p> <p>E. Gómez</p>
09:20-09:40	<p>CRITERIOS-ASEBIR DE VALORACIÓN MORFOLÓGICA DE OVOCITOS, EMBRIONES TEMPRANOS Y BLASTOCISTOS.</p> <p>M. José Torelló</p>
09:40-10:00	<p>ESTADO ACTUAL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES.</p> <p>Mª Victoria Hurtado de Mendoza</p>
10:00-10:30	<p>CONGELACIÓN DE OVOCITOS: ESTUDIOS CONTROLADOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.</p> <p>F. Marina / Ana C. Cobo</p>
10:30-10:45	MESA REDONDA
10:45-11:15	CAFÉ
11:15-13:30	BLOQUE I. COMUNICACIONES (1-12)
13:30-16:00	ALMUERZO

16:00-16:40	BLOQUE II. COMUNICACIONES (13-16)
16:40	SESION II: EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA Moderadores: C. Ochoa y J. Sarquella
16:40-17:00	GUIDELINES-ASEBIR DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA. M. Bonada
17:00-17:20	BIOÉTICA EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA. María I. Marijuan
17:20-17:40	ASPECTOS LEGALES EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA HUMANA. C. Romeo Casabona
17:40-18:00	MESA REDONDA
18:00-18:20	AULA VIRTUAL (VIDEO): ASSITED HATCHING CON ELIMINACIÓN DE FRAGMENTOS. G. Calderón
18:20-18:30	CAFÉ DE 10 MINUTOS

ASAMBLEA ASEBIR
Moderador: **J.A. Castilla** (*Hospital Virgen de las Nieves-Granada*)
Ponente: **G. Calderón** (*IVI Barcelona*)

PROGRAMA CIENTÍFICO CONGRESO

Viernes 18 ASEBIR

09:00	SESION III: GENÉTICA. INVESTIGACIÓN APLICADA. Moderadores: M. Mandiola y J. M. Moreno
09:00-11:15	BLOQUE III. COMUNICACIONES (17-28)
11:15-11:40	CAFÉ
11:40-12:00	DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL. APLICACIONES ACTUALES. A. Veiga
12:00-12:20	MITOCONDRIA Y FERTILIDAD MASCULINA. C. Diez
12:20-12:40	MULTIFISH EN MEIOSIS EN BIOPSIA TESTICULAR. F. Vidal
12:40-13:00	IMPRONTA GENÓMICA. C. Camprubí
13:00-13:30	MESA REDONDA
13:30-16:00	ALMUERZO
16:00-16:40	BLOQUE IV. COMUNICACIONES (29-32)
16:40	SESION IV: FUTURO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN. Moderadores: B. Arán y A. Urries
16:40-17:00	INVESTIGACIÓN APLICADA: CLONACIÓN DEL BUCARDO (<i>CAPRA PYRENAICA PYRENAICA</i>). J. Folch
17:00-17:20	INVESTIGACIÓN DE EMBRIONES HUMANOS. M. Sandalinas
17:20-18:20	CONFERENCIA MAGISTRAL: EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN MEDICINA REGENERATIVA. A. Bernad
18:20-18:45	MESA REDONDA
18:45	PREMIOS EMB / CLAUSURA DEL CONGRESO



SEDE DEL CONGRESO:

Hotel Palafox *****
Casa Jiménez s/n.
50004 Zaragoza (España)
Tel. 976 237700 y Fax. 976 234705

El texto extenso de las ponencias se entregará en el DVD adjunto a la documentación del congreso

Valoración del Gameto Masculino

E. Gómez
IVI - Murcia.

Desde la aparición de la microinyección espermática (ICSI) se ha venido poniendo en duda la importancia del espermatozoide en el resultado de los ciclos de reproducción asistida, no teniéndose en cuenta que el espermatozoide es la mitad necesaria para obtener un embrión y que de alguna manera debe influir sobre él.

La herramienta más aceptada para el estudio del potencial fértil del varón es el análisis del semen y los criterios de la Organización Mundial de la Salud, basados en la concentración, movilidad y *morfología*, son los parámetros más utilizados. Los resultados de estos análisis no siempre son capaces de discernir los espermatozoides capaces de fecundar de los que no lo son.

Es por eso que se hace necesaria la implantación de *Marcadores Moleculares de Infertilidad Espermática* que nos proporcionen más información sobre los espermatozoides. Entre estos marcadores estarían los que estudian los posibles daños del ADN espermático, fallos de compactación o fragmentación del ADN, el análisis de la producción de radicales libres por la muestra de semen o su capacidad antioxidante.

Hasta el momento estos nuevos “test de fertilidad” arrojan resultados esperanzadores, ya que son capaces de predecir capacidad de fecundación, calidad embrionaria y embarazo, aunque todavía es necesario mucho trabajo para poder estandarizar todos estos ensayos.

Criterios Asebir de Valoración Morfológica de ovocitos, Embriones Tempranos y Blastocitos

MJ. Torelló
Servei de Medicina de la reproducció, Institut Universitari Dexeus, Barcelona.

La falta consenso en la valoración morfológica de cualquier estadio desde el ovocito hasta el blastocisto es una realidad que se pone de manifiesto tanto en el ámbito nacional como el internacional. La imposibilidad de extrapolar conclusiones bibliográficas, la dificultad de comunicación científica y de realizar estudios multicéntricos que incluyan valoraciones estandarizadas de estos criterios son consecuencias inmediatas de esta situación. Motivada por esta necesidad se ha creado la comisión de ASEBIR “**Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de ovocito a blastocisto**” con el fin de desarrollar esta línea de trabajo. El objetivo principal de la comisión es definir una propuesta de criterios morfológicos de valoración de calidad y su clasificación en escalas para cada uno de los siguientes tipos celulares: ovocito, prezigoto, embrión D+2 y D+3 y blastocisto. El resultado del trabajo realizado por los profesionales que forman esta comisión es lo que se expondrá en esta conferencia.

Estado Actual de la Criopreservación de Embriones

MV. Hurtado de Mendoza
CEHISPRÁ, Clínica Al-Andalus. Sevilla.

La congelación de embriones es una herramienta indispensable en los laboratorios de FIV. Su aplicación con éxito, requiere un conocimiento de los principios físico-químicos de la congelación/descongelación, de los crioprotectores a emplear y de la velocidad de congelación (lenta, rápida, ultrarrápida o vitrificación). Además de estos factores, son requisitos necesarios para el éxito de un programa de congelación/ descongelación, una selección estricta tanto de los embriones a congelar como de los embriones tras descongelación (valoración de la supervivencia celular) y el reequilibrio de las funciones metabólicas embrionarias. Otros aspectos, como los beneficios de técnicas complementarias (eclosión asistida, aspiración de fragmentos); estudio de los niños nacidos y legislación, configuran el estado actual de los embriones congelados.

Congelación de Ovocitos: Estudios Controlados y Perspectivas Futuras

F. Marina. CEFER, Barcelona.
AC. Cobo. IVI - Valencia.

La congelación de ovocitos tiene aplicaciones múltiples y viene a resolver algunos de los problemas éticos y legales existentes: Así, sería posible reducir el número de embriones sobrantes que se generan en los procesos de FIV. Mayor importancia reviste la conservación de ovocitos o de tejido ovárico en aquellas mujeres que han de ser sometidas a determinados tratamientos médicos (radioterapia, quimioterapia, cirugía) y pueden quedar estériles. Además, en el caso de la donación de ovocitos, su congelación evitaría la necesidad de adjudicación previa a una receptora, y permitiría la existencia de bancos de ovocitos.

Guidelines - ASEBIR en el Laboratorio de Embriología Clínica

M. Boada
Instituto Marqués, Barcelona.

El laboratorio es parte fundamental en un programa de reproducción, y debe realizar su actividad en base a unas normas técnicas y éticas que garanticen la seguridad y la calidad en todos sus procesos asistenciales. ASEBIR tiene como objetivo la realización de un documento que sirva de referencia a todos los profesionales del laboratorio de nuestro país para lograr una estandarización de los procedimientos y una disminución de la variabilidad en la práctica diaria. Como primer paso se presentan unas recomendaciones sobre organización general y recursos físicos y humanos de los laboratorios de reproducción.

Bioética en el Laboratorio de Reproducción Asistida

MI. Marijuan. Facultad de Medicina y Odontología de la UPV/EHU, Vizcaya.

Introducir la bioética en el laboratorio de reproducción asistida es admitir que las posibilidades técnicas conllevan responsabilidades. Responsabilidades específicas para los que trabajan allí. La responsabilidad ("responder por" y "hacerse cargo de") obliga a los profesionales a tener en cuenta no sólo los fines sino muy especialmente las consecuencias concretas de sus acciones. Sabido esto, alcanzar criterios prudentes de gestión de las posibilidades que van generándose en los laboratorios, es una tarea que compete a todos. Pero a nadie, que lo piense un poco, se le oculta, que los conocimientos, hipótesis y razones de los profesionales son parte imprescindible para poder alcanzar dichos criterios.

Aspectos Legales en el Laboratorio de Reproducción Asistida Humana

C. Romeo Casabona. Catedrático de Derecho Penal de la UPV, Vizcaya.

Pocos avances biomédicos han generado tantas controversias ni de tanta intensidad como los relacionados con la Reproducción Humana Asistida. El Laboratorio de Reproducción Asistida, y por extensión, el personal que trabaja en él, necesariamente se encuentra involucrado en una cadena de decisiones y actuaciones sobre las que muchas veces no queda clara su responsabilidad, no sólo sobre su actuación directa, sino también sobre las consecuencias a las que han contribuido con sus actos. A modo de ejemplo cabe recordar las controversias generadas acerca de quién sería el responsable de una mala aplicación de la norma: "se fecundará un máximo de tres ovocitos".

Diagnóstico Genético Preimplantacional. Aplicaciones Actuales

A. Veiga. Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus, Barcelona.

El diagnóstico preimplantacional se inició en 1990 como alternativa al diagnóstico prenatal para parejas con elevado riesgo genético. Actualmente es una técnica ampliamente utilizada tanto para alteraciones genéticas numéricas y estructurales como para enfermedades monogénicas, cuya lista de diagnósticos disponibles aumenta día a día. Las indicaciones para llevar a cabo un DGP se han ampliado a pacientes de Fecundación *in vitro* con el fin de mejorar las tasas de embarazo en parejas de mal pronóstico. También se han incorporado otras indicaciones como detección de susceptibilidad a determinados tipos de cáncer, enfermedades degenerativas y tipaje de HLA para trasplante de células madre procedentes de sangre de cordón umbilical (SCU) en niños afectados de patologías hematológicas, genéticas o adquiridas.

Mitocondria y Fertilidad Masculina

C. Díez. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza.

La calidad espermática depende del mantenimiento energético celular, determinado, a su vez, por la actividad mitocondrial. En nuestro laboratorio hemos observado que las alteraciones genéticas del DNA mitocondrial modifican la calidad espermática.

Multifish en Meiosis en Biopsia Testicular

F. Vidal. Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona.

Los estudios meióticos en individuos infértiles se dirigen tanto a la identificación de anomalías cromosómicas limitadas a la línea germinal como a la evaluación del comportamiento de anomalías cromosómicas constitucionales. La incorporación de nuevos métodos de estudio, basados en la aplicación de protocolos de hibridación in situ fluorescente (Multiplex FISH; MultiFISH), nos ofrece la posibilidad de profundizar en el análisis de las anomalías meióticas en individuos infértiles con el objetivo de llevar a cabo una valoración citogenética exhaustiva orientada a ofrecer un mejor consejo reproductivo en estos pacientes.

Impronta Genómica

C. Camprubí. Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona.

La impronta genómica es el proceso epigenético presente en mamíferos euterios que regula la expresión de determinados genes en función de su origen parental. Sirva como ejemplo que alteraciones en la impronta de algunos genes en los cromosomas 11 y 15, puede ser una de las bases del desarrollo del Síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) y del Síndrome de Angelman (SA), respectivamente. Recientemente, se ha abierto un debate sobre la posible relación entre cambios epigenéticos y Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), dado que se ha descrito un incremento en la prevalencia de casos SBW y SA causados por errores en la impronta, en individuos concebidos mediante TRA. Cabe elucidar si estos errores epigenéticos pueden ser inducidos por la aplicación de TRA o bien, si su presencia en los gametos de algunos pacientes puede relacionarse con los problemas de esterilidad que presentan.

Investigación Aplicada: Clonación del Bucardo (*Capra Pyrenaica pyrenaica*)

J. Folch. CITA (Gobierno de Aragón), Zaragoza.

M^a Jesús Cocero Oviedo. INIA (Ministerio de Educación y Ciencia), Madrid.

Se presentan la metodología, resultados y dificultades encontradas en los intentos de producir algún ejemplar de una cabra montés ya extinguida (Bucardo) por clonación, utilizando electrofusión de fibroblastos de dicha subespecie con ovocitos de cabra.

Investigación en Embriones Humanos

M. Sandalinas. Reprogenetics, Barcelona.

Investigar con embriones humanos no es lo mismo que investigar a los embriones humanos. A partir de embriones humanos "sobrantes" congelados se pueden obtener células madre que permiten establecer líneas celulares para llevar a cabo estudios de medicina regenerativa. Pero éste no es necesariamente el único destino científico que pueden tener esos embriones congelados. Cada embrión es portador de información sobre su origen, capacidad de desarrollo y viabilidad. En tanto no seamos capaces de reconocer al embrión óptimo, transferirlo y lograr un niño en casa en cada intento, deberíamos también investigar a esos embriones con la finalidad de mejorar las posibilidades de éxito de las parejas que se someten a un ciclo de FIV.

El Laboratorio de Reproducción Asistida en Medicina Regenerativa

A. Bernad. CSIC Departamento de Inmunología y Oncología Centro Nacional de Biotecnología Madrid.

Resumen no presentado

Aula Virtual (Presentación en Vídeo)

G. Calderón. IVI - Barcelona.

Imágenes de *Assisted hatching* con eliminación de fragmentos.



MediCult

Medios de cultivo para FIV, ICSI, congelación y descongelación de blastocistos, espermatozoides...



Distribuido por: **C.B.F. LETI, S.A.**

Gran Vía Corts Catalanes, 184
08038 BARCELONA
Tel. 93 394 53 91 Fax: 93 394 53 80
E-Mail: diagnosticos@leti.com

Sol, 5
28760 TRES CANTOS (Madrid)
Tel. 91 803 59 60
Fax: 91 804 09 19

0. 01.**RESULTADOS DE LA VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS HUMANOS PROCEDENTES DE CULTIVO PROLONGADO, DIAGNÓSTICO PREIMPLANTATORIO, (DPI), Y EMBRIONES SUBÓPTIMOS DE DÍA 3**

S. Nunes, A. Galán, S. Perez, A. Cobo, M. de los Santos, M. Escrivá.
IVI, Valencia.

OBJETIVO: La existencia de una técnica eficiente de criopreservación de blastocistos en un laboratorio de FIV es muy importante, especialmente en algunos programas como DPI y cultivo prolongado, que requieren que el embrión llegue al estadio de blastocisto. La vitrificación surgió como una técnica muy ventajosa de criopreservación debido a dos factores como: a la velocidad del procedimiento y el hecho de no necesitar de equipamiento sofisticado ni caro. Con este estudio se pretende evaluar la eficiencia de la vitrificación en la criopreservación de blastocistos procedentes de tres fuentes distintas.

MATERIALES Y MÉTODOS: En este estudio retrospectivo se incluyeron un total de 134 pacientes que debido al resultado de embarazo negativo tras la transferencia de embriones en fresco, tuvieron que recurrir a la transferencia de blastocistos vitrificados. Se estudiaron blastocistos procedentes de tres fuentes diferentes en el laboratorio de FIV: DPI, cultivo prolongado día 5/6 y blastocistos obtenidos de embriones que en día 3 de desarrollo no tenían calidad suficiente para ser congelados, y que fueron mantenidos en cultivo por dos ó tres días más. De los 289 blastocistos estudiados, 82 procedían de DPI (40 pacientes), 87 de cultivo prolongado (29 pacientes) y 120 de observación (65 pacientes). El proceso de vitrificación y desvitrificación de los blastocistos fue realizado según el protocolo descrito por Yokota y colaboradores con introducción de algunos cambios (1). La supervivencia se evaluó tras 12 horas post desvitrificación y se consideró óptima cuando no presentaban ninguna señal de degeneración y se encontraban completamente expandidos. La evaluación estadística fue realizada utilizando el teste ANOVA y el análisis con el teste del ji-cuadrado.

RESULTADOS:

	BLASTOCISTOS D5/6	BLASTOCISTOS D5-	DPIBLASTOCISTOS OBS
RESULTADOS TÉCNICOS			
<i>Nº Pacientes/Ciclos</i>	29	40	65
<i>Nº Transferencias (% canceladas)</i>	19 (34,5)	25 (37,5)	41 (36,9)
<i>Nº Blastocistos desvitrificados</i>	87	82	120
<i>Nº Blastocistos sobrevivieron</i>	57	4968	
<i>Blastocistos Transferidos (%)</i>	33 (37,9)	40 (48,8)	52 (43,3)
<i>Nº Embriones Transferidos (Media±SD)</i>	1,74±0,56	1,48±0,58	1,27±0,50
RESULTADOS CLÍNICOS			
<i>Embarazo químico (%)</i>	8 (42,1)	13 (52,0) a	11 (26,8) a
<i>Embarazo bioquímico (%)</i>	1 (5,3)	2 (8,0)	3 (7,3)
<i>Embarazo clínico (%)</i>	7 (36,8)	11 (44,0) b	8 (19,5) b
<i>Embarazo múltiple (%)</i>	2 (28,6)	4 (36,4)	0
<i>Aborto (%)</i>	0	2 (18,0)	2 (25,0)
<i>Ectópico (%)</i>	0	1 (7,7)	0
<i>Embarazos en desarrollo (%)</i>	7	8	6
<i>(%, por transferencia)</i>	36,8	32,0	14,6
<i>(%, por paciente)</i>	24,1	20,0	9,2
<i>Nº Sacos de embriones</i>	9	16	8
<i>Tasa de implantación (%)</i>	27,3	40,0 °	15,4

caP=0,072; b P=0,064; cP<

CONCLUSIONES: La vitrificación puede considerarse una técnica de criopreservación opcional a las técnicas de congelación lenta aplicable a blastocistos ya que se obtiene tasas de supervivencia comparables a las encontradas en la literatura con otros métodos. Incluso, no parece afectar a la supervivencia de los blastocistos procedentes de poblaciones embrionarias más subóptimas. La disminución de las tasas de implantación de dicho grupo puede deberse sencillamente al origen peculiar de dichos embriones.

BIBLIOGRAFÍA: (1) Galán, A., Escrivá M.J., Gámiz, P. Mercader, A. Rubio C. and Crespo J. (2003) Hum. Reprod.18 (suplement 1):140.

0. 02.

ADICIÓN DE GLUTATION PARA MEJORAR LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS DURANTE EL PROCESO DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN

^{1,2}Mohand W, ²Gómez-Torres MJ, ¹Fernández-Colom PJ, ¹Duque C, ²De Juan J, ¹Romeu A.

¹Laboratorios de Reproducción Humana. Servicio de Ginecología (Reproducción Humana). Hospital Universitario La Fe, Valencia.

²Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante.

INTRODUCCIÓN:

Estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Reproducción Asistida del Hospital la Fe de Valencia, demuestran los efectos que la congelación y descongelación de espermatozoides humanos tienen sobre la motilidad y viabilidad espermáticas, y que son debidos a la generación en exceso de especies reactivas de oxígeno. La enzima glutatión peroxidasa emplea el glutatión reducido como cofactor para reducir el peróxido de hidrógeno, de forma que el efecto de las especies reactivas se ve disminuido.

OBJETIVO:

Evaluar los efectos de la congelación/descongelación de espermatozoides humanos, y establecer si el glutatión es un antioxidante efectivo para proteger las anomalías morfológicas que tienen lugar en los espermatozoides humanos durante el proceso de criopreservación.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para este estudio fueron utilizadas 30 muestras seminales entre voluntarios y pacientes incluidos en Programa de Reproducción Asistida del Servicio de Ginecología (Reproducción Humana) del Hospital Universitario La Fe de Valencia. Cada muestra seminal fue separada en dos partes. Una parte se dividió en 4 alícuotas que fueron preincubadas durante 15 minutos a 37°C con glutatión a concentraciones crecientes (0, 0,1, 0,5, 1 mM). La otra parte se dividió en 4 alícuotas que fueron congeladas/descongeladas con las mismas concentraciones de glutatión. La congelación se realizó mezclando a partes iguales el semen con el crioprotector (Test Yolk Buffer, Irvine Scientific). La mezcla se mantuvo 40 minutos a 4°C, 30 minutos en vapores de nitrógeno líquido y finalmente, fue almacenada en nitrógeno líquido a -196°C por períodos de tiempo variables. Para cada una de las alícuotas establecidas (en fresco y congeladas) se evaluaron los siguientes parámetros: *Recuento y motilidad. *Viabilidad (Tinción Vital con Eosina). *Estudio morfológico (Tinción de Papanicolau y Microscopía Electrónica de Barrido).

RESULTADOS:

Los procesos de congelación/descongelación de espermatozoides humanos producen un descenso significativo en la tasa de formas normales ($P < 0,000$) en comparación con la muestra en fresco. Cuando se utilizó la concentración de glutatión de 0,1mM el número de anomalías morfológicas inducidas por el proceso de congelación/descongelación fue el menor. La presencia de glutatión (0,1 y 0,5mM) no parece afectar sobre las anomalías de la cabeza espermática (contorno irregular, alteraciones acrosómicas, morfología piriforme). Por otro lado, se observó un menor daño en la pieza intermedia y en las colas espermáticas cuando las muestras fueron preincubadas con glutatión 0,1mM previo a la congelación.

CONCLUSIÓN:

Los procesos de congelación/descongelación producen alteraciones de la morfología espermática. El glutatión a concentración 0,1mM es un antioxidante efectivo para evitar los daños morfológicos ocasionados por el proceso de congelación/descongelación de espermatozoides humanos.

0. 03.

CAMBIOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE LECTINAS SOBRE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO TRAS LA CAPACITACIÓN

¹Gómez-Torres MJ., ¹Murcia-Belmonte V., ¹Girela JL., ²Jiménez-Movilla M., ²Avilés M., ³Fernández Colom PJ., ³Romeu A., ²Ballesta J., ¹De Juan J.

¹Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante. Alicante.

²Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. Murcia.

³Servicio de Ginecología (Reproducción Humana), Hospital Universitario La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN: Los espermatozoides de mamíferos recientemente eyaculados son incapaces de experimentar la reacción acrosómica si no han residido por algún tiempo en el tracto reproductor femenino (Yanagimachi, 1994). El conjunto de cambios fisiológicos por los cuales el espermatozoide llega a ser competente para fecundar al gameto femenino es denominado capacitación. Durante la capacitación del espermatozoide en el tracto genital femenino son eliminadas algunas de las glicoproteínas periféricas y se produce una redistribución de las glicoproteínas integrales y de los glicolípidos de la membrana plasmática. Se han descrito cambios en la localización de los carbohidratos de la superficie del espermatozoide de mamífero, reflejando una redistribución de las glicoproteínas, durante la capacitación y la reacción acrosómica (Baker et al., 2004; Jiménez et al., 2002).

OBJETIVO: Identificar y describir los diferentes patrones de distribución de determinadas lectinas sobre la membrana plasmática del espermatozoide no capacitado en muestras de varones normozoospermicos y comprobar si existen cambios en estos patrones tras la capacitación espermática *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS: El estudio se llevó a cabo en 14 muestras seminales procedentes de varones normozoospermicos según la OMS. La capacitación espermática se lleva a cabo mediante *swim-up*. Los espermatozoides fueron fijados con paraformaldehído antes y después de la capacitación. Estas muestras se incubaron con 6 lectinas (AAA, Con A, PNA, WGA) cada una de ellas específica para un carbohidrato determinado. Mediante microscopía de fluorescencia se determinaron los patrones de marcaje para cada una de ellas sobre la membrana plasmática de la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide. Los datos se analizaron con la t-Student utilizando el programa estadístico SPSS v12.0

RESULTADOS: Al comparar las muestras en fresco y capacitado observamos las siguientes diferencias en los patrones de marcaje: Con AAA se caracterizaron tres patrones (P), encontrando diferencias significativas en dos; P2 (punteado intenso sobre la región cefálica) superior en las muestras en fresco y P3 (punteado en la región anterior de la cabeza destacando una banda ecuatorial) mayor en el capacitado. Con la Con A se identificaron cuatro patrones observando diferencias significativas en: P2 (marcaje en la región acrosomal y posterior de la cabeza) predominante entre los espermatozoides capacitados y P3 (marcaje en la región acrosomal) superior en las muestras en fresco. Con PNA se describieron dos patrones: P1 (punteado sobre la región anterior de la cabeza) mayor en las muestras en fresco y el P2 (marcaje sobre la región acrosomal y banda ecuatorial más acusada) superior en los capacitados. Con WGA se observaron tres patrones: P1 (punteado homogéneo en toda la membrana del espermatozoide), mayor en las muestras sin capacitar; P2 (marcaje sobre la región acrosomal) y el P3 (punteado homogéneo a excepción de la pieza intermedia) ambos superiores en el capacitado. En todos los casos las diferencias fueron significativas para un $P < 0,05$.

DISCUSIÓN: Los cambios observados en la distribución de los azúcares sobre la membrana plasmática del espermatozoide al comparar muestras en fresco y capacitadas, indican que existe una redistribución de los residuos glucídicos de las proteínas presentes en la superficie del gameto masculino. Esta marcada reorganización de las proteínas de la cabeza del espermatozoide durante la capacitación podría ser un requisito indispensable para reconocer e interactuar con el ovocito y completar exitosamente la fecundación (Baker et al., 2004).

CONCLUSIONES: Este estudio revela una redistribución de los residuos glucídicos sobre la membrana plasmática del espermatozoide tras la capacitación *in vitro*.

REFERENCIAS: Yanagimachi (1994). The Physiology of Reproduction. 189-317. Baker et al. (2004). J. Androl. 25:744-751. Jiménez et al. (2002). Theriogenology. 59(5-6):1171-1180.

Estudio financiado por la Fundación Salud 2000. Ayudas Serono 2004-2007.

0. 04.

¿ES LA SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA A LAS 24 HORAS UN INDICADOR DE ÉXITO EN FECUNDACIÓN OVOCITARIA?

Manuel Ardoy Vilches, Juan Manuel Montejo Gadea, Mercedes Marcos Gadea.
H.U. La Paz.Madrid.

INTRODUCCIÓN: Aproximadamente, el 12% de ciclos de FIV convencional terminan en un fracaso total de fecundación. Esto es excesivo, debiéndose discriminar mejor los criterios de derivación a FIV o a ICSI. El criterio más utilizado es el REM, junto con la morfología en algunos centros. La evidencia diaria nos indica que aún así la tasa de fallos de fecundación sigue siendo elevada, y superior que en los ciclos de ICSI Algunos autores relacionaron, en sus estudios, una escasa supervivencia espermática a las 24 horas con un fracaso o al menos una disminución en la tasa de fecundación.

OBJETIVO: Valorar la capacidad pronóstica de la supervivencia espermática a las 24 horas en la fecundación ovocitaria en casos de FIV con muestras seminales con REM y morfología espermática adecuados.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio observacional de 67 ciclos de FIV en el H.U. La Paz, sep03-jun05. Se incluyen todos los ovocitos, siempre que el mismo observador pudiera valorar movilidad a las 0 y a las 24 horas. Criterios de inclusión en FIV: REM > 5 millones, morfología > 9%. Tras *swim-up*, de la misma muestra utilizada para inseminación se obtienen 1-5 millones de espermatozoides, son añadidos a 0,5 ml de Fert®. Se mantiene la muestra a 37°C y 6%CO₂. Valoración de supervivencia en esta dilución a las 0 y 24 horas. Cálculo: % de movilidad progresiva a las 24 horas / % de movilidad progresiva a las 0 horas, porcentuado. Valoración estadística, t de student y correlación para comparación de supervivencia grupo fecundación >0% vs fecundación 0%. Eficacia diagnóstica: S y E, curvas ROC.

RESULTADOS: % fecundación: 60%. Porcentaje de ciclos fecundación 0%: 20,8%. Comparación de supervivencia espermática y REM en grupos de fecundación >0% vs. fecundación 0%

	fecundación >0%	fecundación 0%
Media supervivencia (%)	82,3 *	37 *
Media del REM (mill)	23,7**	16,0**

*t de student. $P<0,001$.**t de student. $P=0,03$

Correlación REM vs. % fecundación: 0,31, $P=0,01$. Supervivencia vs. % fecundación 0,59, $P<0,001$. Diferencia NS. Punto de corte mediante curva ROC de REM: 14 millones, S: 57 y E: 73, área bajo la curva de 0,678. Para supervivencia 50%, S: 71 y E: 92, área bajo la curva 0,784. Diferencia NS

DISCUSIÓN: De haber utilizado supervivencia y morfología criterios de FIV, el porcentaje de ciclos con fecundación 0% hubiera sido de 5,9%. Sin embargo, si se hubiera incluido REM, morfología y supervivencia (punto de corte 50%, se habría reducido a 2,9% (comparable fallo de fecundación tras ICSI). En este caso valor teórico de S: 85 y E: 67. La S aumenta, algo que interesa dado el problema devenido por un fallo absoluto de fecundación y el escaso riesgo de la opción terapéutica de la ICSI. Nuestros datos son comparables a los publicados por algunos autores (Coccio, 1997; Franco, 1993), Como variación, en nuestro caso, para valorar la eficacia de supervivencia de manera más independiente, no sólo se elimina el factor de REM, además sólo se incluyen casos con morfología >9.

CONCLUSIÓN: Con las limitaciones debidas al diseño del trabajo, la supervivencia espermática a las 24 horas en nuestro centro se confirma como indicador pronóstico, aunque no exclusivo, de fecundación ovocitaria, punto de corte 50%. Este valor se ha añadido a los ya citados como criterios de inclusión en FIV.

BIBLIOGRAFÍA: Coccia ME, Becattini C, Criscuoli L, et al. A sperm survival test and in-vitro fertilization outcome in the presence of male factor infertility. Hum Reprod 1997; 12(9):1969-1973. Franco JL, Mauri AL, Peterson CG, et al. Efficacy of the sperm survival test for the prediction of oocyte fertilization in culture. Hum Reprod 1993;8:916-918.

0. 05. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO DE OVOCITOS Y EMBRIONES HUMANOS

Mondéjar I, Jiménez-Movilla M, Castells MT, Fernández-Colom PJ, Romeu A, Avilés M, Ballesta J.
Departamento de Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia. Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario La Fe, Valencia.

INTRODUCCIÓN: El retículo endoplasmático rugoso (RER) es un componente del sistema de endomembranas celular que participa en diferentes e importantes funciones celulares como son la síntesis de proteínas y la homeostasis del calcio (1). En la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano se ha visto que el calcio juega un papel esencial, siendo muy importante en la activación del ovocito, reacción cortical y división celular (2). El RER generalmente se dispone formando unas cisternas paralelas conectadas entre sí y con la envoltura nuclear sin embargo es muy escasa la información que se tiene de esta estructura en los ovocitos y embriones humanos.

OBJETIVOS: En este estudio abordamos mediante el uso de técnicas citoquímicas ultraestructurales la organización y distribución de este orgánulo citoplasmático en ovocitos y embriones humanos.

METODOLOGÍA: Ovocitos humanos en vesícula germinal (VG), metafase II (MII) y embriones procedentes de fecundación anómala, fueron obtenidos de pacientes adscritos al programa de Reproducción Asistida del Hospital La Fe de Valencia. Estas muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 0,5% y procesadas para su inclusión en la resina "LR White". Las secciones ultrafinas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) que es un enzima específico del RER (3). Para la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo se empleó como marcador el oro coloidal. Posteriormente las rejillas fueron contrastadas para su observación en el microscopio electrónico de transmisión. Se realizó un estudio morfométrico de las estructuras reconocidas por el anticuerpo anti-PDI mediante un equipo de análisis de imagen empleando el software MIP4.5. Resultado: En el citoplasma de los ovocitos en VG, MII y embriones se observa la presencia de unas estructuras vesiculares con un contenido denso a los electrones. El análisis morfométrico nos indica que estas vesículas tienen un diámetro medio de 140 nm, 115 nm y 170 nm en ovocitos en VG, MII y embriones respectivamente. El análisis estadístico nos indica que no existen diferencias significativas entre las tres muestras empleadas.

DISCUSIÓN: Estudios ultraestructurales previos han indicado que el RER se encuentra ausente en los ovocitos humanos de folículos ováricos antrales desarrollados (4) sin embargo en este estudio demostramos la existencia de esta organela celular mediante técnicas citoquímicas ultraestructurales. Además, cabe destacar que este RER está formado por vesículas electrodenensas adoptando una morfología atípica. Cambios en la organización del RER durante la maduración ovocitaria han sido previamente descritos en diferentes especies (5,6). Estos cambios podrían ser de gran importancia en el proceso de regulación de los niveles de calcio en los momentos previos a la fecundación (7).

CONCLUSIONES: El RER de ovocitos humanos en VG y MII procedentes de folículos ováricos antrales y embriones se encuentra formado por estructuras vesiculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 1- Levine and Rabouille (2005). *Curr. Op. Cell Biol.* 17: 362-368. 2- Runf et al.. (2002). *Dev.Biol.*245: 237-254. 3- Bult, A and Zhao F. (1996). *J Neurosci.* 16: 7821-7831. 4- Sathanathan, A.H.(1994). *Microsc Res Tech.* 27: 145-164. 5- Terasaki,M. (2000). *Mol. Biol. Cell.*, 11: 897-914. 6- Jiménez-Movilla M. et al (2005).*Histol Histopathol. Supplement* 1:114. 7- Kline, D. (2000). *Curr. Top. Dev. Biol*, 50: 125-154.

Estudio financiado por la DGICYT BFU2004-05568 y por la Fundación Salud 2000.

0. 06.**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO EN EL CULTIVO EMBRIONARIO**

González-Utor, AL, Hurtado de Mendoza MV, Cascales, O, Díaz, R., Alonso J., Fernández, S, Gutiérrez P. CEHISPRRA. Centro Clínico Al-Andalus. Sevilla.

OBJETIVOS: Se ha descrito que la concentración parcial de O₂ en el oviducto y útero de varias especies de mamíferos es inferior a la concentración atmosférica (21%) (Fischer y Bavister, 1993). No se han descrito diferencias de resultados en programas de FIV con transferencia de embriones en D+2 cultivados en diferentes concentraciones de O₂. Aunque en estudios recientes se ha observado disminución del potencial de desarrollo de blastocistos en ratones debido a estrés oxidativo (Karagenc y cols, 2004). El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la concentración de O₂ en el cultivo de embriones con medios secuenciales y sus implicaciones en datos postimplantatorios (tasa de embarazo e implantación) dentro de un programa de FIV.

METODOLOGÍA: Se ha realizado un estudio prospectivo randomizado donde la única variable incluida ha sido la pO₂ dentro de las incubadoras. Un total de 66 pacientes de nuestro programa FIV han sido analizados. Todos ellos fueron estimulados con el mismo protocolo y no se estipuló ninguna premisa de inclusión (edad, ciclos previos,...). Se utilizaron dos incubadoras HeraCell 150 (Kendro) recién instaladas con nº de serie consecutivos. La pO₂ de las incubadoras fue: I1: 5% e I2: 21% (condiciones atmosféricas). Se utilizó medios de cultivo de la serie GIII (VitroLife). La catalogación embrionaria se llevó a cabo atendiendo a: ritmo divisionario, fragmentación, multinucleación y tamaño celular. Se analizó los controles internos del laboratorio para determinar que no existió ningún tipo de desviación que influenciara el estudio.

RESULTADOS: Previamente se realizó a las incubadoras un estudio de estabilización de pCO₂, obteniendo un tiempo de estabilización 7 veces mayor en I1 vs I2. Los resultados del estudio se resumen en la siguiente tabla:

	Incubadora 1	incubadora 2
Nº Pacientes	33	33
Edad	33,4 ± 0,7	33,4 ± 0,7
Nº Ciclo	1,27 ± 0,1	1,30 ± 0,1
Nº Total Oocitos	16,2 ± 1,1	15,3 ± 1,3
Nº Oocitos Insem/Inyect	11,8 ± 0,8	11,5 ± 1,0
Nº Oocitos Fecundados	8,4 ± 0,7	8,1 ± 0,8
Tasa División Temprana (%)	48,9 ± 0,09	40,3 ± 0,07
Morfología embriones D+2.Calidad alta	1,8 ± 0,4	2,2 ± 0,5
“ media	3,6 ± 0,5	3,1 ± 0,4
“ baja	2,9 ± 0,4	2,8 ± 0,4
Morfología embriones D+3.Calidad alta	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,4
“ media	3,2 ± 0,4	2,5 ± 0,4
“ baja	3,9 ± 0,5	4,2 ± 0,5
Nº Embriones transferidos	2,5 ± ,1	2,4 ± 0,1
Nº Embriones congelados	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,5
Nº Embarazos clínicos (Tasa %)	18 (54,5)	19 (57,6)
Tasa de implantación (%)	30,8 ± 5,8	31,8 ± 6,6

DISCUSIÓN: Existen evidencias del beneficio del cultivo en baja pO₂ para el completo desarrollo embrionario preimplantatorio en condiciones experimentales *in vitro*. Así, se ha obtenido un mayor nº de blastocistos con mejor desarrollo de la masa celular interna (Karagenc y cols, 2004). En nuestro estudio, realizando cultivo medio en medios secuenciales no hemos obtenido ninguna diferencia significativa tanto en resultados de embriogénesis ni datos postimplantatorios. Esta ausencia de diferencias también ha sido demostrada en programas realizando cultivo corto D+2 en medios elementales (Dumoulin y cols, 1999).

CONCLUSIÓN: Las condiciones de pO₂ atmosférica no afectan a los embriones en cultivo *in vitro* en los primeros 3 días de desarrollo. Por tanto, dado el elevado coste y el nulo beneficio que se obtiene hacen del cultivo en bajas concentraciones de O₂ una técnica no necesaria en los programas de FIV, al menos para desarrollo embrionario no prolongado.

BIBLIOGRAFÍA: Dumoulin JC y cols (1999). Hum Reprod 14, 465-9. Fischer B y Bavister BD (1993). J Reprod Fertil 99, 673-9. Karagenc L y cols (2004). Reprod Biomed Online 9, 409-17.

0. 07.**CONTRIBUCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO AL ESTRÉS OXIDATIVO EN OOCITOS DURANTE LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO***

Francisco Javier Martín-Romero¹, Eva María Miguel-Lasobras², Antonio Domínguez-Arroyo⁴, Mercedes Llamas Chicote⁴, Carmen Torres Caballero⁴, Ernesto González-Carrera^{3,4}, Ignacio Santiago Álvarez-Miguel^{2,4}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, ²Biología Celular y ³Ginecología, Universidad de Extremadura, 06071-Badajoz, Spain. ⁴Instituto Extremeño de Reproducción Asistida (IERA), Badajoz.

OBJETIVOS: Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por los medios de cultivo empleados para el desarrollo de la FIV y determinar los efectos del estrés oxidativo asociado sobre oocitos humanos.

METODOLOGÍA: Para el presente estudio se han empleado complejos cúmulo-oocito (COC) de pacientes de FIV menores de 35 años. La estimulación hormonal se llevó a cabo con FSHr (Gonal F. Lab. Serono, o Puregon, Organon) y con agonista de la GnRH (Leuprolide acetato, Procrin, Abbot Laboratories) según un protocolo largo. Los COC para el estudio fueron tomados sólo en los casos en los que se recuperaron más de 10 COC después de la punción. Los medios de cultivo y tampones estudiados fueron: de Medicult (1) SynVtro Flush (ref. 15760125), Universal IVF medium (ref. 10310060), Universal IVF medium sin rojo fenol (ref. 10300060), ISM-1TM (ref. 10500010), ISM-2TM (ref. 10510010) y UTMTM (ref. 10520010). F10 (ref. 22390-017) y PBS (ref. 14190086) de Invitrogen. Los COC y los medios fueron analizados con tres sondas fluorescentes sensibles a diferentes ROS para determinar los niveles de estas especies: (1) diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (2) dihidroetidio y (3) Amplex-Red (Molecular Probes) tal y como hemos descrito en publicaciones anteriores [1-4]. Además se determinaron los niveles de peroxidación lipídica en oocitos mediante el test del ácido cis-parinárico [5].

RESULTADOS: Los medios de cultivo empleados en protocolos de FIV generan especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular H₂O₂ en condiciones similares a las de su uso en laboratorio de FIV. El flujo de H₂O₂ generado puede llegar a ser del orden de 1-15 mM/hora. Por el contrario, tampones salinos sencillos, como PBS, y el fluido folicular generan ROS con una cinética mucho más lenta. Cuando los cúmulos oocitarios se incubaron durante 4 horas en medio IVF (Medicult) se pudo determinar una marcada peroxidación lipídica comparada con la determinada justo tras la extracción de los COCs. Además, este daño oxidativo pudo ser atenuado mediante el suplemento del medio con antioxidantes lipídicos como α -tocoferol o enzimas detoxificantes como catalasa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Los medios de cultivo generan ROS en una concentración que se sitúa en niveles subtóxicos. Sin embargo, esta elevada tasa de ROS genera un daño en los oocitos que puede comprometer la viabilidad tanto de los oocitos como la consecución de la FIV. Por ello, proponemos una profunda revisión de los protocolos de manejo de los oocitos, así como de los medios y tampones empleados durante los protocolos actuales de FIV con objeto de disminuir la producción de ROS en el proceso.

BIBLIOGRAFÍA: [1] Samhan-Arias, A.K., Martín-Romero, F.J. and Gutierrez-Merino, C. (2004) *Free Radic Biol Med* 37, 48-61. [2] Gomez-Fernandez, C., Martín-Romero, F.J., Benech, J.C. and Gutierrez-Merino, C. (2005) *J Neurochem* 82, P86. [3] Miguel-Lasobras, E.M., Martín-Romero, F.J., Lozano-Cordero, G., González-Carrera, E., Gutierrez-Merino, C. and Álvarez-Miguel, I.S. (2004) *Fertility and Sterility* 82, S56-S57. [4] Martín-Romero, F.J., Gutierrez-Martin, Y., Henao, F. and Gutierrez-Merino, C. (2004) *J Fluoresc* 14, 17-23. [5] Tribble, D.L., van den Berg, J.J., Motchnik, P.A., Ames, B.N., Lewis, D.M., Chait, A. and Krauss, R.M. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1183-7.

Trabajo financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-04500) y la Junta de Extremadura (03/35). Eva M. Miguel-Lasobras ha disfrutado de una beca predoctoral financiada por Serono, Inc. Laboratorios Leti S.L. ofrecieron los medios empleados en este estudio libres de cargo.

0. 08.

ESPECIES REACTIVAS GENERADAS POR LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA OVOCITARIAS Y POR LOS EMBRIONES EN SU MEDIO DE CULTIVO: INFLUENCIA SOBRE LA GESTACIÓN Y LA FRAGMENTACIÓN EMBRIONARIA

I. Ruiz*, W. Mohand, M. Vivó*, P.J. Fernández, J. Marqueta*

*Instituto Balear de Infertilidad y Hospital Universitario La Fe de Valencia.

OBJETIVOS: Analizar la influencia que ejerce el estrés oxidativo de las células de la granulosa y del preembrión **humano**, sobre un proceso clave en biología de la Reproducción: el desarrollo embrionario en cuanto a división y fragmentación celular se refiere.

MATERIAL Y MÉTODOS: Las muestras proceden de 39 parejas que acuden al Servicio de Reproducción Asistida del Hospital "La Fe" de Valencia. Con las células de la granulosa se procede a su concentración mediante centrifugación (600g, 8 minutos). Tras retirar el sobrenadante se resuspende en 450 microlitros de PBS. Para el medio de cultivo se recogen las gotas de IVF (Medicult) de la placa de cultivo embrionario hasta día 2 postmicroinyección. El volumen total recuperado se lleva hasta 400 microlitros con PBS (Dulbeccos), que actúa de tampón. Justo antes de medir la cantidad de peróxido de hidrógeno como especie reactiva en el luminómetro (Berthold LB9505C, versión 4.08), se les añade a las muestras el luminol (Sigma) y la peroxidasa exógena de rábano (HPO). El luminol sufre una oxidación intracelular mediada por el H₂O₂. La HPO amplifica la señal de dioxigenación del luminol por el H₂O₂ que liberan las células de la granulosa o preembrión al medio extracelular. Dicha reacción del luminol genera un anión que al volver a su estado fundamental emite luz que es capturada por el luminómetro en cuantos por minuto. Para la estadística se utilizó la regresión lineal, el coeficiente de correlación de Pearson y el análisis por componentes principales.

RESULTADOS: Mediante el estudio de regresión lineal, con un p valor = 0,008, se advierte de la relación entre las ROS (especies reactivas de oxígeno) generadas por las células de la granulosa y la fragmentación de los embriones. Mediante el Coeficiente de correlación de Pearson se observa que con un P valor de 0,052 existe una tendencia, que roza la significatividad estadística, sugiriendo una relación entre las ROS liberadas al medio de cultivo y la división embrionaria. Sin embargo sí se ha podido demostrar estadísticamente por el análisis de componentes principales, que estas dos variables tienen una relación inversa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: A la luz de los resultados se propone que existe una relación directa entre las ROS generadas por las células de la granulosa y el desarrollo del embrión en cuanto a su fragmentación. Esto podría implicar que el ovocito al salir del folículo tiene parcialmente "determinado" su destino, por el contacto que ha tenido con las ROS producidas por las células de la granulosa que lo rodean desde el folículo. Esta situación podría traducirse en alteraciones del material genético del gameto femenino, que tendría como consecuencia unos niveles de fragmentación elevados y una posible reducción de las tasas de implantación y gestación. De los datos recogidos de las ROS presentes en el medio de cultivo, puede concluirse que éstas bloquean la división embrionaria, aunque esta fuerte tendencia no tiene significación estadística (posiblemente confirmada con un mayor número de muestras). Se puede aproximar que si el embrión se bloquea en los primeros estadios de división, es posible que la causa sea una no activación del genoma embrionario. Pero a la vista de los resultados, cabría la posibilidad de que las ROS liberadas de forma espontánea por el preembrión al medio de cultivo, afectaran a este proceso.

BIBLIOGRAFÍA: 1.- Agarwal A. et al (2003) .Fertility and Sterility. 79(4):829-843. 2.- Arousseau A. (2002). INRA. PROD. ANIM, 15, 67-82. 3- Catt J.W. and Henman M. (2000). Human Reproduction, 15 (2):199-206. 4.- Dumoulin et al (1999). Human Reproduction, 14(2):465-469. 5.- Zorn Branco, et al J.C.M. (2003). International Journal of Andrology, Vol. 26, pp. 279-285, 2003. 6.- Guérin P et al (2001). Human Reproduction Update Vol. 7, nº2, pp175-189 7.- Dumoulin JCM et al (1995). Fertility and Sterility Vol 63 nº 1 January.



EQUIPOS MEDICO-BIOLÓGICOS

TÉCNICAS PARA LA REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA
PRODUCTOS PARA LA GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

Equipos Médico-Biológicos, S.A.

Central y Delegación Barcelona

C/ Can Rabia, 13 locales 3 y 4
08017 Barcelona
Tel.: 93 412 37 21 • Fax: 93 412 21 92
E-mail: barcelona@embiol.com
<http://www.embiol.com>

Delegación Valencia

C/ Aben al Abbar, 4, 2º - pta. 13
46021 Valencia
Tel.: 96 369 35 74 • Fax: 96 389 00 97
E-mail: valencia@embiol.com

Delegación Bilbao

Plaza Amézola, 2, entreplanta
mano derecha, puerta izquierda
48012 Bilbao
Tel.: 94 410 50 09 • Fax: 94 410 29 70

Equipos Médico-Biológicos de Baleares, S.L.

C/ Bartomeu Ferrà, 3, 2º 1ª
07002 Palma de Mallorca (Baleares)
Tel.: 971 227 313 • Fax: 971 714 181
E-mail: baleares@embiol.com

Equipos Médico-Biológicos de Andalucía, S.L.

C/ Maestro Cebrián, Local 6 (edificio Atalaya)
18003 Granada
Tel.: 958 28 05 63 • Fax: 958 20 76 47
E-mail: andalucía@embiol.com

Equipos Médico-Biológicos del Noroeste, S.L.

C/ Pígara 16, Bajos
15679 El Temple-Cambre (La Coruña)
Tel.: 981 63 89 66 • Fax: 981 63 89 89
E-mail: noroeste@embiol.com

Equipos Médico-Biológicos de Castilla, S.L.

C/ Puerto de Valencia, nº 10, Local 7
28820 Coslada (Madrid)
Tel.: 91 521 76 02 • Fax: 91 521 77 30
E-mail: madrid@embiol.com



EQUIPOS MEDICO-BIOLÓGICOS

TÉCNICAS PARA LA REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA PRODUCTOS PARA LA GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

DISTRIBUCIONES EN EXCLUSIVA



Agujas de punción folicular • Aspiradores de ovocitos • Incubadores de CO₂ y T^a • Catéteres transferencia embriones • Equipos para transporte de material biológico • Láser para hatching asistido



Rocketmedical

Agujas de punción folicular • Aspiradores de ovocitos • Catéteres transferencia embriones • Instrumental de ginecología • Material desechable de ginecología



Catéteres de inseminación intrauterina • Catéteres transferencia embriones • Cánulas de biopsia endometrial • Cepillos citológicos • Cánulas de aspiración uterina • Dispositivos intrauterinos (DIU)



Catéteres transferencia embriones • Catéteres de inseminación intrauterina • Agujas de punción folicular • Agujas amniocentesis • Pesarios



Equipos para conización. Leep-1000 • Manipulador uterino. Equipo de colpotomía • Colposcopios



Micropipetas para ICSI • Micropipetas para biopsia blastómero • Micropipetas para HATCHING asistido

Medios de cultivo celular para FIV e ICSI • Medios de criopreservación
Medios tratamiento semen



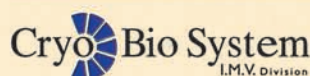
Medios para tratamiento de semen



Cabinas de flujo laminar adaptadas para laboratorios de F.I.V. Incubadores de CO₂ para transporte • Mesas antivibratorias



Material plástico para cultivo celular • Pipeteadores



Termoselladoras de pajuelas • Pajuelas de congelación de embriones / semen



Filtros coda: Sistemas de filtración de aire para laboratorios de FIV
Unidades de filtración para interior de incubador



Equipo de conización uterina • Instrumental Protegido • Manipulador laparoscópico • Asas de Conización • Instrumental general de Ginecología



Sistemas de termocontrol automático para platinas de microscopios



Pipetas de precisión con capilares para desnudación y manipulación de células y embriones



Congeladores biológicos • Recipientes almacenamiento material biológico



Equipos para micromanipulación (ICSI)



Colposcopios

0. 09. ESTRÉS OXIDATIVO: FECUNDACIÓN Y CALIDAD EMBRIONARIA

M. Vivó*, W. Mohand, I. Ruiz*, P.J. Fernández, J. Marqueta*

*Instituto Balear de Infertilidad y Hospital Universitario La Fe de Valencia.

OBJETIVO: Analizar la influencia que ejerce el estrés oxidativo de los espermatozoides humanos sobre procesos claves en biología de la Reproducción, tales como la fecundación y el desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS: Las muestras proceden de 39 parejas que acuden al Servicio de Reproducción Asistida del Hospital “La Fe” de Valencia. Los espermatozoides capacitados mediante *swim-up* (IVF, Medicult) se ajustan a una concentración de 5 mill/ml. Justo antes de medir la cantidad de peróxido de hidrógeno como especie reactiva en el luminómetro (Berthold LB9505C, versión 4.08), se les añade a las muestras el luminol (Sigma) y la peroxidasa exógena de rábano (HPO). El luminol sufre una oxidación intracelular mediada por el H₂O₂ y una peroxidasa espermática localizada dentro del acrosoma. La HPO amplifica la señal de dioxigenación del luminol por el H₂O₂ que libera el espermatozoide al medio extracelular. Dicha reacción del luminol genera un anión que al volver a su estado fundamental emite luz que es capturada por el luminómetro en cuantos por minuto. Se emplea el Coeficiente de Correlación de Pearson como índice estadístico.

RESULTADOS: El coeficiente de correlación de Pearson (0,007) para estudió la relación entre la ROS generada por los espermatozoides y la tasa de fecundación. El valor *P* fue de 0,968, lo que muestra que no existe evidencia estadística para establecer una relación. Observando la relación con la calidad embrionaria, obtenemos un valor *P* =0,048, lo que implica que existe significatividad estadística que explicaría una relación entre ambos parámetros. La calidad embrionaria se evaluó observando el nº de células y la fragmentación. Es este último parámetro el que mostró la significatividad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Se encuentra que sí existe evidencia estadística de que las ROS liberadas por los espermatozoides podrían tener un papel fundamental en la fragmentación de las blastómeras embrionarias, lo que puede implicar un bloqueo del desarrollo *in vitro* y llevar al fracaso de la técnica de reproducción asistida. De lo que no hay evidencias es que exista una relación con el número de células. Es decir, la no división de los embriones supondría un bloqueo en la activación de su genoma, factor del cual no tenemos pruebas para decir que pueda estar marcado por la calidad de los espermatozoides, en cuanto a su generación de ROS se refiere. Sin embargo, no parece estar afectado el proceso de fecundación mediante la ICSI, por la cantidad más o menos elevada de ROS liberadas por el espermatozoide. Así pues, parece que el proceso de fecundación no se ve afectado por la presencia de ROS. Ello podría deberse a la falta de accesibilidad del DNA espermático (debido a su alto grado de compactación por las protaminas), a dichas especies reactivas. Sin embargo, tras la fecundación de los gametos el DNA espermático se descondensa en el citoplasma del ovocito y se convierte en posible diana de las ROS, sufriendo roturas o mutaciones puntuales. Este efecto determinaría el grado de fragmentación del embrión hasta llegar incluso a la degeneración. Puede suponerse que la fragmentación reduce las posibilidades de implantación haciendo así más difícil el que se consiga un embarazo.

BIBLIOGRAFÍA: 1.- Agarwal A. et al (2003) .Fertility and Sterility. 79(4):829-843. 2.- Arousseau A. (2002). INRA. PROD. ANIM, 15, 67-82. 3- Catt J.W. and Henman M. (2000). Human Reproduction, 15 (2):199-206. 4.- Dumoulin et al (1999). Human Reproduction, 14(2):465-469. 5.- Fernández P.J., et J.C.M. al.. 50th Annual Meeting of The American Fertility Society. Meeting Program Supplement, P-222, p 190-191, 1994. 6.- Fernández P.J., Romeu A. Revista Iberoamericana de Fertilidad Vol. X, nº 4 Julio- Agosto 1993 7.- Guzman E.G., et al (2001) Human Reproduction Vol.16, No9pp. 1922-1930. 8.- Imai H., et al (2001). Biology of Reproduction 64, 674-683. 9.- Zorn Branco, et al (2003). International Journal of Andrology, Vol. 26, pp. 279-285, 2003.

0. 10.

PROGRAMA DE CRIOPRESERVACIÓN DE ZIGOTOS EN PACIENTES CON RIESGO DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA SEVERA: EXCELENTE TASA DE GESTACIÓN EVOLUTIVA

MC. Pons, M. Grossmann, I. Vanrell, I. Solvas, E. Coloma, A. Vergés, X. Julve, J. Nadal
Unitat de Reproducció Assistida. Centro Medico Teknon. Barcelona.

INTRODUCCIÓN: En mujeres con alta respuesta ovárica a la estimulación hormonal (por ejemplo con síndrome de ovario poliquístico) es conocida la dificultad para obtener gestaciones espontáneas y el mayor riesgo de hiperestimulación ovárica severa. Para minimizar estas complicaciones existe la opción de cancelar el ciclo de FIV y la opción de postergar la transferencia criopreservando todos los embriones obtenidos.

OBJETIVOS: Valorar la eficacia de la criopreservación electiva de todos los cigotos obtenidos en ciclos estimulados de FIV y la posterior transferencia, estrategia adoptada en nuestro centro en pacientes con riesgo potencial de hiperestimulación ovárica severa.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se seleccionaron retrospectivamente 26 pacientes estimuladas para ciclo de FIV en el período Marzo 2000-Julio 2005 y que presentaron riesgo de hiperestimulación ovárica severa (niveles de estradiol > 1500 pg/ml el día de la administración de la hCG y > 15 folículos) Edad media de las pacientes 31,8 años; nivel promedio de E2: 4644 pg/ml, promedio de folículos de 32,7 y promedio de oocitos obtenidos tras punción ecográfica de 25,7. Se procedió a la criopreservación de todos los cigotos obtenidos (protocolo lento según Lasalle et al., 1985) y a la posterior descongelación el 2º día de la administración de la progesterona en ciclo de tratamiento sustitutivo. Los cigotos que sobrevivieron a la descongelación se cultivaron in vitro durante 44-48 horas (condiciones estándares) y se realizó transferencia vaginal ecoguiada de 1 a 3 embriones previa eclosión asistida mediante solución ácida de Tyrode. Medios de FIV cultivo Vitrolife®.

RESULTADOS: Procedentes de 26 ciclos se criopreservaron un total de 332 cigotos (12,8 embriones por ciclo). Posteriormente, 21 pacientes realizaron 26 ciclos de transferencia de embriones criopreservados (1,2 ciclos por paciente). Cinco pacientes tienen aún todos sus cigotos criopreservados. De los 122 embriones descongelados (4,7 embriones por ciclo de transferencia) 59 embriones fueron seleccionados aptos para transferir (media de 2,3 por ciclo de transferencia). Se transfirió un embrión en dos de los ciclos, dos embriones en 15 ciclos y 3 embriones en nueve ciclos de transferencia. Ninguno de los 26 ciclos de transferencia fue cancelado y 7 de ellos fueron transferencias electivas. Se consiguieron 10 gestaciones clínicas (38,5% por ciclo; 47,6% por paciente), hubo un aborto de primer trimestre, con lo que la tasa de gestación evolutiva es del 34,6% por ciclo y del 42,8% por paciente. La tasa de implantación obtenida con estos embriones criopreservados es del 22% (13 embriones implantados de 59 transferidos), y la mayoría de las gestaciones (7 de 10) se obtuvieron en el primer ciclo de criotransferencia. Dos de las 26 pacientes (7,7%) desarrollaron hiperestimulación ovárica, leve en una de ellas y moderada en la otra que requirió control hospitalario y cursó con evolución favorable.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: El protocolo de criopreservación de todos los embriones obtenidos en ciclos de alta respuesta ovárica se muestra muy eficaz ya que permite: 1) disminuir el riesgo de hiperestimulación severa tras la punción ovárica porque no se transfieren embriones 2) obtener, en ciclos no estimulados, excelentes tasas de gestación, embarazos que evolucionan sin riesgo alguno de hiperestimulación 3) aprovechar el ciclo de estimulación para FIV, y en lugar de cancelarlo, incluso conseguir más de una gestación a partir del mismo intento.

BIBLIOGRAFIA: Aboulghar MA, Mansour RT. (2003) Hum Reprod Update, 9 (3): 275-89. Review. Ferraretti AP et al. (1999) Hum Reprod., 14 (6): 1457-60. Queenan JT et al. (1997) Hum Reprod., 12 (7): 1573-76.

0.11.**¿ES LA CALIDAD EMBRIONARIA UN FACTOR INDICATIVO DE ELECCIÓN DEL DIA DE TRANSFERENCIA?**

M. Aragonés, R. Herrero, I. Cabañes, J.L. de Pablo, F. Gimenez, AP. de Souza, JA. García Velasco, Y. Mínguez. IVi, Madrid

OBJETIVO: Comparar los resultados clínicos tras realizar transferencias en D3 y D6 en función del número de embriones de buena calidad seleccionados en D3.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio retrospectivo en el que se incluyeron 218 ciclos cuyas transferencias fueron realizadas en D3 durante el año 2003 y 80 ciclos cuyas transferencias fueron realizadas en D6 durante el periodo comprendido de Enero a Marzo del año 2004. Se utilizó el medio G1 (Vitrolife) para cultivarlos a D3 y los medios IVF (Medicult), IVF/CCM (Vitrolife) (1:1) y CCM para cultivarlos hasta D2, de D2 a D3 y D3 a D6 respectivamente. Se clasificaron en 2 grupos: Grupo I: 1-3 embriones de buena calidad en D3 y Grupo II: 4 ó más. Los embriones de buena calidad cumplían las siguientes características morfológicas: 3-4 células en D2 y 7-8 células en D3 con <15% fragmentación y 1-2 simetría en ambos casos.

RESULTADOS:

Grupo I	Grupo I		Grupo II	Grupo II	
	TD3	TD6		TD3	TD6
CASOS	139	28	CASOS	79	79
TRANSFERS	139	26	TRANSFERS	79	79
EDAD	34	32,8E	DAD	34	34
% TRANSF. CON CONGELACIÓN	21	15	% TRANSF. CON CONGELACIÓN	90 ^a	90 ^a
X EMBR. TRANSF.	2,7	2	EMBR. TRANSF.	2,5	2,5
T. GESTACIÓN	56	46	T. GESTACIÓN	48	48
T. IMPLANTACIÓN	26,6	27,3	T. IMPLANTACIÓN	22,8	22,8
T. DOBLES	34	30	T. DOBLES	29 ^b	29 ^b
T. TRIPLES	11,3	10	T. TRIPLES	6	6

a $P \leq 0,001$; b $P = 0,04$ X2

CONCLUSIONES: En nuestro centro, actualmente una buena selección de embriones en D3 proporciona resultados comparables al D6 con la ventaja de aumentar la rentabilidad del ciclo a la paciente al disponer de embriones sobrantes para congelar (Grupo II). La tasa de dobles es significativamente superior cuando tenemos 4 ó más embriones de buena calidad en D3 y realizamos la transferencia en D6 dada la elevada tasa de implantación de los blastocistos en este grupo, esto nos indica que podríamos reducir en el futuro el número de embriones a transferir en D6 sin perjudicar la tasa de gestación.

0. 12.

LA TRANSFERENCIA SELECTIVA DE DOS EMBRIONES (TES-2) NO REDUCE LOS PORCENTAJES DE EMBARAZO MÚLTIPLE. -NUESTRA EXPERIENCIA

A. Urries, C. Leal, C. Roméu, JA. Duque, J. Sánchez Rubio.
Reproducción Asistida Quirón Zaragoza.

OBJETIVOS: Si damos por buena la definición que aplica el Grupo de Interés Salud Embrionaria, auspiciado por la SEF, debemos asumir que “el objetivo de los tratamientos de esterilidad deberá ser el nacimiento de un niño único y sano”. Es evidente que la mejor manera de evitar la gestación múltiple en FIV es disminuir el número de embriones en la transferencia, siguiendo unos modelos predictivos, lo más individualizados posible, que nos permitan evitar que las tasas de embarazo caigan de forma generalizada. Aparentemente con la Transferencia Selectiva de 2 Embriones (TES-2) deberíamos conseguir dicho objetivo, seleccionando el tipo de pacientes sobre el que aplicarlos y con unos criterios de selección embrionaria estrictos. El objetivo de nuestro trabajo es el de reflejar nuestra experiencia tras la aplicación de dichos criterios.

MÉTODOS: Estudio realizado sobre 250 ciclos de FIV/ICSI divididos en 4 grupos: Grupo I: Parejas TES-2 (*). En caso de no cumplir alguno de los requisitos TES-2 se realizó la transferencia de los embriones disponibles hasta un máximo de tres, obteniéndose con ello otros 3 grupos: Grupo II: transfer de 1 embrión. Grupo III: transfer de 2 embriones y Grupo IV: transfer de 3 embriones. Se analizaron los porcentajes de embarazo múltiple y se compararon con los obtenidos antes de la aplicación de dicho criterio (30% de embarazo múltiple, repartido en un 24% de doble y un 6% de triple). (*)Requisitos TES-2: Mujer menor de 38 años Primer ciclo de FIV/ICSI >3 embriones, dos de los cuales, por lo menos, presenten criterios de idoneidad (6-8 células en día+3, blastómeras simétricas y regulares, menos de un 10 % de fragmentación y ausencia de multinucleación).

RESULTADOS: Se realizaron un total de 239 transferencias con un porcentaje global de embarazo por transferencia del 49,3%. La tasa de embarazo múltiple obtenida fue del 30 %, con un 29,2% de dobles y un 0,8% de triples. Al analizar la procedencia de esos embarazos dobles vimos que provenían principalmente de las transferencias de 3 embriones (Grupo IV) (un 34% de dichas transferencias originó un embarazo doble) pero también de las TES-2 (Grupo I) (29%). De las 239 transferencias únicamente 56 pudieron ser incluidos en el Grupo I (23,4%). En el resto de los grupos, la distribución era la siguiente: 9 transfer en el Grupo II (3,7%), 57 en el Grupo III (23,8%) y 117 en el Grupo IV (48,9%). Los porcentajes de embarazo obtenidos oscilaban entre el 11,1 % del Grupo II y el 67,8% del Grupo I.

CONCLUSION: Se comprobó que con la aplicación de estos criterios no se comprometían los resultados globales de embarazo, pero tampoco disminuían los porcentajes de embarazo múltiple. Se consiguen eliminar los embarazos triples, pero a costa de aumentar en más de cinco puntos los dobles (de un 24% a un 29,2%). Consecuentemente, para acercarnos aún más al objetivo propuesto al principio: “el nacimiento de un niño único sano” deberemos estudiar profundamente estos dos casos (Grupos I y IV) a fin de ajustar aún más los criterios de transferencia embrionaria. Pero, a pesar de todo, las parejas no ven con desagrado los embarazos dobles, y nuestra experiencia nos dice que mientras la decisión final de la transferencia recaiga sobre los futuros padres, y no venga la TES-1 por imperativo legal, difícilmente conseguiremos reducir los porcentajes de “embarazo múltiple/doble”.

0.13.

EFECTO DE LA MORFOLOGÍA PRONUCLEAR SOBRE LA CALIDAD EMBRIONARIA, TASA DE GESTACIÓN, EMBARAZO MÚLTIPLE Y ABORTO

Cristina Álvarez, Roser Taronger, Carmen García Garrido, Azucena Tello, María Cerrillo, M^a Dolores Díaz, Gaspar González de Merlo. Laboratorio de FIV. Unidad de Reproducción. Hospital General Universitario de Albacete.

OBJETIVO: Determinar si la morfología pronuclear es un criterio adicional para la selección embrionaria

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio prospectivo. Se evaluó morfología de pronúcleos (PNs) (912 cigotos, 214 ciclos, 188 pacientes) 16-18 h post FIV/ICSI. La edad media fue 35,0±3,6 (28-40 años). Los patrones utilizados (P0-P5) se basaron en número y distribución de nucleolos en cada PN, también se valoró tamaño de PNs y presencia de halo citoplasmático. Los embriones se seleccionaron en D+2/D+3, clasificándolos en G1-G2 (buena calidad) y G3-G4 (mala calidad). Se crearon 4 grupos en función del número de embriones G1-G2 transferidos que procedían de P0. G1: 1 embrión (60 ciclos); GII: >1(46 ciclos); GIII: ninguno (58 ciclos) y GIV: todos (50 ciclos).

RESULTADOS: Un 84,5% de los embriones G1-G2 procedían de P0, mientras que el 67,7% de G3-G4 y bloqueados de P(1-5). El modelo de regresión logística reveló que la combinación de P0, PNs de igual tamaño y la presencia del halo pronosticaba embriones de buena calidad ($P<0,05$). Las tasas de embarazo clínico, múltiple y aborto fueron: G1: 43,3%; 38,5% y 7,7%. GII: 65,2%; 30% y 6,7%. GIII: 17,2%; 10%; y 33,3%. GIV: 100%; 46,2% y 7,7%. El GIII mostró diferencias significativas con el resto de grupos, siendo menor la tasa de gestación y mayor la de aborto. El embarazo múltiple fue inferior en GIII que en GIV ($P<0,05$).

DISCUSIÓN: Tesarik y Greco (1), demostraron mejores tasas de implantación y embarazo a partir de cigotos P0. Igualmente, nuestros resultados sugieren buena relación entre morfología del cigoto y calidad embrionaria con embarazo e implantación. Se ha sugerido que la polarización de la cromatina (2) y nucleolos representa un paso temprano en la formación del eje embrionario. La ausencia de aposición pronuclear y alteraciones en la polarización, son incompatibles con el desarrollo normal de los cigotos y resultado de un mal funcionamiento de los centríolos del espermatozoide. Varios trabajos han estudiado la correlación de la morfología de PNs con otros marcadores de normalidad embrionaria (3,4). Coskun et al (5) observaron la relación del patrón pronuclear con la incidencia de anomalías cromosómicas, siendo significativamente más bajas en cigotos con nucleolos polarizados. Sin embargo, otras características del cigoto como presencia de halo, tamaño de los PNs y número de nucleolos no mostraron esta relación.

CONCLUSIONES:

- Los preembriones de mejor calidad proceden de P0.
- La transferencia de preembriones (G1-G2) procedentes de P0 incrementa tasas de gestación y embarazo múltiple.
- La combinación del P0, PNs de igual tamaño y la presencia de halo pronostican embriones de buena calidad.
- La valoración morfológica de los cigotos (D+1) y de los preembriones (D+2/D+3) son criterios complementarios que mejoran la selección embrionaria.

REFERENCIAS: 1. Tesarik J, Greco E.: The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. Hum Reprod 1999; 14: 1318-1323. 2. Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J.: Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, PN formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation. Hum Reprod Update 1995; 1: 429-461. 3. Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J.: Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. Reprod Biomed Online 2004; 8: 695-700. 4. De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B.: High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. Human Reprod 2002; 17: 2402-2409. 5. Coskun S, Hellani A, Jaroudi K, Al-Mayman H, Al-Kabra M, Qeba M.: Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. Reprod Biomed Online 2003; 7:86-90.

0.14.

RELACIÓN ENTRE CALIDAD MORFOLÓGICA Y TASA DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

F. Prados, N. Ortiz-Piñate, G. Pérez-Bermejo, F. Gallego-Terris, C. Hernández, A. Rubio, O. Collado, I. Bruna.
Unidad de Reproducción. Hospital de Madrid-Montepríncipe.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO: La calidad morfológica de los embriones predice sus posibilidades de implantación. Sin embargo, hay grupos de pacientes en los que dicha predicción no se cumple. Cuando la paciente es mayor de 37 años, es frecuente encontrar embriones que, a pesar de su buena morfología, no son de buena calidad. Esto se debe, probablemente, a la acumulación de errores genéticos en los ovocitos. El objetivo de este estudio es determinar con la máxima precisión las probabilidades de implantación de nuestros embriones. Esto nos ayudará a diseñar estrategias de transferencia que maximicen las probabilidades de embarazo minimizando la incidencia de gestaciones múltiples.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudiamos los casos de FIV con ovocitos homólogos realizados en nuestro centro entre el 01/01/2001 y el 20/08/2005. Los embriones se clasificaron en 4 categorías morfológicas: G1, embriones de óptima morfología y tasa de desarrollo con <10% de fragmentación; G2, embriones de muy buena morfología con <20% de fragmentación; G3, embriones con alteraciones morfológicas o de ritmo de desarrollo moderadas; G4, embriones de >35% fragmentación, muy mala simetría, desarrollo anormal, blastómeros multinucleados y, frecuentemente, combinaciones de todos estos aspectos. Consideramos implantación cuando se detecta latido cardíaco fetal. En una primera fase determinamos una tasa de implantación (TI) preliminar de cada grupo de embriones. Para ello utilizamos todas las transferencias homogéneas a pacientes de <37 años. En una segunda fase, analizamos los casos de transferencias heterogéneas de 2 embriones a pacientes de <37 años. Para cada combinación de embriones, por ejemplo, 1G1+1G2, consideramos implantados ambos en los embarazos gemelares. En los embarazos simples utilizamos la TI preliminar de cada categoría para calcular en qué casos el implantado sería el G1 y en qué otros el G2. Esto nos da una TI de heterogéneos que, sumada a la TI preliminar nos da la TI definitiva. Y así sucesivamente para las 4 categorías morfológicas embrionarias. Comparamos los datos obtenidos del estudio descrito con lo observado en pacientes de >37 años.

RESULTADOS: A partir de 194, 124, 194 y 22 embriones de transferencias homogéneas y 96, 121, 98 y 17 de heterogéneas obtuvimos una TI definitiva del 42,6%, 32,2%, 21,7% y 6,5% para los embriones G1, G2, G3 y G4 respectivamente. Las diferencias fueron en todos los casos significativas. Para la población de pacientes menores de 37 años, la TI global fue del 28,6% (303/1061). Habiendo transferido 328 (30,9%) embriones G1, 307 (28,9%) G2, 352 (33,2%) G3 y 74 (7,0%) G4. En pacientes mayores de 37 años se obtuvo una TI del 17,3% (71/410). Se transfirieron 110 (26,8%) embriones G1, 121 (29,5%) G2, 164 (40,0%) G3 y 15 (3,7%) G4. Si bien el número de G3 transferidos fue significativamente mayor que en pacientes menores de 37 años, el de los G4 fue significativamente menor. La TI de los casos en que se transfirieron sólo embriones G1 a pacientes mayores de 37 fue de 21,1% (12/57).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Los 4 grupos de embriones definidos presentan TI significativamente distintas. De modo que, los embriones G3 tendrían unas probabilidades de implantar 3,3 veces superiores a los G4, los G2 4,9 veces y los G1 6,6 veces. Los embriones G1 de pacientes mayores de 37 años muestran una TI significativamente menor que la de los G1 y muy similar a la de los G3 de menores de 37. Nuestros datos sugieren que no podemos calificar a priori ningún embrión de pacientes mayores de 37 años como "de óptima calidad". Por tanto, sugerimos mantener la transferencia de 2 ó incluso 3 embriones en estos casos aún a pesar de que su aspecto morfológico sea perfecto.

0.15. PAREJAS SEROPOSITIVAS Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA

C. Roméu, C. Leal, A. Urries.
Reproducción Asistida Quirón Zaragoza.

INTRODUCCIÓN: Tanto el diagnóstico precoz como el uso de terapias antivirales adecuadas han aumentado la esperanza y la calidad de vida de pacientes infectados por VIH, VHC o VHB. Como resultado, parejas cuyos miembros son seropositivos reclaman su derecho a ser padres, siempre y cuando el riesgo de transmisión de la infección sea del 0%, valor que será alcanzado cuando la pareja se vea sometida a una terapia preventiva.

OBJETIVO: Consiste en determinar la terapia preventiva más adecuada para cada tipo de infección, haciendo especial hincapié en la aplicación de técnicas de reproducción asistida (TRA), y en la descripción del laboratorio de alta seguridad biológica, lugar donde se procesarán las muestras de los pacientes seropositivos.

MATERIALES Y MÉTODOS: Bases de datos online (Medline, Revistas, Hepatitis, Aehc, Drscope, Famlydoctor, Bio-Davidson, Geosalud, Tratado-Uninet, Bvs, Scielo) sesgadas según las palabras clave “carga viral”, “VIH”, “VHC”, “VHB” y sus respectivas traducciones al inglés. Bibliografías y *abstracts* del congreso anual de la ESHRE. Artículos de revistas tales como el Human Reproduction, Human Reproduction Update y el Fertility and Sterility. Curso sobre diagnóstico y tratamiento en reproducción humana desarrollado en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y seminario sobre la infección por el VIH desarrollado en la Universidad de Medicina de Zaragoza. Capítulos de los libros citados a continuación: Manual práctico de esterilidad y reproducción humana, Recomendaciones de seguridad biológica en el laboratorio de reproducción asistida, Reproducción humana y *Blastocyst culture*.

RESULTADOS: Las partículas víricas se encuentran en todos los fluidos orgánicos del paciente infectado. En este trabajo nos centraremos en fluidos tales como la sangre, el líquido pre-seminal y el semen en varones o el líquido folicular (LF), las secreciones cervicovaginales y la leche materna en mujeres. Se ha estudiado la metodología pertinente para disminuir al máximo el riesgo de transmisión vírica de la enfermedad tanto a nivel sexual como vertical, mediante el uso de terapias preventivas. A fin de evitar la transmisión sexual la terapia preventiva constará de: métodos profilácticos para ambos miembros de la pareja, un riguroso tratamiento médico antiviral del paciente infectado y la aplicación de TRA. A nivel de TRA; si el varón es el miembro seropositivo se le realizará un procesado del semen (lavado de la muestra a través de dos capacitaciones consecutivas y posterior detección de la carga viral mediante *nested-PCR*) para a continuación realizar ICSI, mientras que si el individuo seropositivo es la mujer se le someterá a un procesado del LF para posteriormente aplicar ICSI. Pero si lo que se pretende es evitar el riesgo de transmisión vertical (materno-fetal), la terapia preventiva se basará en la aplicación de métodos profilácticos y de un riguroso tratamiento médico sobre la mujer seropositiva y su futura descendencia. Las terapias descritas han logrado alcanzar un riesgo de transmisión viral del 0%. El área física donde se tratarán las muestras de los pacientes infectados será el denominado laboratorio de alta seguridad biológica, laboratorio independiente que debe cumplir una serie de requisitos los cuales aportarán una fiabilidad máxima al procesado de las muestras.

CONCLUSIONES: En base a la bibliografía existente, la seguridad de las técnicas utilizadas en Reproducción Asistida parece ser máxima, por lo que podemos determinar que el trabajo con muestras infecciosas es perfectamente factible. Hecho demostrado gracias a la gran cantidad de estudios realizados durante los últimos años, en los que se han conseguido embarazos a término de bebés sanos, logrando un riesgo de transmisión de la infección nulo. Por otro lado, destacaremos que el procesamiento de las muestras nos permite trabajar por debajo del umbral de infección del propio virus aumentando la seguridad del proceso.

0.16.**ECLOSIÓN ASISTIDA CON ELIMINACIÓN DE FRAGMENTOS EN CRIOTRANSFERENCIAS DE DOS EMBRIONES**

JM. Moreno, L. Gil, JJ. López-Gálvez, M. Lloret, R. Sánchez, I. Ochando, J. Rueda. Unidad de Reproducción Clínica Vistahermosa de Alicante.

OBJETIVO: Las tasas de embarazo e implantación en transferencias de embriones criocongelados son habitualmente bajas comparadas con las de embriones en fresco. El endurecimiento de la zona pelúcida junto con la presencia de blastómeras lisadas tras el proceso de congelación-descongelación llega a comprometer la viabilidad embrionaria, lo que se puede paliar mediante la eclosión asistida que consiste en crear un orificio en la zona pelúcida del embrión para facilitar el proceso natural de eclosión. El objetivo del estudio es evaluar la eficacia de esta técnica en embriones descongelados, aspirando material degenerado y transfiriendo únicamente dos embriones para evitar el embarazo múltiple.

METODOLOGÍA: Estudio prospectivo que incluye a 21 pacientes, de edades comprendidas entre 28 y 37 años, con embriones congelados en día 3 que realizan un ciclo de criotransferencia durante el primer semestre del 2005. Se aplica la eclosión asistida con eliminación de fragmentos en los embriones descongelados con más del 50% de sus blastómeras intactas. Se descongelan con Thaw kit 1, se cultivan en G1 durante una hora y se transfieren con Embryoglu. La eclosión asistida se realiza de forma química con ácido de Tyrode.

RESULTADOS: En todos los embriones transferidos se consigue eliminar la mayor parte de los fragmentos dejando como máximo un 10% en su interior. Se obtiene el 42,8% (9/21) de tasa de embarazo y el 21,4% (9/42) de tasa de implantación.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Nuestro estudio muestra que la introducción de la eclosión asistida con la aspiración de fragmentos como técnicas de rutina en ciclos de criotransferencia doble no sólo mejora la calidad embrionaria, sino que además, consigue una tasa de embarazo e implantación elevada y evita el embarazo múltiple. Sería conveniente diseñar un estudio multicéntrico controlado y randomizado para poder confirmar los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: De Moraes LA, De Miranda Cota AM. Assister hatching improves implatation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. Hum Reprod.2005 May;20(5):1429 Gabrielsen A, Agerholm I, et al. Assisted hatching improves implatation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. Hum Reprod. 2004 Oct;19(10):2258-62. Check JH, Hoover L, et al. The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. Fertil Steril. 1996 Feb;65(2):254-7.



El modo más sencillo, práctico y fiable de incorporar el
Diagnóstico Genético Preimplantacional a su centro de FIV

NUESTRA EXPERIENCIA EN DGP: 4.860 CICLOS (DIC 2004)

REALIZAMOS

Test de aneuploidías, reorganizaciones cromosómicas y
enfermedades monogénicas

OFRECEMOS

Programación inmediata - Alta experiencia - Continua innovación tecnológica

0.17.**ESTUDIO DE MICRODELECCIONES EN EL CROMOSOMA Y EN VARONES CON OLIGOZOOSPERMIA Y AZOOSPERMIA**

Lledó B, Galán FM, Rodríguez-Arnedo A, Guerrero J, Ten J, Bernabeu R. Universidad de Alicante

OBJETIVOS: El estudio de la espermatogénesis ha permitido identificar una serie de factores genéticos implicados en la esterilidad masculina, localizados en el cromosoma Y: la región AZF. Esta región se encuentra dividida en tres locus no solapados (AZFa, AZFb, AZFc), que contienen genes implicados en el control de la espermatogénesis y delecionados en varones infértiles. El objetivo de este estudio ha sido estimar la prevalencia de microdeleciones en el cromosoma Y en un grupo de varones infértiles que mostraban azoospermia u oligozoospermia con el propósito de determinar la causa de la infertilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS: El DNA genómico de 125 varones citogenéticamente normales fue extraído a partir de sangre periférica. Los análisis seminales se realizaron de acuerdo a las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (n=85 oligozoospermicos, n=40 azoospermicos) y el cariotipo fue analizado empleando bandas G. Mediante 5 reacciones multiplex se amplificaron 21 STSs (secuencias específicas de sitio).

RESULTADOS: Se identificaron microdeleciones en el cromosoma Y en 9 de los 125 pacientes. La frecuencia encontrada fue mayor en pacientes azoospermicos (12,2%) que en oligospermicos severos (4,7%). La tasa total de deleciones fue de 7,2%. Se observó una mayor frecuencia de deleciones en la región AZFc (56%) y no se identificaron deleciones en las regiones AZFa o AZFb únicamente, sin embargo deleciones que se expandían en dos o tres regiones AZF se detectaron en un 44% de portadores de microdeleciones (AZFa+b 11%, AZFa+c 22%, AZFa+b+c 11%).

CONCLUSIONES: La frecuencia de microdeleciones en el cromosoma Y en nuestro estudio resultó ser similar a trabajos previos. Esto pone de manifiesto la necesidad de análisis mediante PCR para determinar la etiología genética en casos con testiculopatías idiopáticas severas. Nuestros resultados apoyan las recomendaciones de realizar un estudio genético en varones infértiles antes de comenzar un programa de ICSI para recibir un cuidadoso consejo genético.

global[®]

Un solo medio... sin necesidad de usar Medios Secuenciales

DÍA 1 → Blastocisto

Día 1
Día 2
Día 3
Día 4
Día 5

* El embrión elige y toma del medio lo que necesita en cada momento, desarrollándose en un ambiente físico-químico estable, evitando los cambios osmóticos*, (Biggers 2002, Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston USA).

Y además: HTF Plus, HTF, HTF Plus con Hepes, HTF con Hepes, LiteOil, Acido Tirodes, HSA, Medios de Congelación etc.

Distribuidor en España:
Quermed, s.a.
Distribución de Reproductores Humanos

©2004 LifeGlobal

La utilización de un único medio, reduce el stress metabólico asociado al cambio de composición, que implica la utilización de medios de cultivos diferentes.

Simplifica los controles de calidad en el Laboratorio de FIV y reduce las posibilidades de error

0.18. ANÁLISIS CROMOSÓMICO Y POTENCIAL DE DESARROLLO EN ZIGOTOS MONOPRONUCLEARES Y APRONUCLEARES

G. Campos¹, M. Parriego¹, F. Vidal², A. Veiga¹, PN. Barri¹

¹Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus. ²Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona.

INTRODUCCIÓN: La presencia de 2 pronúcleos (PN) y 2 corpúsculos polares (CP) se relaciona habitualmente con un patrón de fecundación normal y un contenido cromosómico diploide, siendo descartados para la transferencia aquellos cigotos con un número distinto de pronúcleos asociado generalmente a un contenido cromosómico alterado. El objetivo de este estudio es aportar nuevos datos sobre la constitución genética y la capacidad de desarrollo de los cigotos con uno (1PN y 2CP) o ningún pronúcleo (OPN y 2CP), que permitan aconsejar o desaconsejar de un modo más fiable su transferencia.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se incluyeron en el estudio 250 embriones procedentes de 30 ciclos de FIV-ICSI-DGP realizados entre Febrero de 2003 y Mayo de 2004 en el Institut Universitari Dexeus. Los embriones fueron clasificados en 3 grupos: (i) OPN 2CP (n= 30); (ii) 1PN 2CP (n= 14) y (iii) 2PN 2CP (n= 206) o grupo control. La valoración de la fecundación tuvo lugar a las 16-20 post inseminación. La biopsia embrionaria se realizó según procedimiento habitual en nuestro centro. Únicamente fueron procesados para el análisis y por lo tanto incluidos en nuestro estudio aquellos embriones que presentaban morfología correcta y estadio de desarrollo acorde con el momento de la biopsia. El análisis cromosómico de los blastómeros se realizó mediante FISH, evaluándose los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y. Los embriones fueron mantenidos en cultivo hasta D+5 y evaluados para la transferencia.

RESULTADOS: Los porcentaje de embriones anormales para los cromosomas estudiados fueron: 13/30 (43,3%) en el grupo i, 9/14 (64,3%) en el grupo ii y 108/206 (52,4%) en el grupo control. Aunque parece observarse un grado superior de anormalidad en los embriones procedentes de 1PN las diferencias no resultan estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio, probablemente debido a las diferencias en el número de embriones incluidos en cada grupo. Sin embargo, los embriones procedentes del cigotos OPN mostraron una capacidad de desarrollo significativamente superior ($P<0,05$) al resto de embriones, con una tasa de blastocisto del 45,9% respecto al 6,25% (1PN) y al 14,3% (2PN). La hora promedio de observación de los pronúcleos fue 19,55h en el grupo i, 19,08 en el grupo ii, y 19,17 en el grupo iii, no encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Los resultados obtenidos sugieren que debemos actuar de manera distinta frente a embriones procedentes de cigotos unipronucleares que frente a aquellos a los que no les hemos observado pronúcleos. Mientras que a los primeros hay que descartarlos tanto por su alta probabilidad de ser cromosómicamente anormales como por su bajo potencial de desarrollo, los datos de este trabajo apuntan que los embriones del grupo i podrían ser considerados aptos para la paciente, aún sabiendo que no es la situación ideal. Las tasas de normalidad cromosómica y de capacidad de desarrollo de este grupo de embriones, superiores al grupo control, parecen indicar que probablemente nos encontramos ante un pool de embriones de alta calidad, con una velocidad de desarrollo superior a la habitual, en los que la desaparición de los pronúcleos se produce antes de la observación de los mismos, es decir, ante unos embriones con patrón de división temprana o *early cleavage*, que además podrían relacionarse con tasas de embarazo superiores. Una observación de los pronúcleos no más tarde de las 18 horas post ICSI, así como de la división temprana a las 26 horas tras la inseminación, debería aportarnos datos que permitieran elegir embriones no sólo con capacidad de desarrollo superior sino probablemente también con menos anomalías cromosómicas, minimizando así el riesgo de estar transfiriendo embriones activados partenogénicamente o triploides.

0.19. VALOR PRONÓSTICO DEL FISH DE ESPERMATOZOIDES EN LOS RESULTADOS DE DGP EN PAREJAS CON ABORTO DE REPETICIÓN DE CAUSA DESCONOCIDA

L. Rodrigo, C. Rubio, Emilia Mateu, A. Mercader, P. Buendía, T. Viloria, M. Gil-Salom, J. Remohí, A. Pellicer.
Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia.

OBJETIVO: la presencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides ha sido propuesta en estudios recientes como responsable de algunos casos de aborto de repetición (1,2,3,4). El objetivo de este estudio fue comparar los resultados de los ciclos de diagnóstico genético preimplantacional (DGP) en parejas con aborto de repetición de causa desconocida, según el resultado del estudio cromosómico en espermatozoides realizado previamente mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

METODOLOGÍA: este estudio retrospectivo incluye 53 parejas con aborto de repetición (≥ 2 abortos) de causa desconocida a las que se les realizó FISH de espermatozoides para el estudio de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y (Vysis Inc., Downers Grove, Il. USA) y DGP para el estudio de aneuploidías de los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y (MultiVysion PB panel, Vysis Inc.). En total se realizaron 67 ciclos de DGP, 53 ciclos en 41 pacientes con un resultado de FISH de espermatozoides normal (con incidencia de anomalías cromosómicas similar a la población control de donantes normozoospermicos) y 14 ciclos en 12 pacientes con un resultado de FISH de espermatozoides anormal (con incremento significativo de anomalías cromosómicas respecto a la población control). En el tercer día de desarrollo embrionario se biopsiaron uno o dos blastómeros, y los embriones diagnosticados como normales para los cromosomas descritos fueron transferidos al útero en el día 5 de desarrollo. Se utilizó un test estadístico de Chi-cuadrado para comparar entre los dos grupos de pacientes las tasas de fecundación, gestación, implantación y aborto, así como la tasa de embriones anormales y mosaicos (con resultados discordantes en dos células del mismo embrión).

RESULTADOS:

	FISH NORMAL	FISH ANORMAL
Nº ciclos	53	14
Edad media \pm DS	34,26 \pm 3,16	33,93 \pm 2,37
Media ovocitos \pm DS	11,77 \pm 6,08	11,29 \pm 3,53
Tasa fecundación	78,79 (442/561) ^a	68,0 (102/150) ^a
Nº embriones analizados	278	77
% embriones anormales (Nº)	70,14 (195)	66,23 (51)
% embriones mosaico	24,48	22,64
% transferencias	64,15	71,43
% embarazos por transferencia (Nº)	32,35 (11)	50,0 (5)
Tasa implantación	25,0	36,84
Tasa aborto (Nº)	27,27 (3)	0 ^a
<i>P</i> <0,05		

DISCUSIÓN: el porcentaje de embriones anormales y mosaicos fue similar en ambos grupos de estudio. Sin embargo, la tasa de fecundación fue significativamente menor en el grupo de pacientes con FISH de espermatozoides anormal. Además, las tasas de gestación e implantación fueron superiores, y la tasa de aborto inferior e igual a cero en el grupo de pacientes con FISH de espermatozoides anormal, aunque no llegó a alcanzar significatividad estadística al compararlo con el grupo de pacientes con FISH de espermatozoides normal.

CONCLUSIÓN: el estudio de anomalías cromosómicas en espermatozoides mediante FISH resulta de gran utilidad en parejas con aborto de repetición de causa desconocida, no sólo para identificar la posible causa del aborto en algunos casos, sino también como pronóstico para un futuro ciclo de DGP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 1.Gioraldino C, Calugi G, Laconianni L, et al. Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil and Steril*, 1998, 70: 576-577. 2.Rubio C, Simón C, Blanco J, et al. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet*, 1999, 16: 253-258. 3.Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*, 2001, 16(10): 2084-2092. 4.Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, et al. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *RBM Online*, 2004, 9(3): 312-320.

0.20.**PUESTA A PUNTO DEL METODO DE FIJACIÓN NUCLEAR PARA FISH EN NUESTRO PROGRAMA DE DGP (Diagnóstico Genético Preimplantacional). RESULTADOS PRELIMINARES CON ESTE MÉTODO MODIFICADO.**

M. Mandiola, A. Guembe, F. Luceño, K. Carbonero, MJ. Iñarra, F. Atutxa, T. Ganzabal, A. López de Larrucea, G. Barrenetxea, R. Jimenez, JA. Aguirregoikoa.
Unidad De Reproducción Asistida. Quirón Donostia - Quirón Bilbao.

OBJETIVOS: Debido a la creciente demanda en ciclos de DGP (Diagnóstico genético preimplantacional) en las Unidades de Reproducción, nos vemos en la necesidad de poner a punto la técnica con métodos fiables, que nos garanticen la obtención de un buen material nuclear para su análisis. Hasta ahora los métodos más utilizados son los siguientes: 1.- El “ Método de Tarkovski” ,un método que requiere una amplia experiencia para no “ perder” los núcleos y 2.- el “Método de Coonen”, que nos ofrece unos núcleos un poco “en tres dimensiones”, que pueden dificultar las lecturas de las marcas de FISH. Nuestra modificación de la técnica pretende evitar los problemas de cada una de las anteriores, aprovechando sus virtudes.

MÉTODOS: Iniciamos la fijación nuclear con Tween-20/CIH, con el afán de poder controlar en todo momento la localización de la blastómera. Una vez que conseguimos que desaparezca todo el material citoplasmático y que el núcleo se visualice de forma clara y sin artefactos alrededor, añadimos una solución de metanol/acético sobre el material nuclear para que éste quede más extendido sobre el porta y las sondas puedan hibridar correctamente y sean de fácil lectura. Analizamos los resultados de los ciclos realizados hasta el mes de Septiembre de este año 2005.

RESULTADOS:

Nº ciclos	Nº núcleos fijados	Nº núcleos perdidos (%)	Nº núcleos sin diagnóstico (%)	Nº núcleos con diagnóstico
21	122	6 (4%)	15 (12.3%)	101 (82,8%)

CONCLUSIONES: Debido a la dificultad que conlleva fijar un material tan preciado como son los núcleos de las blastómeras para DGP, necesitamos poseer a nuestra disposición una técnica que nos permita perder el menor número de núcleos posibles, que pueda ponerse a punto sin extremada dificultad, así como que sea fácilmente reproducible por diferentes embriólogos de una misma Unidad. Creemos que esta modificación reúne todas estas características tan preciadas para poder llevar a cabo un ciclo de DGP con posibilidades de obtener un buen diagnóstico genético.

0.21

PUESTA A PUNTO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL DNA EN UNA SOLA CÉLULA UTILIZANDO LA DNA POLIMERASA PHI29 (MDA)

E. Fernández García, C. Linares Miquel, A. Barroso Bohorquez, M. Robledo Batanero.
Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

INTRODUCCIÓN: La técnica conocida como *Multiple Displacement Amplification* (MDA) se utiliza para amplificar pequeñas cantidades de DNA, g. Esta técnica está basada en la utilización de 1 ng se pueden obtener 8 utilización de la enzima ADN polimerasa del bacteriófago Phi29 en combinación con secuencias de hexameros capaces de hibridar en múltiples sitios de nuestro DNA patrón. La Phi29 ADN polimerasa inicia la replicación del DNA en múltiples sitios simultáneamente, obteniendo el amplificado total del genoma.

OBJETIVO: La puesta a punto de la técnica a partir de una sola célula, se plantea con el fin de mejorar los resultados obtenidos en el Diagnóstico genético preimplantacional (DGP) para solventar las limitaciones que en la actualidad nos plantea el DGP basado en la PCR multiplex-fluorescente.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS: Para llevar a cabo la puesta a punto de la MDA hemos utilizado el *Kit* de amplificación Genomiphi (Amersham). En la primera aproximación para la amplificación de una sola célula, partimos de una dilución de linfocitos, obtenidos a partir de sangre periférica mediante gradientes de Ficoll. Por un lado linfocitos de un paciente tipado con leucemia aguda linfoblástica y por otro como control los linfocitos de la persona que realiza la técnica. La alta eficacia en la replicación del DNA genómico que tiene esta técnica, hace necesario un estricto control de la presencia de DNA exógeno, por lo que es obligado trabajar siempre en campana de DNA, con guantes y mascarilla y a ser posible genotipar al personal que manipula las muestras. Una vez ajustados los parámetros iniciales de la técnica, se utilizaron para la amplificación de una sola célula, blastómeros de ratón. La estandarización final de la técnica se lleva a cabo con embriones humanos no aptos para la transferencia, que nos dieron la posibilidad de cotejar los resultados obtenidos en los distintos blastómeros. La amplificación del DNA genómico se realizó como se describe en el *Kit* de Genomiphi, con algunas modificaciones. La utilización de una sola copia de DNA genómico rebaja la cantidad recomendada de 1ng a 6pg. La temperatura de incubación es de 30°C después de desnaturalizar la muestra 3 min a 95°C. El tiempo requerido para la MDA es de 16-18 h. En nuestro caso hemos podido rebajar el tiempo de reacción a 8 horas con buenos resultados. No hemos encontrado diferencias entre la utilización del tampón de lisis alcalina, con la posterior parada con tricina, y no utilizarlo, por lo que ese paso previo al proceso de amplificación mediante Genomiphi se puede obviar. Presentamos los resultados de la amplificación del gen de Corea de Huntington mediante PCR del producto obtenido tanto en linfocitos como en blastómeros humanos.

CONCLUSIÓN: La cantidad de DNA que se consigue con 8 horas de reacción de MDA nos permite obtener los resultados de la PCR diagnóstica en una sola ronda de amplificación, compensando el tiempo total requerido para el DGP.

0.22.

TÉCNICA COMBINADA SCD-FISH PARA EL ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE FRAGMENTACIÓN DEL DNA Y ANEUPLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES

L. Muriel¹, R. Santiso¹, M. Gutiérrez², R. Vázquez², E. Segrelles², J. Gosálvez³, JG. Álvarez⁴, V. Goyanes^{1,2}, JL. Fernández^{1,2}

¹Sección de Genética-Unidad de Investigación, Complejo Hosp. Univ. Juan Canalejo. La Coruña.

²ARGGORA. Unidad de la Mujer. La Coruña.

³Unidad de Genética, Fac. Biología, Universidad Autónoma de Madrid.

⁴Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN, La Coruña.

INTRODUCCIÓN: Numerosos estudios demuestran que hombres infértiles presentan una mayor frecuencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides, con el riesgo de ser transmitidas a la descendencia (1). La elevada incidencia de aneuploidías se correlaciona con muestras seminales de baja calidad y con altos niveles de fragmentación del DNA (2).

OBJETIVO: Analizar simultáneamente el nivel de fragmentación en el DNA y de aneuploidías en espermatozoides humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS: Análisis de la fragmentación del DNA: Se determinó mediante el test de la Dispersión de la Cromatina de Espermatozoides (SCD) utilizando el kit Halosperm®, técnica desarrollada recientemente en nuestro laboratorio (3, 4). Los espermatozoides se incluyen en una matriz de agarosa sobre un portaobjetos, se tratan con una solución ácida que desnatura el DNA, y finalmente se lisan para eliminar proteínas y membranas. Los espermatozoides con el DNA no fragmentado muestran un nucleóide con un core central y un halo periférico de dispersión de los bucles de DNA. Las células con el DNA fragmentado no forman halo de dispersión o éste es de pequeño tamaño. Análisis de aneuploidías: Se analizaron los cromosomas X, Y, 18; se determinó mediante Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) sobre portaobjetos previamente procesados por SCD. Los portaobjetos, una vez secos, se fijan para evitar que el material se desprenda, se desnaturizan y se hibrida con la triple sonda. El resultado de esta técnica es que podemos discriminar simultáneamente si las anomalías cromosómicas, del tipo diploidías y disomías, están presentes en núcleos espermáticos con o sin DNA fragmentado.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN: Los resultados preliminares de este estudio realizado sobre seis muestras de individuos fértiles y pacientes de infertilidad indican que los espermatozoides con el DNA fragmentado poseen mayores niveles de diploidías y disomías que aquéllos que no lo tienen. Estos resultados sugieren que la fragmentación del DNA podría ser un mecanismo genético para evitar la transmisión de anomalías genéticas a la descendencia.

BIBLIOGRAFÍA: 1-Oashi et al., High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Hum Reprod.* 2001;16:703-708. 2-Rubio et al., Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod.* 2001;16:2084-2092. 3- Fernández et al., The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003;24:59-66. 4-Fernández et al., Simple determination of sperm DNA fragmentation with an improved Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. *Fertil Steril., in press.*

0.23.

EFICACIA DEL USO DEL LÁSER EN UN PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

Buendía P, Mercader A, Gadea B, Rodrigo L, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Rubio C.
Instituto Valenciano de Infertilidad. Universidad de Valencia.

INTRODUCCIÓN: En los programas de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), el método que tradicionalmente se ha utilizado para realizar el orificio en la zona pelúcida ha sido el ácido Tyrode (1). Sin embargo, más recientemente se ha propuesto la utilización del láser como un método más rápido, sencillo y seguro (2, 3 y 4). El objetivo de este trabajo fue valorar la eficiencia del uso del láser en un programa de DGP. Para ello, se compararon las tasas de blastocisto y los resultados de gestación, implantación y aborto en los ciclos de DGP en los que se utilizó ácido Tyrode o láser (OCTAX, Herbron, Alemania).

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio retrospectivo (desde Enero del 2001 hasta Marzo del 2005) de 1055 ciclos del programa de DGP para estudio de aneuploidías en pacientes con aborto de repetición (n=200), fallo repetido de implantación (n=300), edad avanzada (n=315), factor masculino severo (n=55), anomalías cromosómicas en espermatozoides (n=40), enfermedad ligada al sexo (n=5), gestación previa con anomalía cromosómica (n=6) y causas mixtas (n=134). La biopsia embrionaria se realizó en día 3 de desarrollo utilizando ácido Tyrode en 499 ciclos y mediante láser en 556 ciclos. Se analizaron los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA). El desarrollo embrionario se evaluó cada 24 horas y los embriones cromosómicamente normales se transfirieron en día 5 de desarrollo. Para el análisis estadístico entre grupos se aplicó el test Chi-cuadrado.

RESULTADOS: La media de edad ($36,5 \pm 4,3$ vs $37,1 \pm 4,1$), así como las tasas de fecundación (72,6% vs 74,2%), el porcentaje de embriones evolutivos en día 3 (73,6% vs 72,1%) y la incidencia de anomalías cromosómicas (63,4% vs 65,5%) fue similar en ambos grupos (Tyrode vs láser). No se encontraron diferencias estadísticas en el número medio de embriones transferidos en ambos grupos de pacientes ($1,8 \pm 0,7$ vs $1,6 \pm 0,6$), ni tampoco en las tasas de gestación (34,6% vs 38,4%), implantación (26,4% vs 31,1%) y aborto (25,0% vs 26,0%). Sin embargo, la tasa de blastocistos en día 5 de desarrollo fue significativamente superior ($P < 0,0001$) en aquellos ciclos en los que se utilizó el láser para la biopsia embrionaria (41,6% vs 54,9%).

CONCLUSIONES: Nuestros resultados muestran que la incorporación del láser en los programas de DGP no sólo no afecta a los resultados clínicos de dichos ciclos, sino que además permite un mejor desarrollo embrionario tras la biopsia.

PALABRAS CLAVE: Biopsia embrionaria, láser, ácido Tyrode, blastocisto, DGP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: (1) De Vos A, Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 2001 Sep;21(9):767-80. (2) Hsieh YY, Huang CC, Cheng TC, Chang CC, Tsai HD, Lee MS. Laser-assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. *Fertil Steril.* 2002 Jul;78(1):179-82. (3) Han TS, Sagoskin AW, Graham JR, Tucker MJ, Liebermann J. Laser-assisted human embryo biopsy on the third day of development for preimplantation genetic diagnosis: two successful case reports. *Fertil Steril.* 2003 Aug;80(2):453-5. (4) Joris H, De Vos A, Janssens R, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser. *Hum Reprod.* 2003 Sep;18(9):1896-902.

0.24.**AMPLIFICACIÓN GENÓMICA POR DESPLAZAMIENTO MÚLTIPLE (MDA) EN DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL: PRIMERA APLICACIÓN CLÍNICA**

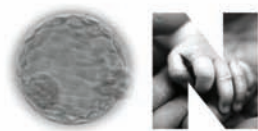
Lledó B, Ten J, Galán FM, Rodríguez-Arnedo A, Guerrero J, Bernabeu R. Universidad de Alicante.

OBJETIVO: Uno de los factores limitante en el DGP es la disponibilidad de suficiente DNA de elevada pureza. La amplificación de todo el genoma mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) es una novedosa técnica empleada para obtener elevadas cantidades de DNA de gran calidad. El objetivo de este estudio ha sido optimizar la MDA para células únicas como primer paso universal en el DGP. Una vez optimizado, la MDA se utilizó para amplificar DNA de blastómeras procedentes del programa de DGP para el Síndrome de Marfan.

MATERIALES Y MÉTODOS: Mediante MDA se amplificó todo el genoma de una única célula. Los productos de MDA se usaron como moldes para las reacciones de PCR de 5 locus diferentes: expansión de tripletes CAG en el gen IT15 (Enfermedad de Huntington), expansión del triplete CGG en la región 5' del gen FMR1 (Síndrome de X-Fragil), dos STSs empleadas en el diagnóstico del Síndrome de Marfan mediante estudio de segregación cromosómica y un nuevo marcador X/Y, X22. Un programa DGP-MDA fue desarrollado para el síndrome de Marfan en una pareja donde el varón está afecto y es portador de una nueva mutación en el gen FBN1.

RESULTADOS: La amplificación de todo el genoma de una única célula mediante MDA permitió el análisis de 5 locus diferentes empleando condiciones estándar. Un programa de DGP-MDA se desarrolló para el síndrome de Marfan permitiendo el diagnóstico de siete embriones que fueron biopsiados en día tres de cultivo y sus células analizadas. Se transfirieron dos embriones sanos 48 horas más tarde.

CONCLUSIONES: El uso de la MDA como paso universal en DGP marca una nueva etapa ya que suficiente DNA se obtiene de una única célula para el diagnóstico de cualquier enfermedad genética mediante métodos y condiciones estándar. Asimismo, junto con la Hibridación Comparativa del Genoma (CGH) permite obtener el cariotipo molecular de una única célula.



COOK®
COOK®
COOK®

Spermient™

Gradiente al 100% para preparación de semen de Sydney IVF®

Spermient es un gradiente de densidad de sílice recubierta de silano para la preparación de semen para inseminaciones intrauterinas o FIV. Cada vial es un gradiente al 100% en solución y puede ser diluido con el tampón para preparación de semen de Sydney IVF (K-SIWB-100) hasta la densidad deseada.



Productos para Infertilidad, Ginecología y Obstetricia

A veces sólo se tiene UNA oportunidad**La aguja para aspiración de ovocitos OVA STIFF® de COOK**

La aguja para recolección de ovocitos OVA STIFF incorpora un nuevo y ergonómico mango más fácil de controlar, un bisel rediseñado que hace a la aguja más afilada y un perfil "Echotip" alargado que mejora el brillo y da una mejor localización de la punta de la aguja. La aguja OVA STIFF ofrece también un bisel más corto para su uso en folículos menores o inmaduros.



Punta más afilada y ecogénica



Mango ergonómico

Cook ESPAÑA
Teléfono: 93 363 88 41
Fax: 93 419 86 43

COOK®

www.cookgroup.com

0.25.**DESARROLLO Y ESTATUS CROMOSÓMICO DE LOS EMBRIONES CON RITMO DE DIVISIÓN ACELERADA**

Gámiz P, Rubio C, Mercader A, De los Santos JM, Vilorio T, De los Santos MJ.
Instituto Valenciano de Infertilidad. Equipo IVI Valencia.

INTRODUCCIÓN: La constitución cromosómica de los embriones humanos en fases tempranas de desarrollo está ampliamente documentada (Munné 1995, 1998; Rubio, 2003), se sabe que aquellos embriones asimétricos, con un desarrollo lento y/o con alto grado de fragmentación presentan una mayor tasa de anomalías cromosómicas. Sin embargo, existen pocos datos en la literatura acerca de la constitución cromosómica de embriones con un ritmo de división temprana acelerada. Puesto que no parece existir un control estricto del ciclo celular en los primeros estadios de división embrionaria en humanos, es posible que los embriones rápidos también presenten ciertas anomalías en la segregación cromosómica así como en su potencial evolutivo.

OBJETIVO: El objetivo de este trabajo es analizar el grado de blastulación y la condición cromosómica de embriones que tenían seis o más células en día 2 de desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio retrospectivo en el que se incluyeron 5971 embriones: 1381 embriones procedentes de pacientes sometidas a un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV) y 4590 embriones procedentes de pacientes incluidas en nuestro programa de diagnóstico genético preimplantacional (DGP). En todos los ciclos la edad de las pacientes fue menor de 38 años, la inseminación ovocitaria se realizó mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y la morfología embrionaria se evaluó en día 2, 3, 5 y 6 de desarrollo. Los embriones evolutivos y con menos de un 30% de fragmentación 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 Group, IL).

RESULTADOS: De los 1381 embriones, 55 embriones (4,0%) presentaron 6 o más de 6 células 43h post-inseminación: 15 de ellos se bloquearon en día 3 de desarrollo (27,3%) observándose diferencias significativas ($P<0,0001$) con el grupo de embriones de 2, 3 y 4 células, 27 embriones más (67,5%) bloquearon su desarrollo entre los días 5 y 6, siendo estadísticamente significativo ($P<0,0001$) con el grupo de embriones de 4 células (27,5%). En cuanto a la tasa de formación de blastocistos (18,2%) también se observaron diferencias significativas entre los embriones con 6 o más células 43 horas post-inseminación, y el resto de embriones.

Nº céls D2	Nº emb (%)	Bloq D3 (%)	Emb. OK D3 (%)	Bloq D5/6 (%)	Blastos D5/6 (%)
2	308 (22,3)	18 (5,8)*	117 (37,9)	168 (57,9)	114 (37)***
3	165 (11,9)	11 (6,7)*	101 (61,2)	80 (51,9)	73 (44,2)**
4	683 (49,5)	43 (6,3)*	583 (85,4)	176 (27,5)*	456 (66,8)*
5	123 (8,9)	25 (20,3)	94 (76,4)	50 (51,0)	61 (49,6)* \geq
6	55 (4)	15 (27,3)*	37 (67,3)	27 (67,5)*	10 (18,2)

*Test exacto de Fisher: * $P<0,0001$, ** $P<0,006$, *** $P<0,0082$.

Con respecto al estadio cromosómico, 99 embriones de los 120 analizados con 6 ó más células en día 2 (83%), presentaron anomalías cromosómicas, lo que fue estadísticamente significativo al comparar con embriones procedentes de 2, 3, 4 y 5 células en día 2 de desarrollo.

Nº céls D2	Nº emb. analizados (%)	Nº emb. anormales (%)
2	520	341 (65,6)*
3	333	222 (66,7)*
4	1897	1049 (55,3)*
5	2992	15 (71,9)**
≥ 6	120	99 (82,5)*

Test exacto de Fisher: * $P<0,001$, ** $P<0,0249$.

CONCLUSIONES: La selección de embriones rápidos 43h post-inseminación pueden corregir su ritmo de división 68h post-inseminación, sin embargo la selección de este tipo de embriones para transferencia no es recomendable debido al bajo potencial de blastulación de este tipo de embriones y a la alta incidencia de anomalías cromosómicas incompatibles con el embarazo.

BIBLIOGRAFÍA: 1. Munné S. et al. Fertility and Sterility 1995, 64(2). 2. Munné S. and Cohen J. Hum Reprod 1998, 4(6). 3. Rubio et al. Hum Reprod 2003, 18(1).

0.26.**UNIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA ZONA PELÚCIDA A ESPERMATOZOIDES HUMANOS; EFECTOS SOBRE LA EXOCITOCIS ACROSOMAL Y MOVILIDAD**

Caballero-Campo P¹, Chirinos M², González González-Pacheco ME², Reveles R², Larrea F², Gerton GL¹

¹ Center for Research on Reproduction and Women's Health, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, PA, USA.

² Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, México.

OBJETIVO: Estudiar la unión de proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana (rhZP) a espermatozoides capacitados para localizar los receptores espermáticos, y determinar su actividad sobre la exocitosis acrosomal y movilidad espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS: Las proteínas rhZP 1, 2 y 3 (según nomenclatura original) humanas se expresaron en células Sf9 empleando el sistema del baculovirus. Espermatozoides capacitados provenientes de donantes sanos fueron incubados con las diferentes rhZP purificadas y, luego de ser fijados, se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF), utilizando como anticuerpo primario suero anti-ZP y Cy3 como fluoróforo, seguido de tinción con FITC-PSA para visualizar el acrosoma. La movilidad espermática fue evaluada mediante el sistema de clasificación de movilidad progresiva (OMS, 1999) por dos observadores en forma de doble ciego. El análisis de los parámetros cinéticos se realizó mediante CASA (*Computer-Aided Sperm Analysis*).

RESULTADOS: Las rhZP 1, 2 y 3 se unieron a los espermatozoides humanos, preferentemente a células con morfología normal. Tanto la rhZP1 como la rhZP3 estimularon la exocitosis acrosomal. Las IIF sugieren que los receptores espermáticos para la rhZP tienen un patrón de localización subcelular característico para cada proteína dependiente de la exocitosis acrosomal. Los espermatozoides incubados con las rhZP mostraron una considerable disminución de la movilidad progresiva y aumento de la no progresiva. Este efecto es apreciable a los 20' de tratamiento, y es más pronunciado al incubar con rhZP1, rhZP3 o combinaciones de rhZP. Las rhZP incrementan la proporción de una subpoblación de espermatozoides con un movimiento específico, caracterizado por valores altos de velocidad curvilínea (VCL) y desplazamiento lateral de cabeza (ALH), y baja linealidad (LIN) y progresión rectilínea (STR).

CONCLUSIONES: Las proteínas de la zona pelúcida expresadas en células Sf9 son capaces de unirse al espermatozoide humano, donde rhZP1 y rhZP3 inducen la exocitosis acrosomal, y estimular cambios en el patrón de movilidad de espermatozoides capacitados. Igualmente, se acentúa la presencia de un tipo de movimiento, que consideramos, con características de post-hiperactivación y de movimiento circular no progresivo, frente al movimiento progresivo lineal predominante de los controles. Este tipo de movilidad podría contribuir a la penetración de la ZP durante la fertilización. Estos resultados junto con el estudio de los receptores espermáticos para la ZP podrían tener aplicabilidad en medicina reproductiva y en el desarrollo de nuevos anticonceptivos masculinos.

*Estudio financiado parcialmente por Fundación Tambre (España) CONRAD (EEUU) y CONACyT (Méjico).

0.27. DESCRIPCIÓN E IMPLICACIÓN DEL SISTEMA CANABINOIDE EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

E. Agirregoitia, A. Valdivia, C. Ochoa, N. Subirán, N. Agirregoitia, J. Irazusta.
Facultad de Medicina, Dpto de Fisiología, UPV/EHU. Bilbao

INTRODUCCIÓN: El sistema canabinoide endógeno se encuentra parcialmente descrito en el sistema reproductor masculino humano. Pero, especialmente, nuestro interés se centra en describir el papel de este sistema en los gametos masculinos y establecer qué papel juega en la funcionalidad espermática, para así, completar los estudios previos que existen a ese nivel.

OBJETIVO: Para ello, y como paso previo para una caracterización completa de dicho sistema, en este estudio se trata de describir la presencia de receptores canabinoides (CB1 y CB2) en espermatozoides humanos y la acción de un consumo crónico de *canabis* en la viabilidad y movilidad espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS: La muestra se recoge de donantes normozoospermicos, tras 2-3 días de abstinencia sexual, mediante masturbación. Los espermatozoides más móviles son rescatados mediante la técnica de *swim-up* y resuspendidos en medio Tyrode modificado. Estos espermatozoides son utilizados para ensayos de *immunoblotting*, inmunocitoquímica y PCR. Para observar la acción de los canabinoides exógenos en la movilidad y mortalidad espermática, se utilizaron muestras de semen fresco de 45 donantes y se observaron mediante un sistema SCA (*Sperm Class Analyzer 2002*). Los donantes se dividieron en 3 grupos de 15 individuos cada uno; grupo control (no fumadores), grupo tabaco (fumadores crónicos de tabaco) y grupo *canabis* (fumadores crónicos de cannabis).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Los resultados de las técnicas de *immunoblotting*, inmunocitoquímica y PCR dejan en evidencia la presencia de receptores CB1 y CB2 (este último, no descrito en espermatozoides humanos hasta la fecha). Con respecto a la movilidad, se observa una tendencia a la astenozoospermia en fumadores de *canabis* así como una mayor tendencia necrozoospermica en comparación con los controles no fumadores y fumadores de tabaco. Estos resultados hacen pensar en una acción de los canabinoides exógenos y por lo tanto, también de los endógenos, vía receptor. Pero ésta, es una primera aproximación en la descripción y caracterización del sistema canabinoide en el semen humano. Evidentemente, estudios posteriores realizando incubaciones con agonistas y antagonistas, demostrarán la acción de éstos, vía receptor, en funciones espermáticas esenciales para la fertilización como son la movilidad, respiración, quimiotaxis, capacitación y reacción acrosómica. De esta manera, se abre una nueva puerta en la desconocida bioquímica y fisiología del espermatozoide humano, la cual, debe traer avances en la comprensión y tratamiento más dirigido y personalizado de los problemas de fertilidad masculina.

BIBLIOGRAFÍA: Maccarrone M. et al. J Cell Sci. 2005 Oct 1;118(Pt 19):4393-404. Rossato M. et al. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Feb;90(2):984-91.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda de un proyecto de la UPV/EHU (1/UPV 00081.327-E-15869/2004). E.Agirregoitia es becario de la UPV/EHU.

0.28.**CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES OPIOIDES EN LA MEMBRANA DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

Asier Valdivia, E. Agirregoitia, C. Ochoa, J. Gil, J. Irazusta
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, UPV/EHU. Bilbao.

INTRODUCCIÓN: Muchas moléculas responsables de la comunicación intercelular, entre ellas diferentes péptidos bioactivos, están presentes tanto en el semen como en diferentes áreas de los aparatos reproductores masculino y femenino. A estos péptidos se les atribuyen funciones reguladoras, en aspectos importantes de la fisiología y el desarrollo, tales como la maduración, la capacitación, la motilidad,... de los espermatozoides. Un ejemplo de ello son los péptidos opioides. Estos péptidos han sido relacionados con la inhibición en la secreción de gonadotropinas a nivel hipotalámico. Se ha descrito la presencia de algunos de estos péptidos, como encefalinas y endorfinas, en el semen humano. De la misma manera se ha relacionado el consumo de agonistas opioides exógenos con alteraciones en diversos parámetros de la motilidad. Estas moléculas actúan a través de la unión con receptores específicos de membrana (receptores μ , δ , κ), acoplados a proteínas G. Alguno de estos receptores (los del tipo μ) ya ha sido descrito recientemente en espermatozoides de caballo.

OBJETIVO: El objetivo principal del presente estudio ha sido describir la existencia de receptores opioides en la membrana de los espermatozoides humanos. Asimismo, se realizaron estudios de los posibles efectos *in vitro* de agonistas y antagonistas opioides sobre la motilidad de los espermatozoides.

MATERIAL Y MÉTODOS: Las muestras seminales se obtuvieron a través de la Clínica Euskalduna-Bilbao. Las muestras para los ensayos se obtuvieron mediante procesos de centrifugación, ultracentrifugación, congelación y ultrasonación. La caracterización de los receptores se ha realizado mediante técnicas de PCR, *immunoblotting* e inmunocitoquímica. Para los ensayos de incubación se recuperaron los espermatozoides móviles por medio de la técnica de *swim up*, a los que tras resuspender y alicuotar en medio Tyrode modificado, se les añadían concentraciones crecientes de agonista y antagonista. Se midió la movilidad espermática de muestras repetidas de cada alicuota a diferentes tiempos de incubación, mediante un sistema SCA (*Sperm Class Analyzer 2002*), basado en microscopía de contraste de fase.

RESULTADOS: Los resultados obtenidos, demuestran por primera vez la existencia de los principales tipos receptores opioides (μ , δ , κ) en la membrana espermática humana. Además, estos receptores se localizan de manera diferenciada en determinadas zonas de la membrana. En los ensayos de incubación con agonistas y antagonistas opioides, los espermatozoides sufrían alteraciones en su motilidad.

CONCLUSIÓN: En base a estos datos, podemos concluir que los espermatozoides, en uno o varios momentos y procesos de su desarrollo y su función, están regulados mediante péptidos opioides. En concreto, la implicación de los péptidos opioides en la motilidad sugiere nuevas vías de investigación dirigidas a mejorar las posibilidades de fecundación o a la búsqueda de nuevos marcadores biológicos de la infertilidad.

BIBLIOGRAFÍA: - Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Sciorsci RL, Mari G, Calamita G, Lacandra GM, Aiudi GG, Minoia R, Dell'Aquila ME, Minoia P (2005). Expression and subcellular localization of the μ -opioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reproduction* 129: 39-49. - Fraioli F, Fabbri A, Gnessi L, Silvestroni L, Moretti C, Redi F, Isidori A (1984). Beta-endorphin, Met-enkephalin, and calcitonin in human semen: evidence for a possible role in human sperm motility. *An. NY Acad. Sci.* 438: 365-370. - Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis L (2004). Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J. Androl.* 25(5): 733-9.

Este trabajo fue realizado gracias a un proyecto de la UPV/EHU (1/UPV 00081.327-E-15869/2004) y a una beca de la Fundación Jesús Gangoiti Barrera.

0.29.

EXPRESIÓN DE ZP3 RECOMBINANTE HUMANA BIOLÓGICAMENTE ACTIVA EN CÉLULAS CHO

M. Jiménez-Movilla¹, M.J. Izquierdo Rico¹, M.A. Ramírez³, A. Gutiérrez-Adán³, J.L. Girela², M.J. Gómez-Torres², J. De Juan², M. Avilés¹, J. Ballesta¹

¹Departamento de Biología Celular, Universidad de Murcia, Murcia, ²Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante,

³Departamento de Reproducción Animal, INIA SGIT, Madrid.

INTRODUCCIÓN: La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular, que recubre el ovocito y el embrión preimplantado, involucrada en la unión del espermatozoide, la reacción acrosómica, el bloqueo de la poliespermia y la protección del embrión. Esclarecer los mecanismos íntimos implicados en estos procesos en la especie humana es complicado debido a la escasez de ZP disponible.

OBJETIVOS: Obtención de ZP3 biológicamente activa y estudio de la implicación de las cadenas N-unidas en su actividad.

METODOLOGÍA: Las células CHO fueron transfectadas con los plásmidos que contenían el cDNA total de ZP2 y ZP3 humano. Las células CHO transfectadas y células CHO sin transfectar fueron cultivadas durante 72 horas. El sobrenadante de las células CHO transfectadas con el plásmido de ZP3 humana fue tratado con la enzima N-glicosidasa F que hidroliza las cadenas glucídicas N-unidas. Las diferentes muestras fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales anti-ZP3 de mono y anti-ZP2 humana y con el anticuerpo policlonal anti-ZP de cerdo visualizándose las diferentes bandas con el método ECL. Las muestras caracterizadas de ZP3 y ZP2 recombinante humana y la digerida con N-glicosidasa F fueron incubadas con espermatozoides humanos capacitados (n=7). Diferentes controles fueron empleados como el ionóforo de calcio, el sobrenadante de las células CHO sin transfectar y la ZP2 recombinante humana. Evaluamos los espermatozoides reaccionados en los diferentes experimentos de acuerdo al patrón de fluorescencia obtenido con la lectina PSA conjugada con FITC. Los datos obtenidos fueron comparados usando el análisis de varianza ANOVA 0,05 realizada con SPSS v10.

RESULTADOS: Los anticuerpos anti-ZP3 de cerdo y anti-ZP de cerdo reconocieron específicamente una banda de 60 kDa en la muestra obtenida a partir de las células CHO transfectadas con el plásmido de ZP3 humano. La glicoproteína ZP3 recombinante humana incubada con la enzima N-glicosidasa F mostró un importante descenso en su peso molecular, de 60 kDa a 38 kDa aproximadamente. Los anticuerpos anti-ZP2 humano y anti-ZP de cerdo reconocieron específicamente dos bandas de peso molecular 110 kDa y 90 kDa en las células CHO transfectadas con ZP2 humana. No se observa ninguna banda específicamente reactiva con los anticuerpos utilizados en las muestras obtenidas procedentes de células CHO sin transfectar. La ZP3 recombinante indujo la reacción acrosómica en 72,6% de los espermatozoides humanos analizados. La ZP2 recombinante y el sobrenadante control mostraron niveles semejantes a los producidos por la reacción acrosómica espontánea. El tratamiento de la ZP3 recombinante con la enzima N-glicosidasa F no modificó el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

DISCUSIÓN: Las células CHO obtenidas en este estudio fueron capaces de sintetizar la glicoproteína ZP3 recombinante humana con un peso molecular semejante a la nativa y con capacidad de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides humanos. Se ha descrito que las cadenas N-unidas serían las responsables de inducir la reacción acrosómica en la especie porcina y bovina (Amari et al., 2001; Yonezawa et al., 2001); sin embargo, la eliminación de las cadenas N-unidas de la ZP3 recombinante no afecta el porcentaje de espermatozoides reaccionados sugiriendo que en la especie humana la proteína y/o los azúcares O-unidos serían los responsables de esta actividad.

CONCLUSIONES: La ZP3 recombinante humana expresada en células CHO induce reacción acrosómica en espermatozoides humanos; además, los oligosacáridos N-unidos no parecen participar en este proceso.

REFERENCIAS: Amari et al. (2001). Mol. Reprod. Dev. 59: 221-226. Yonezawa et al. (2001). Eur. J. Biochem. 268: 3587-94.

Estudio financiado por la DGICYT BFU2004-05568.

0.30.

ENUCLEACIÓN QUÍMICA DE OVOCITOS DE RATÓN Y DE CABRA: UNA ALTERNATIVA PARA LA PREPARACIÓN DE CITOPLASTOS RECEPTORES EN TRANSFERENCIA NUCLEAR

Costa-Borges N, Paramio MT, Santaló J, Ibáñez E.

Dept. Biología Celular, Fisiología i Immunologia, Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

INTRODUCCIÓN: La enucleación de ovocitos es un paso crucial en la clonación por transferencia nuclear. El método tradicional de enucleación física es técnicamente complejo y traumático para el ovocito. Como alternativa, los ovocitos se pueden enucleo químicamente. El tratamiento de ovocitos en metafase II (MII) con antimetabólicos (enucleación química asistida), induce la formación de una protuberancia con los cromosomas compactados, que permite su fácil localización antes de ser eliminados mecánicamente (Yin et al. 2002. Biol Reprod 67:442-446). Cuando el tratamiento antimetabólico se aplica a ovocitos pre-activados (enucleación química inducida), toda la cromatina del ovocito es expulsada en el segundo corpúsculo polar (2CP), resultando el ovocito directamente enucleado (Ibáñez et al. 2003. Biol Reprod 68:1249-1258).

OBJETIVO: El objetivo del presente trabajo es optimizar la eficiencia de la enucleación química asistida e inducida en ovocitos de ratón y cabra, usando distintos antimitóticos y tiempos de tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS: Para los experimentos de enucleación asistida se utilizaron ovocitos de ratón CD-1 y B6CBAF1, obtenidos de hembras superovuladas, y ovocitos de cabras prepúberes, obtenidos de ovarios recogidos en un matadero y madurados *in vitro* durante 27h. Los ovocitos de ratón se trataron con los antimitóticos colcemid (0,4µg/ml), nocodazol (0,3 y 1µg/ml) o vinblastina (0,1µg/ml) en KSOM durante 15, 30, 60 o 120min. Los ovocitos de cabra fueron tratados con colcemid (0,4 y 0,6µg/ml) o nocodazol (0,3 y 1µg/ml) durante 60 o 120min en KSOM con 0,05M sacarosa. En los experimentos de enucleación inducida se utilizaron ovocitos de ratón CD-1, que se activaron (7% etanol, 5min) y se trataron con colcemid (0,4µg/ml), nocodazol (0,3µg/ml), vinblastina (0,1µg/ml) o taxol (1µM) en KSOM con 10mM cloruro de estroncio durante 15, 30 o 60min. Finalizado el tratamiento, los ovocitos se cultivaron hasta las 2h post-activación en el mismo medio sin antimitóticos para completar la extrusión del 2CP (Ibáñez et al. 2005. *Reproduction* 129:27-38). Los ovocitos tratados se fijaron en MTSB-XF (30min, 37°C) y se guardaron en solución *block*. Los ovocitos de cabra fueron pre-fijados en 2% paraformaldehído (5min) antes de la incubación en MTSB-XF. En las dos especies de ovocitos se utilizó un protocolo de triple tinción para la detección simultánea de microtúbulos, microfilamentos y cromatina por microscopía de fluorescencia. Los tratamientos fueron repetidos tres veces y se analizaron unos 50 ovocitos por grupo.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN: Los resultados se compararon por X2. En los experimentos de enucleación asistida, las protuberancias formadas se clasificaron en tipo A o B según su tamaño. Los tratamientos más efectivos en ovocitos CD-1 fueron el colcemid (84%) y nocodazol 0,3µg/ml (81%) durante 30min, y la vinblastina (84%) y nocodazol 1µg/ml (80%) durante 60min. Aproximadamente un 50% de las protuberancias eran de tipo B, caracterizadas por su volumen reducido. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas de ovocitos de ratón. En los ovocitos de cabra, el nocodazol 1µg/ml 60min (92,5%) y el colcemid 0,6µg/ml 120min (91,1%) fueron los más eficaces, y aproximadamente el 80% de las protuberancias fueron de tipo B. En los experimentos de enucleación inducida, las tasas máximas de ovocitos enucleados fueron logradas con los tratamientos más cortos (15min) en vinblastina, nocodazol y colcemid, con porcentajes del 40,4%, 35% y 19,5%, respectivamente. Estos resultados indican que tanto el colcemid, como la vinblastina y el nocodazol, pueden ser utilizados con éxito en protocolos de enucleación química, siempre que se ajusten la concentración y el tiempo de tratamiento a la especie de ovocitos con la que se trabaja. Las tasas de formación de protuberancias y de ovocitos enucleados obtenidas demuestran que estos protocolos representan una alternativa real al método tradicional de enucleación física.

Este trabajo ha sido financiado por la UAB (Proyecto para Grupos Emergentes, EME2004-24).

0.31.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA INSULINA Y SU RECEPTOR EN OOCITOS Y EMBRIONES PREIMPLANTATORIOS HUMANOS

M. Martínez Burgos¹; C. Hernández-Sánchez²; F. de Pablo²; ER. Hernández¹. ¹Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología "FIV Madrid". Madrid.

²Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

OBJETIVOS: Existen evidencias de que la insulina materna es necesaria para facilitar la maduración del oocito humano. Sin embargo, desconocemos si existe expresión endógena del gen de la insulina en el oocito y cómo es su transcripción en los primeros estadios de división embrionaria. Para ello se realizó un estudio preliminar de la expresión endógena de insulina y su receptor en oocitos y embriones preimplantatorios humanos no viables.

MÉTODOS: Se analizaron un total de 50 oocitos y embriones humanos no viables entre los días 2 al 6 de desarrollo *in vitro*. Las muestras se procesaron individualmente para la extracción de RNA. Todo el RNA obtenido se sometió a transcripción reversa (RT) seguida de PCR para insulina, receptor de insulina o actina, éste último como gen control. Para la RT se utilizó la enzima Superscript III y oligo dT, ambos de Invitrogen; para la PCR se utilizó la *Expand High Fidelity* de Roche. Generalmente, se realizó una primera PCR de 35 ciclos seguida de otra PCR semi-anidada de 35 ciclos. El bajo rendimiento en la obtención de RNA así como la baja expresión de algunos de los genes estudiados supusieron que las muestras analizadas quedaran al límite de detección de la técnica empleada e incluso algunas por debajo. Asimismo, se encontró heterogeneidad en los niveles de expresión.

RESULTADOS: El gen de la insulina se expresa tanto en oocitos como en embriones hasta el estadio de mórula. Sin embargo, en estadio de blastocisto no se detectó expresión de insulina en ningún caso analizado, aunque se observó expresión del gen de actina. Por el contrario, el gen del receptor de insulina se expresa en todos los estadios analizados.

CONCLUSIÓN: Estos resultados preliminares indican una expresión constante del gen del receptor de insulina, mientras que la expresión del gen de la insulina solo aparece en estadios previos a blastocisto, sugiriendo que este RNA podría ser de origen materno.

0.32.

¿ES POSIBLE SELECCIONAR EL MEJOR ESPERMATOZOIDE?

Sánchez M.^{1,2}, Arán B.², Blanco J.¹, Vidal F.¹, Veiga A.², Barri PN.V, Huszar G.²

¹Unidad de Biología Celular, Universidad Autónoma de Barcelona

²Servicio de Medicina de la Reproducción Instituto Universitario Dexeus, Barcelona

³Sperm Physiology Laboratory, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA.

INTRODUCCIÓN: En los espermatozoides maduros normales la proteína chaperona HspA2 actúa como componente del complejo sinaptonémico (Huszar G. y cols., 2003) y facilita la remodelación de la membrana citoplasmática durante la espermiogénesis. Esto último permite la exposición al exterior de receptores para ácido hialurónico (AH). Por el contrario, en los espermatozoides inmaduros, una disminución de la expresión de esta proteína se correlaciona con un incremento en la frecuencia de aneuploidías y poliploidía (debido a errores meióticos) (Huszar G. y cols., 2000) y daño en la integridad del DNA (a causa de retenciones citoplasmáticas). Estudios previos (Cayli S. et al., 2003) muestran que los espermatozoides seleccionados mediante AH: a) no presentan retención citoplasmática, b) conservan una mayor integridad del DNA y c) mantienen una tasa de disomía y diploidía significativamente menor. El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la selección de espermatozoides por AH en los resultados de los ciclos de ICSI, así como evaluar las características citogenéticas de los espermatozoides previa y posteriormente a la selección por AH.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se analizaron los resultados obtenidos en 18 parejas sometidas a ciclos de tratamiento con ICSI. Las parejas seleccionadas presentaban alteraciones en los parámetros seminales y edad de la mujer inferior a 37 años. Las muestras de semen fueron sometidas a un proceso de selección por AH previo a ICSI. Se compararon las tasas de fecundación, embarazo, implantación, aborto y niño vivo en casa con una población control de pacientes de ICSI en los que no se llevó a cabo la selección de espermatozoides por AH.

Las muestras de semen de dos parejas incluidas en el estudio de selección por AH fueron fijadas con una solución de paraformaldehído 4% en PBS (PH = 7,4) (Sánchez M., y cols., 2003) y posteriormente se aplicó una FISH triple utilizando sondas de DNA repetitivo para los cromosomas 18 (CEP 18, 18p11.1-q11.1 alpha satellite D18Z1, Spectrum Aqua; Vysis Inc.), X (CEP X, Xp11.1-q11.1 alpha satellite DXZ1, Spectrum Green; Vysis Inc.) y Y (CEP Y, Yp11.1-q11.1 alpha satellite DYZ3, Spectrum Orange; Vysis Inc.). En ambos casos la FISH se aplicó sobre la muestra de semen inicial procesada para ICSI y sobre espermatozoides unidos al AH. En cada caso se analizó la presencia de disomía y diploidía. Los datos fueron analizados mediante el test de chi-cuadrado (SigmaStat 3.1).

RESULTADOS: Los resultados obtenidos en los ciclos de ICSI con selección espermática por AH muestran tasas similares de fecundación (67%), embarazo por ciclo (33%), implantación (22.6%) y niño vivo en casa (39%) a las observadas en el grupo control. No se observó ningún aborto en el grupo de selección por AH. Los resultados de FISH en espermatozoides mostraron que, en comparación con la muestra inicial los espermatozoides unidos al AH presentaban unas tasas más bajas de diploidía (0.30%), disomías para los cromosomas sexuales (0.61%) y disomía 18 (0%). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido al tamaño de la muestra.

CONCLUSIONES: Los resultados preliminares obtenidos no muestran diferencias significativas en las tasas de fecundación, embarazo, implantación y niño vivo en casa en el grupo de selección espermática por AH en comparación con el grupo control. No se observó ningún aborto en el grupo de pacientes en el que se aplicó la selección de espermatozoides por AH. Estos resultados sugieren que en un estudio más amplio se podría observar una mejora significativa de la tasa de niño vivo en casa. Por otro lado, los espermatozoides seleccionados por AH presentan tasas de diploidía y disomía más bajas, confirmando los estudios previos del grupo de Yale (Cayli S., y cols., 2003). A pesar de la necesidad de ampliar el número de muestras, consideramos que la selección espermática con AH podría ser una metodología eficiente para optimizar los resultados de los ciclos de ICSI.

PALABRAS CLAVE: Ácido Hialurónico, espermatozoides, FISH, ICSI.

REFERENCIAS: Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *RBM Online* 2003; vol 7. No 4. 462-468. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isof orm in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 2000; 63(3):925-932. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3:1616-24. Sánchez M, Arán B, Blanco J, Barri PN, Egozcue J, Veiga A, Vidal F. Hibridación In Situ Fluorescente (FISH) en espermatozoides mediante el uso de una nueva metodología de fijación con paraformaldehído. *ASEBIR* 2003; vol 8. No 2: 73.



Somos los primeros
en conocerte ...

www.centromedicinaembrionaria.com

SERVICIOS

Servicio de diagnóstico genético preimplantacional

Estudio de aneuploidías
Estudio de reorganizaciones cromosómicas
Estudio de enfermedades monogénicas
Formación en las técnicas de biopsia y fijación

Servicio de Diagnóstico Genético Preimplantacional

Dra. Esther Velilla García
Dra. María Oter Renom
Dra. Mercedes García Bermúdez

Servicio de biopsia testicular y estudio de meiosis

Realización de la biopsia testicular
Asesoramiento sobre la técnica de biopsia testicular
Valoración y asesoría de los resultados del estudio de meiosis

Servicio de Andrología

Dr. Ferran García José
Dra. Susana Egozcue Vilarasau

FISH en espermatozoides

Consejo genético

Álvarez de Baena, 4 · 28006 Madrid · Tf. 91 4115080
Fax 91 411 50 81 · dgpi@centromedicinaembrionaria.com



centro de medicina
embrionaria

www.centromedicinaembrionaria.com

... y sabemos que
crecerás sano



P. 01. RIESGO DE EMBARAZOS GEMELARES EN EL PROGRAMA DE CRIOPRESERVACIÓN ¿ES ACONSEJABLE CONGELAR UN EMBRIÓN POR PAJUELA?

M. Martínez Burgos; M. Sánchez de Burgos; L. Andrés Criado; E. Ricciarelli; ER. Hernández, JM. Cuadros
Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología "FIV Madrid". Madrid.

Tipo: **Criopreservación**

OBJETIVOS: Una de las preocupaciones actuales en Reproducción Asistida es evitar los embarazos múltiples, por lo que cada vez más se busca establecer un buen protocolo para realizar transferencias electivas de un embrión (eSET). Dentro de esta tendencia, algunos grupos plantean también la posibilidad de un cambio en el protocolo de criopreservación, orientado hacia la congelación/descongelación de un único embrión por ciclo de criotransferencia, con el mismo objetivo de evitar los embarazos múltiples. En nuestro centro, con una tasa de embarazo en fresco de 49,1% y una tasa de embarazo gemelar de 31,5%, con una media de embriones transferidos de 2,1, nos propusimos determinar la incidencia de embarazos gemelares en nuestro programa de criopreservación, teniendo en cuenta que nuestra tendencia es a congelar hasta tres embriones por pajueta.

MÉTODOS: Estudio retrospectivo sobre un total de 144 ciclos de descongelación embrionaria, con 133 criotransferencias realizadas durante el periodo comprendido entre Enero de 2004 y Junio de 2005. Se congelaron una media de 2,8 embriones por pajueta. Los embriones fueron transferidos al día siguiente de la descongelación.

RESULTADOS: Se descongelaron 404 embriones de los que sobrevivieron 312 (77,2%). La media de embriones transferidos fue de 2,4. La tasa de embarazo clínico fue de 33,8% (45/133) y la tasa de embarazos múltiples fue de 11,1% (5/45), todos ellos gemelares. La tasa de implantación fue de 16,3% (51/312).

CONCLUSIÓN: Nuestros resultados desaconsejarían la congelación de un embrión por pajueta, ya que, en nuestro caso, la congelación de una media de 2,8 embriones por ciclo permite obtener tasas de embarazo elevadas y una tasa baja de embarazos gemelares, evitando someter a los pacientes a ciclos repetidos de descongelación.

P. 02. EN PACIENTES DE EDAD AVANZADA SE CONSIGUEN BUENAS TASAS DE GESTACIÓN SIN NECESIDAD DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL NI RECEPCIÓN DE OVOCITOS

F. Prados, N. Ortiz-Piñate, G. Pérez-Bermejo, F. Gallego-Terris, C. Hernández, A. Rubio, O. Collado, I. Bruna
Unidad de Reproducción. Hospital de Madrid- Montepíncipe.

Tipo: **Criopreservación**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS: El desarrollo experimentado por el Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGD) y la estandarización de los ciclos de Donación de ovocitos (Ovodón), han llevado a muchos centros a proponer la aplicación de estas técnicas a los casos de mujeres de más de 37 años para tratar de alcanzar una tasa de gestación superior disminuyendo el riesgo de aborto. Sin embargo, los pacientes sienten un fuerte deseo de conseguir un embarazo con sus propios gametos, y, frecuentemente, el considerable incremento en el precio del ciclo que supone el DGP les hace sentirse remisos para aceptar la aplicación de esta técnica. El objetivo de este trabajo es mostrar nuestros resultados en pacientes de más de 37 años utilizando FIV con ovocitos propios y sin seleccionar los embriones cromosómicamente normales mediante DGP.

MATERIALES Y MÉTODOS: Análisis estadístico retrospectivo de todos los casos de FIV sin Ovodón en pacientes de más de 37 años entre el 01/01/2001 y el 30/04/2005.

RESULTADOS: Se llevaron a cabo 176 punciones ováricas a mujeres de >37 años durante el periodo mencionado. Se transfirieron 348 embriones en fresco en 155 transferencias. Un 17,8% de los embriones implantaron (latido cardíaco fetal) en 50 gestaciones clínicas (32,3%). La tasa de aborto fue del 10% (5/50). Actualmente han llegado a término con niños nacidos sanos o llevan más de 26 semanas de gestación un total de 45 embarazos, es decir, un 29,0% de las transferencias en fresco. En mayores de 39 años obtuvimos un 23,4% de gestaciones evolutivas por transferencia (18/77) y una tasa de implantación del 12,8% (23/179). En 40 de las anteriores punciones se criopreservaron 141 embriones después de la transferencia. Hasta Agosto de 2005 se han realizado 26 transferencias de embriones congelados procedentes de estos casos que han dado lugar a 4 gestaciones evolutivas. Las 40 transferencias en fresco dieron lugar a 16 gestaciones evolutivas, que, sumadas a las 4 de descongelados dan un 50% de gestación evolutiva por punción. Todavía permanecen 51 embriones congelados de este grupo de pacientes. La tasa de aborto tras la observación de latido cardíaco fetal fue del 5,0%. El mismo cálculo aplicado a pacientes mayores de 39 años da un total de 7 gestaciones evolutivas (ningún aborto) de 15 punciones, es decir, un 46,7%.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Podemos ofrecer a las pacientes mayores de 37 años, o incluso mayores de 39, unas posibilidades de gestación evolutiva muy razonables mediante FIV con ovocitos propios. No creemos que la realización sistemática de DGP por razón de edad a las pacientes mayores de 37 años hubiera aumentado nuestro 50% de gestaciones evolutivas ni disminuido nuestro 5% de aborto. Algo similar se puede inferir sobre los ciclos en pacientes mayores de 39 años, aunque la muestra es reducida. Por lo tanto, en pacientes con edad superior a 37 años en que el número de embriones de calidad morfológica aceptable es superior a los necesarios para la transferencia, la mejor alternativa parece ser: Transferir los de mejor morfología en fresco y congelar los restantes para su posterior transferencia en ciclos de embriones congelados.

P. 03.**¿MEJORAN LAS TASAS DE GESTACIÓN POR TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CRIOPRESERVADOS SIENDO RESTRICTIVOS AL SELECCIONAR LOS EMBRIONES PARA CONGELAR?**

F. Prados, N. Ortiz-Piñate, G. Pérez-Bermejo, F. Gallego-Terris, C. Hernández, A. Rubio, O. Collado, I. Bruna
Unidad de Reproducción. Hospital de Madrid-Montepríncipe.

Tipo: **Criopreservación**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS: Para conseguir una buena Tasa de gestación (TG) en transferencias de embriones congelados (TEC), además de todo lo necesario para una buena TG en fresco, es imprescindible una adecuada técnica de congelación y descongelación: Utilizar medios de congelación de buena calidad, un congelador adecuado y un proceso cuidadoso. Dentro de: "lo necesario para una buena TG en fresco" se encuentra la calidad intrínseca de los embriones. Podemos aumentar la calidad intrínseca de los embriones congelados siendo restrictivos al seleccionar embriones para criopreservar. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de una estrategia restrictiva sobre el programa de congelación embrionaria de nuestro centro.

MATERIALES Y MÉTODOS: Analizamos retrospectivamente 164 TEC anteriores al 20/08/2005 en nuestro centro. Los embriones procedían de 256 congelaciones realizadas a partir de las 711 extracciones de ovocitos homólogos llevadas a cabo en nuestro centro entre el 01/01/2001 y el 30/04/2005. La muestra se dividió en 2 grupos. El Grupo I comprende las descongelaciones de embriones procedentes de punciones realizadas antes del 01/01/2004. Durante este periodo se congelaban todos los embriones supernumerarios que no eran de pésima calidad. A partir de principios del año 2004, empezamos a exigir mejor calidad para considerar la congelación de un embrión (Grupo II).

RESULTADOS: En el Grupo I se congeló el 57,0% de los 1062 embriones (2PN) obtenidos en 150 punciones. En el Grupo II se congeló el 41,5% de los 844 embriones generados en 106 punciones. 356 y 209 embriones se descongelaron en 115 y 73 ciclos de descongelación en los grupos I y II respectivamente. En las 25 gestaciones evolutivas (24,5%) obtenidas tras 102 TEC del Grupo I implantó un 15,7% de los 210 embriones transferidos. En el Grupo II, la TG evolutiva fue del 34,4% (22/64) y la Tasa de implantación fue del 26,0% (33/127). La diferencia en Tasa de implantación entre ambos grupos fue estadísticamente significativa. Las Transferencias en fresco rindieron 68 y 41 gestaciones evolutivas en los grupos I y II. Por tanto, en el Grupo I, la TG evolutiva acumulada por punción fue del 62,0% y alcanzó un 59,4% en el Grupo II. Fue necesario descongelar 14,2 embriones del Grupo I y 9,5 del Grupo II por cada gestación evolutiva. Extrapolando estos datos a los embriones restantes sin descongelar obtenemos una TG evolutiva acumulada por punción de 73,7% para el Grupo I y del 73,4% para el II

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: El Grupo II muestra mayor TG evolutiva por TEC y significativamente mayor Tasa de implantación que el Grupo I. Sin embargo, la TG evolutiva acumulada por punción es ligeramente inferior en el Grupo II que en el I. Si asumimos que los embriones que restan por descongelar van a producir una tasa de embarazos similar a la de los ya descongelados, la TG evolutiva acumulada final por punción se equilibra en ambos grupos. En conclusión, ser más restrictivos con la criopreservación embrionaria mantiene íntegras las posibilidades de gestación evolutiva por punción reduciendo el número de transferencias por paciente.

P. 04.**INFLUENCIA DE DISTINTOS TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO A 4°C EN LOS PARÁMETROS SEMINALES TRAS LA DESCONGELACIÓN (Estudio preliminar)**

MJ. López-Rubira, M. Iglesias, L. Peralta, M. Graña.
ZYGOS, Centro Gallego de Reproducción, Santiago de Compostela.

Tipo: **Criopreservación**

OBJETIVO: Comprobar como afecta el tiempo de enfriamiento a 4°C, previo a la criopreservación, en los parámetros seminales tras la descongelación
Material: Se estudian doce muestras de semen no seleccionadas.

MÉTODOS: 1. Valoración en fresco: Recuento, motilidad (A, B, C), y viabilidad 2. Congelación de semen Se divide el volumen seminal en cuatro alícuotas de 0,5ml. Añadimos el mismo volumen de crioprotector (Sperm Cryoprotect) que de muestra, gota a gota -Enfriamiento lento Las muestras se mantienen en la nevera durante distintos tiempos: MUESTRA TIEMPO EN NEVERA (4°C) 1 15 minutos 2 30 minutos 3 45 minutos 4 60 minutos -Criopreservación (en píldoras) 3. Descongelación de semen. Las muestras se descongelan al baño maría a 37°C durante 10 minutos. Se observa el recuento, la motilidad total, y la viabilidad de cada uno de los tubos que se congelaron durante distintos tiempos en la nevera de la misma manera que el fresco.

RESULTADOS: Viabilidad total (%) Fresco 15' 30' 45' 60' 63,54 43,54 49 54,81 51,36 REM total (recuento de espermatozoides móviles) Fresco 15' 30' 45' 60' 23,33 5,03 5,71 6,46 5,05 Muestras Normozoospermicas Viabilidad (%) Fresco 15' 30' 45' 60' 66,83 46,33 51,66 58 54,66 REM Fresco 15' 30' 45' 60' 25,13 6,05 7,21 7,51 6,97 Muestras Astenozoospermicas leves(30-45% A+B) Viabilidad (%) Fresco 15' 30' 45' 60' 57,33 36,66 46,33 50,66 48 REM Fresco 15' 30' 45' 60' 15,33 3,64 3,26 3,88 2,93

CONCLUSIONES: -Con el enfriamiento lento durante 45 minutos a 4°C fue con el que obtuvimos mejores resultados de descongelación para todas las muestras estudiadas. - El REM también es mayor en las muestras enfriadas durante 45 minutos -Las muestras que se mantienen a 4°C durante 15 o 60 minutos se ven más afectadas tras la descongelación.

BIBLIOGRAFÍA: McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J, Foote RH Asian J The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. Androl. 2002 Jun;4(2):137-41.. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity Fertility and Sterility - November 2001 (Vol. 76, Issue 5, Pages 892-900).

P. 05. TASAS DE EMBARAZO EN TRANSFERENCIAS DE DESCONGELADOS CON Y SIN HATCHING

B. Migueles, M. Hebles, M. González, F. Sánchez, P. Sánchez, JA. Lara, M. Meyer.

Tipo: **Criopreservación**

OBJETIVO: Comparar las tasas de embarazo en transferencias de descongelados tras la realización ó no de *hatching*.

MATERIAL Y MÉTODO: Se analizaron un total de 556 transferencias en casos no seleccionados, en las que se practicó *hatching* en 287 casos y no en 269 de ellos. Se observaron diferencias en las tasas de embarazo entre ambos grupos.

CONCLUSIÓN: El uso del *hatching* como técnica rutinaria en transferencias de descongelados sí produce un aumento en la tasa de embarazo, que es mayor en aquellas transferencias en las que los embriones no son de buena calidad.

BIBLIOGRAFÍA: 1 Cohen J, Elsner C, Kort H, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. Hum Reprod 1990;5:7. 2 Cohen J, Assisted hatching of human embryos. J In Vitro Fert Embryo Transfer 1991; 8:179. 3 Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N. Evaluation and treatment of low responders in assisted Reproductive Technology: A Challenger to meet. J Assist Reprod Genet 2000; 17:357-73.

P. 06. RECURSOS FÍSICOS DE LOS LABORATORIOS DE FIV NACIONALES. ENCUESTA ASEBIR

C. González-Varea, A. Garrido, M. Sánchez, C. Fernández, R. Martínez, M. Hernández, V. Maldonado, J. Fontes, JA. Castilla.
Unidad de Reproducción, H.U. Virgen de las Nieves, Granada.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

OBJETIVOS: Conocer la situación de los recursos físicos de los laboratorios de Reproducción Asistida en los laboratorios nacionales.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se diseñó una encuesta no anónima con veintiocho preguntas que versaban sobre actividad, recursos técnicos y espacios físicos dirigidos a los centros de carácter público y privados españoles que hacen FIV. La encuesta se publicó en la revista y en la página web de ASEBIR. A las variables cualitativas se les hizo un análisis estadístico básico obteniendo los porcentajes de cada categoría analizada; las variables de tipo cuantitativo fueron analizadas con estadística descriptiva (media, mediana, mínimo y máximo).

RESULTADOS: De los centros españoles, contestaron a la encuesta 21 laboratorios, lo que supone un 16% de tasa de respuesta del total; de los cuales, el 23,8% tienen exclusivamente prestación pública y el resto, el 76,2% son de prestación privada; lo que se aproxima al porcentaje de Centros públicos / centros privados real en nuestro país (20% vs 80%). Los datos recogidos son de los ciclos realizados en el año 2003. De los laboratorios participantes, el 80-90% poseen un sistema de filtrado de aire para la incubadora, tienen un generador de energía de emergencia y usan pipetas automáticas. El 81% de los centros poseen un área diferenciada para el laboratorio de andrología del laboratorio de FIV/ICSI. El 76,5% están próximos al lugar donde se realiza la recuperación de ovocitos. Y aproximadamente el 72% tenían zonas específicas de obtención y recepción de las muestras de semen. El 66% de los centros realizan un almacenamiento de semen y embriones en contenedores independientes. También este porcentaje de laboratorios posee un sistema de válvulas intercambiables de las bombonas de gas que reciben las incubadoras. Y el 60% posee un sistema de filtrado de aire del laboratorio de FIV independiente. Los centros con pH-metro son el 43%. Y el 33% pipetea con la boca. El 23% de los centros posee contenedores de nitrógeno líquido exclusivos para semen en cuarentena. De los 7 laboratorios (33%) que atienden a pacientes con enfermedades infecciosas transmisibles, 5 tienen contenedores independientes para estos pacientes. El número medio de ciclos de FIV/ICSI por incubador de CO2 fue 158, por equipo de micromanipulación 274 ciclos y por cabina de flujo laminar fue 233.

CONCLUSIÓN: Podemos resaltar la alta variación en el grado de cumplimiento de las recomendaciones de las diferentes sociedades científicas respecto a los recursos físicos de los laboratorios de Reproducción Asistida nacionales.

P. 07.**OBTENCIÓN DEL CERTIFICADO ISO-9001 EN NUESTRO LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA**

E. Ferrer, M. Vila, C. Calatayud, M. Ruiz. CREA, Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia.

Tipo: El laboratorio de embriología

INTRODUCCIÓN: La evaluación de la calidad y el establecimiento de métodos para mejorarla es algo habitual en cualquier empresa y también debería serlo para un centro de reproducción asistida. De hecho, garantizar la calidad, es uno de los aspectos básicos de un laboratorio de reproducción asistida. Sin embargo, con frecuencia se intenta valorar la calidad en reproducción asistida atendiendo solo a las tasas de embarazo, mientras que otros aspectos, como la reproducibilidad de los métodos y sobre todo, la satisfacción de los pacientes, no son tenidos en cuenta. Además de los controles internos y externos propios de un laboratorio, el sistema ISO 9001 es un estándar internacional que aporta un paso más para valorar la calidad del laboratorio de embriología, asegurar la reproducibilidad de los métodos, ofrecer buenos resultados en cuanto a tasas de embarazo y conseguir la satisfacción de los pacientes.

OBJETIVO: El objetivo de nuestro centro fue solicitar el certificado internacional ISO 9001 para garantizar la calidad asistencial de nuestro laboratorio de embriología.

METODOLOGÍA: Para optar a obtener el certificado ISO 9001 aplicamos los siguientes métodos: 1. A nivel clínico, para conseguir la satisfacción de los pacientes; Estudio adecuado de la pareja e información clara y comprensible del tratamiento que se va a realizar. 2. A nivel del laboratorio de embriología, para conseguir la reproducibilidad de los métodos y buenos resultados en cuanto a tasa de embarazo: a. Manuales de calidad: sobre procesos, rutinas, métodos, normas de seguridad y de higiene. Inventario, calibración y mantenimiento de los equipos. Estrategias de resolución de problemas que garanticen la continuidad de los procedimientos en casos de fallo de alguno de los sistemas del laboratorio. b. Registros periódicos: controles diarios y regulares de las mediciones ambientales y de aparataje. Actividad diaria e incidencias. Controles de calidad internos y externos. 3. Revisión regular de los Indicadores de Calidad: a. Tasas de Fecundación, Calidad Embrionaria, Gestación etc. b. Valoración de la Satisfacción de los Pacientes mediante Encuestas. Las Auditorias periódicas, tanto internas como externas garantizan el mantenimiento de todo el sistema de calidad. En estas auditorias se tiene también en cuenta que todos los aspectos legales (procedimientos, consentimientos ...) y de seguridad médica (estudio previo...) , son aplicados por el centro.

DISCUSIÓN: La ISO 9001 aporta unos estándares de calidad que aplicándolos en el laboratorio de reproducción asistida, nos obliga a un trabajo continuo de revisión, evaluación y mejora de todos los aspectos del tratamiento de infertilidad. La calidad de un centro de reproducción asistida no se debe limitar a intentar conseguir los mejores resultados en el laboratorio, sino que debe tener también en cuenta la satisfacción de los pacientes; "unos pacientes satisfechos son aquellos que entienden su condición y tratamiento, que sienten que se les ha ofrecido el mejor consejo y que el tratamiento indicado se está realizando con el mejor servicio y supervisión posible" (Alper y col. 2003).

P. 08.**INFLUENCIA DEL INCUBADOR (HERAEUS HERACELL VS LABOTECT C-200) EN LAS TASAS DE ÉXITO EN UN PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

M. de la Orden, G. Pérez-Bermejo, E. Cerdá, E. Burdeos, I. Peinado, JM. Rubio, A. Romeu. Servicio de Ginecología (Reproducción Humana) Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Tipo: El laboratorio de embriología

INTRODUCCIÓN: El incubador es una parte importante en la producción *in vitro* de embriones, en consecuencia, en este estudio se pretende estudiar la influencia de dos modelos de incubador (Heraeus Heracell vs Labotect C200) y su repercusión en la tasa de gestación de pacientes incluidas en un programa de fecundación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS: se analizaron un total de 422 ciclos consecutivos entre Enero a Julio de 2005 en el Hospital Universitario La Fe de Valencia. Se comparó el tipo de incubador seleccionado para el cultivo *in vitro*, la calidad embrionaria, el número de embriones transferidos y la tasa de gestación obtenida (saco con latido cardíaco positivo). Los incubadores mencionados se testan de rutina 3 veces por semana. Los modelos estudiados se diferencian básicamente: Heraeus Heracell (Inc 2 y 3) dispone de una única puerta y hay que rellenar habitualmente el agua del incubador para mantener la humedad, por el contrario, Labotect C200 (Inc 4, 5, 6 y 7) dispone de 6 puertas independientes y depósito de agua externo, no necesita reponer el agua.

RESULTADOS: Se obtuvo un 33% de gestación global. El análisis estadístico (ji-cuadrado *P*-valor 0,05) no revela diferencias significativas en la TG entre los modelos de incubador estudiados (tabla 1).

Tabla 1	global	INC 2 y 3	(73)INC 4, 5, 6 y 7 (349)
% gestación	33%	33%	34%
% gesta d+2	32%	31%	29%
% gesta d+3	33%	27%	35%

El análisis de los porcentajes de transferencias por incubador en función de la calidad embrionaria (transferencia de ≥ 1 embrión en d+2 de 4c g 1-2 y d+3 $\geq 7c$ g 1-2 o ningún embrión de dichas características) se detalla en la tabla 2.

Tabla 2	INC 2 y 3	INC 4, 5, 6 y 7
embriones buenos (33%)	29	30 \geq
1 embrión bueno (67%)	71	70

CONCLUSIONES: Atendiendo a los resultados obtenidos no se aprecian diferencias entre los incubadores con respecto a la tasa de gestación y la calidad embrionaria. Por lo tanto, la apertura completa de la puerta interna del incubador no influye en los parámetros estudiados siempre y cuando realicemos un buen mantenimiento de los incubadores (medida de CO₂ y temperatura).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Cooke S, Tyler JP, Driscoll G. Objective assessments of temperature maintenance using *in vitro* culture techniques. J Assist Reprod Genet. 2002. 19(8): 368-75. Avery B, Greve T. Impact of incubator type on the yield of *in vitro* produced bovine blastocysts. Acta Vet Scand. 1992. 33(4):341-8.

P. 09. DESARROLLO Y APLICACIÓN DE LA NORMA UNE-EN-ISO 9001: 2000 EN UNA UNIDAD DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

S. Pedrero, L. Gutiérrez, S. Corchado, L. Gasca, A. Estrade, J. Bachiller, C. Campos, H. Bebek.
Policlínica San Mauricio, Jerez de la Frontera.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

INTRODUCCIÓN: Un sistema de calidad nos ha permitido que todo el personal que forma parte del Laboratorio de FIV conozca el conjunto de responsabilidades, procesos, procedimientos y recursos asignados para asegurar y gestionar la Calidad. Hemos valorado en este trabajo como ha afectado esta norma al control diario de la temperatura y el CO₂ en el Laboratorio de Fecundación *In Vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se incorporó un equipo de medida externo, InControl, una herramienta que nos permite medir el CO₂ y la Temperatura de forma externa. Para valorar estos datos se creó el procedimiento "Control de Equipos" y la Instrucción Técnica "Verificación Interna de Termómetros". Desde Enero de 2005 se realizaron 60 mediciones del CO₂ y la temperatura con el InControl en los dos incubadores. Estos valores se comparan con los parámetros que nos indican los *leds* de los incubadores.

RESULTADOS: Del total de las 60 mediciones realizadas, las diferencias entre lo que nos indicaba el InControl y lo que marcaban los *leds* de los incubadores fueron las siguientes: · Incubador A: 0,55 en el valor del CO₂ y 0,56 en el valor de la temperatura · Incubador B: 0,16 en el valor del CO₂ y 0,71 en el valor de la temperatura

CONCLUSIONES: El conocer las posibles variaciones de CO₂ y temperatura en los incubadores nos ha permitido controlar y corregir de una manera eficiente estos valores, y así de este modo evitar el tan consabido error que provoca las mediciones realizadas por los propios incubadores. Esto ha sido posible por que la norma ISO 9001:2000 exige la verificación de todos los parámetros medibles del laboratorio. Palabras clave Control de calidad, CO₂, Temperatura, Incubador

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Alper M., Brinsden PR., Fischer R and Wikland N. Is your IVF program good? Hum Reprod 2002; 17, 8-10. Expósito A., Mendoza R., Corcóstequi B., Matorras R., Rodríguez-Escudero F. J. Acreditación y Certificación en Laboratorios de Reproducción Asistida. Asebir 2003 Garris GJ., Chin AJ., Dolan PM., Nagler HN., Vasquez-Leving M et al. Analysis of factors contributing to success in a program of micromanipulation-assisted fertilization. Fertil Steril 1993; 59: 366-74. Gianaroli L., Plachot M., Van Kooij R., Al-Hasani S., Dawson K., DeVos A. et al. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Hum Reprod 2000; 15:2241-6. Huisman W. Quality system in the medical laboratory: the role of a quality manual. Ann Biol Clin (Paris) 1994; 52: 457-61. Johnson JE., Boone WR., Lee ST., Blackhurst DW. Using Fyrite to monitor incubator carbon dioxide levels. J Assist Reprod Genet. 1995; 12: 113-7. Nunez-Calonge R., Cortes S., Izquierdo M., Peramo B., Gonzalez-Viejo L., Agustín S., Gago M., Ovejero E., Caballero P. Overall quality improvement of an IVF centre: usefulness of a Quality System in Reproduction. International Congress Series, , September 2004, Volume 1271: Pages 128-31.

P. 10. PAPEL DEL EMBRIÓLOGO EN EL BANCO DE LÍNEAS CELULARES DE ANDALUCÍA (NODO CENTRAL BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES)

JL. Cortés, A. Nieto, F. Cobo, R. Montes, C. Cabrera, P. Catalina, A. Barnie, A. Barroso, A. Concha.
Banco de Líneas Celulares de Andalucía, Granada.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

Con la promulgación de la Ley 45/2003, de 21 de Noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida, se crea el Centro Nacional de Transplantes y Medicina Regenerativa. Dentro de este Centro se sitúa el Banco Nacional de Líneas Celulares, cuyas funciones son la elaboración, el almacenamiento, la conservación y gestión de líneas celulares de diverso tipo, de acuerdo con las normas y estándares que determine la legislación nacional e internacional. Dentro de los tipos de líneas celulares se encuentran las de origen embrionario, obtenidas a partir de la masa celular interna de los blastocistos. Para poder definir aspectos en cuanto a gestión y recursos humanos, sobre todo en el aspecto referente a embriología, no en el sentido de disciplina anatómica clásica, sino en el de capacitación y experiencia en manejo de embriones humanos, así como manipulación de las células procedentes de los mismos, debemos buscar las "homologías" con los Centros de Reproducción Asistida. Dichos Centros poseen amplia experiencia en este campo y cuentan con numerosas recomendaciones internacionales que detallan la necesidad de un embriólogo entre su personal cualificado. De igual manera, estas recomendaciones podrían hacerse extensibles a los Laboratorios donde se vayan a derivar células troncales humanas a partir de preembriones, donde vemos necesaria la participación de un embriólogo, con capacitación en técnicas de manipulación embrionaria, que en la actualidad sólo recae en profesionales procedentes de Unidades de Reproducción Asistida. Independientemente de que en un futuro, cuando la ley lo apruebe, la cartera de servicios del Banco de Líneas Celulares de Andalucía (BLCA) se amplíe incorporando diferentes técnicas como pueden ser las de transferencia nuclear, entre otras, las funciones del embriólogo en un Banco de Líneas Celulares serían: - Clasificación y selección de preembriones: o Ritmo de división de las blastómeras o Apariencia del citoplasma de las blastómeras o Contacto entre las blastómeras o Aspecto de la zona pelúcida o Fragmentación de las blastómeras o Multinucleación de las blastómeras - Cultivo de células embrionarias. - Crioconservación de preembriones. - Evolución de los preembriones hasta estadio de blastocisto, donde se encuentra la masa celular interna, compuesta por las células troncales, que darán lugar a las líneas celulares embrionarias, con gran aplicación en medicina regenerativa. - Derivación de líneas celulares embrionarias humanas: aislamiento de la masa celular interna de los blastocistos mediante inmunocirugía, o cultivo del blastocisto completo sobre monocapa de fibroblastos. - Mediador entre los Centros de Reproducción y el Banco para la perfecta coordinación en la donación de preembriones para fines científicos. La necesidad de un embriólogo en el BLCA fue una propuesta realizada por su Director como pieza importante en la estructura del mismo. Además, esta iniciativa ha sido refrendada y apoyada por otros Bancos o Instituciones colaboradoras (UK Stem Cell Bank, London; Roslin Institute, Edinburgh; Centre for Stem Cell Biology, Sheffield), lo que ha permitido que en nuestro Centro se estén llevando a cabo todas las funciones descritas en esta comunicación.

BIBLIOGRAFÍA: - LEY 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modifica la Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida. BOE núm.280, pp 41458-63.

P. 11.**CONTROL DE CALIDAD DE LOS INCUBADORES DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA**

A. Expósito, R. Mendoza, B. Corcóstegui, F. Fernández, R. Matorras.
Hospital de Cruces.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

OBJETIVO: Controlar cualquier desviación de la calidad, dentro de los límites cuantitativos prefijados para las variables de T^a(37,0°C) y de CO₂ (6%) de un incubador X de cultivo de embriones en nuestro laboratorio de RA.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se hizo un registro diario de los niveles de CO₂ y T^a de un nuevo incubador X para comprobar que dichos parámetros están bajo control. Utilizamos como método independiente de medición externa, para verificar los valores de las variables a estudiar (CO₂ y T^a), el InControl (1050 Labor-Technik-Göttinger). Los valores de CO₂ y T^a que consideramos óptimos para el cultivo de embriones están prefijados en 6,0 y 37,0°C. Hemos utilizado para el procesamiento de los datos recogidos el programa estadístico SPSS 11.0.1.

RESULTADOS: En los gráficos de control de calidad X-bar (fig.1) para la Temperatura y para los niveles de CO₂ (fig.2) se observan los valores que permanecen fuera de control y por tanto sobrepasan los Límites de Control Superior (LCS) e Inferior (LCI) establecidos. Los límites superior e inferior de cada variable son el resultado de tres veces la desviación típica, siendo ésta de 0,18 para la variable T^a y 0,10 para la variable CO₂.

CONCLUSIONES: El registro diario de T^a y CO₂ de los incubadores y su control externo con ayuda del InControl resulta imprescindible para mantener las condiciones ideales de cultivo dentro del laboratorio. Valores discordantes y fuera de los límites de control establecidos nos hace pensar si existe una inercia peligrosa en algún comportamiento. Otra consideración importante es comprobar la eventualidad de que los puntos (valores) evidencien alguna tendencia o pauta definida y si podemos identificar la causa de la no aleatoriedad de los datos, tendremos la posibilidad de eliminar la condición de fuera de control en el proceso, antes de que los límites sean sobrepasados. Igualmente, el establecimiento de recomendaciones permitirá al laboratorio de RA describir las acciones correctoras y/o preventivas necesarias para alcanzar sus objetivos de calidad.

BIBLIOGRAFÍA: Garrisi GJ, Chin AJ, Dolan PM, Nagler HM, Vazquez-Levin M et al. "Analysis of factors contributing to success in a program of micromanipulation-assisted fertilization. Fertil Steril 1993;59:366-74. Matson PI "Internal quality control and external quality assurance in the IVF laboratory. Hum Reprod 1998; Supple 13 4:156-65. Wikland M, Sjoblom C "The application of quality systems in ART programs. Mol Cell Endocrinol 2000; 166:3-7.

P. 12.**GESTIÓN DE EQUIPOS EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Al. Expósito, JM. Fernández, J. Molina, E. Díez.
Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

INTRODUCCIÓN: Aumentar el control de los sistemas del laboratorio es crucial para aumentar la eficiencia de las TRA. La preocupación generalizada respecto a las deficiencias en las prácticas del laboratorio ha conducido a la aparición de Normas (ISO; EN UNE), buenas prácticas de laboratorio (BPL), programas de aseguración de la calidad, con el fin de ayudar u obligar a la adopción de principios de garantía de calidad en los laboratorios. **Objetivo:** Proporcionar una guía que facilite a los laboratorios la implantación de los equipos en el Sistema de Calidad.

MATERIAL Y MÉTODOS: En este trabajo se presenta un esquema de organización para la Gestión de equipos de un laboratorio de RA. El esquema está basado en los requisitos especificados para los equipos en la Norma UNE-EN ISO 15189:2003 "Laboratorio Clínico: requisitos particulares relativos a la calidad y competencia". Se incluyen referencias a los epígrafes de la Norma cuando se consideran oportunos y, a modo de ejemplo, se exponen algunos problemas derivados del quehacer diario. Todas las actividades a desarrollar en la calificación de un equipo deben ser planificadas y aprobadas en un "Protocolo de calificación", donde se consideran 4 etapas o fases en la vida de un equipo. *ADQUISICIÓN *RECEPCIÓN / INSTALACIÓN *FUNCIONAMIENTO *BAJA / RETIRADA DEL EQUIPO.

RESULTADOS: Se ha redactado únicamente los documentos con los puntos de adquisición y recepción/instalación de equipos, a modo de ejemplo y, debido a lo extenso de la Norma. *Actividades a realizar por el laboratorio: -Pliego de características técnicas para el equipo concreto -Pliego de requisitos específicos para el equipo y suministrador *Actividades a controlar por el laboratorio -Se evalúan la adecuación de las ofertas recibidas de los posibles proveedores a los pliegos de características técnicas y requisitos y se decidirá la compra del equipo. *Finalidad - Disposición por parte del laboratorio de todos los equipos necesarios para la operación correcta de su actividad (5.5.2). - Los diseños, calidades y precisiones de los equipos y software deben ser los establecidos en los métodos de ensayo (5.5.2) *Incidencias - Ejemplo de un problema: la incorporación de un equipo al laboratorio con el manual de instrucciones en chino. Solución: un pliego de características y requisitos detallado y completo evitaría esta circunstancia y otras que pudieran darse si no se detallan las condiciones de compra. Se han redactado los documentos con los puntos de adquisición y recepción / instalación de equipos, a modo de ejemplo y, debido a lo extenso de la Norma. 2. RECEPCIÓN / INSTALACIÓN *Actividades a realizar por el laboratorio: - Acondicionamiento de la ubicación (alimentación, instalaciones, condiciones ambientales) - Designación del Responsable técnico del nuevo equipo - Inventario; identificación-etiquetado del equipo; ficha de equipo; ficha técnico-histórica. *Actividades a controlar por el laboratorio - Se evaluará la documentación sobre el equipo aportada por el suministrador *Finalidad - se calibrará antes de su puesta en funcionamiento (5.5.2) - se procederá a la inclusión en el inventario, se identificará debidamente (5.5.4), etiquetará y se cumplimentará la ficha de equipo y la técnica histórica (5.5.1; 5.5.4; 5.5.8). - se mantendrán actualizados los registros necesarios de los equipos de medida y ensayo y sus software (5.5.5). *Incidencias - Ejemplo: placa calefactada que tarda mucho en estabilizarse y proporciona mediciones alteradas. Solución: previsión de potencia eléctrica que se va a necesitar, que las fases no estén descompensadas, sistemas automáticos, diferenciales y tomas de tierra en condiciones. *La gestión de equipos es parte fundamental del sistema de gestión del laboratorio. Para que esta gestión sea adecuada se deben tener en cuenta tanto el cumplimiento de las prescripciones de la Norma UNE-EN ISO 15189 como las peculiaridades propias del laboratorio. *La experiencia en la implantación de los equipos en el sistema de calidad demuestra que es absolutamente necesaria la cooperación y colaboración de todo el personal del laboratorio. El seguimiento continuo de las incidencias y su análisis contribuyen de manera sustancial a la mejora continua de esta gestión.

BIBLIOGRAFÍA: 1. Norma UNE-EN ISO 15189:2003 "Laboratorio Clínico: requisitos particulares relativos a la calidad y competencia". 2. Criterios generales para la Acreditación de Ensayos y Calibraciones según Norma UNE-EN ISO/IEC 17025. CGAENAC- LEC. Rev. 1, Noviembre 2000.

P. 13.**¿REALMENTE ES IMPORTANTE LA CALIDAD AMBIENTAL DEL LABORATORIO DE FIV?**

I. Martínez, M. Villamarín, Ml. Rivas, S. De Andrés, F. Meijide, R. Fernández, B. Álvarez, MJ. Faraldo y O. Boullosa. Vigo.

Tipo: El laboratorio de embriología**OBJETIVOS:** Revisar las tasas reales de embarazo tras la mejora de la calidad ambiental del laboratorio de FIV.

METODOLOGÍA: El impacto de las diferentes condiciones ambientales sobre el desarrollo preimplantacional de los embriones es un punto de reciente estudio por los embriólogos (3,5,6), y trabajos como el publicado por Boone Wr et al muestran un incremento estadístico en las tasas de embarazo tras la mejora de la calidad ambiental. Dado que el laboratorio de nuestra unidad era un único espacio, sin separación de zonas, sin ningún sistema ni de acondicionamiento del aire ni de filtración y aunque la legislación española en vigor encargada de regular la autorización de este tipo de laboratorios no especifica los requisitos de calidad ambiental, consideramos que era esencial adaptar el laboratorio a las recomendaciones de las guías de las diferentes sociedades científicas nacionales e internacionales (ESHRE, ASF, ACE, ALPHA, etc.), ya que con estos cambios las tasas de embarazo que nos estaban bajando podían mejorar. La mejora del laboratorio consistió en: 1- Dividir el laboratorio en tres zonas diferenciadas. Esclusa de entrada donde se entra con pijama de quirófano y se pone bata estéril, gorro, mascarilla y calzas para poder acceder al interior del laboratorio de FIV, es una zona restringida al personal del laboratorio y con acceso directo al laboratorio a través de una puerta. Zona de trabajo cuya carpintería metálica de puertas, ventanas y encimeras es en aluminio natural y acero inox. Zona húmeda, donde se colocó el sistema de congelación y el criobanco. Separada de la zona de trabajo. 2- Instalación de un climatizador (AIRVENT modelo PB-1) que garantiza 18 con tres filtros (filtro de carbono Var O5 de 600x600x300, filtro Intercell FP-610 de 600x600x300 y prefiltro G4 de 600x600x45). 3- Generación de una sobre-presión de la zona de trabajo sobre la zona húmeda y con respecto a la esclusa de entrada (sobre-presión zona trabajo-zona húmeda 1,2Pa, sobre-presión zona trabajo-Esclusa 2,2Pa y sobre-presión Esclusa-exterior 1,8Pa. Se realizó una toma de muestras del aire por el método de muestreo volumétrico, mediante impacto de 1m3 de aire en placas de cultivo para hongos y bacterias para comprobar la calidad del aire y se compararon las tasas reales de embarazo antes de las mejoras y después.

RESULTADOS: El muestreo del laboratorio dio como resultado 0 ufc/m3 de bacterias y cultivo negativo para hongos, resultados que se han seguido manteniendo tras la repetición del muestreo. La valoración de la tasa real de embarazo antes de la mejora de la calidad ambiental va desde Febrero a Agosto del 2004 y se comparó con la tasa en el mismo periodo (Febrero- Agosto) pero del año siguiente con las mejoras ya citadas. Los resultados fueron los siguientes: Febrero-Agosto 2005 FEBRERO-AGOSTO 2004 FEBRERO-AGOSTO 2005 TÉCNICAS N TASA REAL N TASA REAL Donación 8 25% 8 50% FIV/ICSI 19 21,05% 15 40% IA 33 12,12% 22 22,7%

DISCUSIÓN: Pese a tener un tamaño muestral bajo en todas las técnicas, se pudo ver que existe una clara diferencia en los dos periodos y dado que la única variable que se cambió fue la calidad ambiental en el laboratorio podemos atribuir esta mejora a la conversión del laboratorio. Sin embargo para poder llegar a esta conclusión tendríamos que aumentar el número de ciclos y realizar un análisis estadístico más robusto, estrategia que va a seguir nuestra unidad de reproducción.

CONCLUSIONES: Aún siendo conscientes de los pocos datos que hemos manejado, dado el poco tiempo que ha pasado desde el cambio, consideramos de gran importancia la necesidad de trabajar dentro del laboratorio en las mejores condiciones ambientales posibles, puesto que nuestra experiencia ha sido totalmente satisfactoria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 1- Beli I, Veiga A. Control de calidad en el laboratorio de fecundación in vitro. Boletín SEF año 10 (vol.1). 2- Boone RW, Jonson JE, Locke AJ, Crane MM, Price TM. Control of air quality in a assisted reproductive technology laboratory. Fertil Steril.199; 71(19):150-154. 3- De los Santos MJ. Condiciones óptimas de trabajo en el laboratorio de FIV. Rev Iberoamericana de Fertilidad.2001;18(4):34-39 4- Gianaroli G, Plachot M, Van Kooij r, Al-Hasani S, Dawson K, De Vos A et al.ESHRE guidelines for the good practice in IVF laboratories. Human Reproduction.2000;15(10):2241-2246. 5- Hill DL. Role of the in vitro fertilization laboratory in a negative pregnancy outcome. Fertil Steril.2001;75(2):249-251. 6- Mendoza y col. Análisis de filtros CODA IN LINE en el incubador de CO2 del laboratorio de reproducción.(comunicación). Congreso ASEBIR. Diciembre 2003.

P. 14.**BAREMO DE LA TEE, REPERCUSIÓN EN LA TASA DE GESTACIÓN E IMPLANTACIÓN**

I. Peinado, M. De la Orden, G. Pérez-Bermejo, G. Herrero, A. Monzó y A. Romeu. Hospital Universitario La Fe, Valencia.

Tipo: El laboratorio de embriología**OBJETIVO:** este trabajo pretende estudiar el proceso de transferencia embrionaria y sus posibles implicaciones en el éxito de un ciclo de fecundación *in vitro*.

METODOLOGÍA: se analizaron prospectivamente 1294 transferencias embrionarias ecoguiadas (TEE) consecutivas tras FIV/ICSI realizadas en el Hospital Universitario La Fe de Valencia desde Marzo 2004 a Julio del 2005. Las variables estudiadas para baremar la TEE fueron: varios intentos al introducir la cánula, uso de pinzas de Pozzi, uso de dilatadores, presencia de sangre y/o moco, necesidad de utilizar varias cánulas, embriones en cánula tras transferencia y tiempo empleado. Según el baremo de dificultades las transferencias se dividieron en 3 grupos: Sencillas (ausencia dificultades), Complicadas (dificultades 1 a 4) y Muy Complicadas (>5 dificultades). Se evaluó la influencia de los parámetros estudiados sobre la Tasa de Gestación (TG) y Tasa de Implantación (TI).

RESULTADOS: El análisis estadístico de los datos (Test ji-cuadrado, P-valor 0,01) muestra diferencias significativas en la TG y TI entre los tres grupos de TEE. El estudio estadístico individual de cada una de las dificultades presenta diferencias significativas (TG y TI) si se observa presencia de sangre en OCE (0,05 y 0,005) y en vaina interna (0,002 y 0,001). Sin embargo, las siguientes dificultades: varios intentos para introducir la cánula (0,001), pinzas Pozzi (0,03) y tiempo empleado (0,02) sólo afectan significativamente a la TG.

CONCLUSIONES: El éxito del ciclo se ve claramente perjudicado conforme aumenta el número de complicaciones. La presencia de sangre en OCE y en vaina interna de la cánula son las dificultades más agravantes para la TG y TI. No obstante, existen otras dificultades que también afectan la TG (varios intentos para introducir la cánula, uso pinzas Pozzi y tiempo empleado en la TEE).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: G. Herrero, I. Peinado, M. De la Orden, G. Pérez-Bermejo, A. Monzó y A. Romeu. Evaluación mediante un baremo de las dificultades y complicaciones de la transferencia embrionaria. Rev. Ibe. Fertilidad. 2005; 22(3). Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. Fertil. Steril. 2001; 76: 863-870. Kovacs GT. What factors are important for successful embryo transfer after in-vitro fertilization?. Hum.Reprod. 1999; 14: 590-592. Neithardt AB, Segars JH, Hennessy S, James AN, McKeeby JL. Embryo afterloading: a refinement in embryo transfer technique that may increase clinical pregnancy. Fertil Steril. 2005; 83(3):710-4.

OLYMPUS[®]

Your Vision, Our Future



**TENEMOS LAS PIEZAS
PARA SU NUEVO LABORATORIO.**

Olympus España le ofrece
una solución global para su
laboratorio de Reproducción Asistida.

Para más información, contactar con
Olympus España
902 444 204
informacion.micro@olympus-europa.com

P. 15. ANÁLISIS DE ACEPTABILIDAD DE TRES EQUIPOS DE MICROMANIPULACIÓN DISPONIBLES PARA EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

L. Bassas, A. García, O. Martínez-Passarell, O. López, A. Mata
Laboratorio de Seminología y Embriología, Fundació Puigvert, Barcelona.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

INTRODUCCIÓN: La elección del equipo de micromanipulación más apropiado para las aplicaciones clínicas en embriología requiere, idealmente, un análisis comparativo de las características que ofrece cada uno de los modelos existentes. Hay pocas publicaciones que aborden esta cuestión adecuadamente [1], y la decisión final suele estar sesgada por la opinión de colegas o fabricantes.

OBJETIVO: Evaluar la aceptabilidad y "usabilidad" de tres configuraciones de micromanipuladores disponibles en nuestro medio.

METODOLOGÍA: Los equipos se montaron sobre un invertoscopio Eclipse TE 2000S y fueron analizados por este orden: a) conjunto de dos micromanipuladores motorizados MM-87 más uno hidráulico tipo joystick MMO-202ND de Narishige (NSH), b) conjunto de dos micromanipuladores TransfeMan® NK2 de Eppendorf (NK2), y c) sistema Integra Ti de Research Instruments, con dos micromanipuladores integrados TDU 5000 (IRI). Todos los facultativos de nuestro laboratorio (n=5), con experiencia en ICSI, participaron en la evaluación sucesiva de los tres equipos durante 1 a 2 semanas para cada uno, durante el primer trimestre de 2005. El ritmo de actividad clínica fue similar durante las distintas fases del escrutinio. Cada embriólogo realizó un mínimo de 3 sesiones de ICSI con cada sistema, en un mismo día o en días consecutivos. A continuación, se administró un cuestionario con 8 preguntas para valoración semicuantitativa de las preferencias (puntuación 1 para la opinión menos favorable, 5 para la opinión más favorable). Este proceso se repitió para cada uno de los equipos. El estudio no incluyó la función de las jeringas de microinyección. Se realizó un análisis estadístico descriptivo y ANOVA de un factor con corrección para muestras pequeñas.

RESULTADOS: No se observaron tendencias significativas atribuibles al efecto del observador en la puntuación de los diversos parámetros. La puntuación referida al diseño general y la accesibilidad de la zona de trabajo fue de $3,2\pm 0,44$, $4,2\pm 0,44$ y $4,0\pm 0,7$ (media \pm DE) para los sistemas NSH, IRI y NK2 respectivamente ($P=0,032$). La facilidad en la colocación y control posicional de pipetas fue mejor con NK2 ($4,6\pm 0,54$) y con IRI ($4,0\pm 0,71$) que con NSH ($2,4\pm 0,54$) ($P<0,0001$). La valoración de la estabilidad y vibraciones fue de $2,4\pm 0,54$, $3,2\pm 0,44$ y $3,6\pm 0,54$ para NSH, IRI y NK2 respectivamente ($P=0,01$). En el apartado de ergonomía y comodidad destacaron NSH ($3,2\pm 0,83$) y NK2 ($3,8\pm 0,44$) sobre IRI ($2,6\pm 0,54$) ($P=0,035$). Los movimientos de aproximación y disponibilidad de memorias obtuvieron una valoración de ($3,0\pm 0,0$) para NSH, ($2,4\pm 0,54$) para IRI y ($4,2\pm 0,83$) con NK2 ($P=0,001$). En la precisión de movimientos finos NK2 ($4,4\pm 0,54$) aventajó a IRI y NSH (ambos con $3,6\pm 0,54$) ($P=0,61$). Finalmente, la mejor relación calidad-precio fue para NSH, seguida de NK2 y en último lugar IRI ($P<0,05$).

CONCLUSIONES: La evaluación sistemática de las distintas propiedades de los equipos de micromanipulación permite ponderar las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos. La lectura de los resultados ayuda a conciliar diferencias individuales y facilita la tarea de elegir la mejor configuración a un grupo de trabajo concreto. En nuestra experiencia, el sistema NK2 destacó en 6 de los 8 aspectos analizados, y el sistema NSH en los otros 2, en el contexto de actividad habitual del laboratorio de embriología.

REFERENCIAS: [1] Fleming SD y King RS (2003) Micromanipulation in assisted conception. A users' manual and troubleshooting guide. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

P. 16. EVOLUCIÓN DE LOS COSTES DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN UN CENTRO PÚBLICO: 1998 VS 2003

JA. Castilla, E. Hernández, JL. Navarro, L. Martínez, C. González-Varea, A. Garrido, M. Sánchez, C. Fernández, R. Martínez, M. Hernández.
H.U.Virgen de las Nieves, Granada.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

INTRODUCCIÓN: Numerosos trabajos estiman el coste de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA), aunque la mayoría lo identifican con el coste directo del procedimiento, sin considerar otros importantes elementos, como costes estructurales, o intermedios.

OBJETIVOS: Calcular el coste por proceso de las TRA realizadas en un hospital público en 2003, comparándolo con los resultados de 1998 en el mismo centro.

METODOLOGÍA: El estudio se refiere a la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (URH-HUVN) en 1998 y 2003. Partiendo de los costes totales de la URH-HUVN, calculamos el coste por proceso de las TRA realizadas en este centro, considerando costes completos, asignados por proceso según el volumen de actividad, diferenciando actividad clínica (tiempo) y de laboratorio (Actividad de Proceso Técnico, UPT, propuesta por SEDIGLAC).

RESULTADOS: Entre 1998 y 2003, la actividad y los costes de la URH-HUVN evolucionan de forma distinta. El análisis de la actividad muestra la consolidación de técnicas, como la ICSI y la desaparición de otras (Ciclo sin RA e IAD-IC). El análisis de los costes indica una disminución del coste unitario en todos los procesos, tendencia que se invierte si se consideran los costes de farmacia.

CONCLUSIONES: En línea con otros estudios publicados, apreciamos importantes cambios en las TRA de la URH-HUVN entre 1998-2003. Mientras algunos procesos desaparecen, otros se consolidan con una elevada actividad. Los avances técnicos y las innovaciones en el aspecto organizativo, junto con el efecto aprendizaje, han alterado la estructura de costes de las TRA.

P. 17.**RESULTADOS DEL CENTRO DE ASISTENCIA A LA REPRODUCCIÓN DE CANARIAS**

V. Sanabria, P. Rivero, E. China, J. Hernández y A. Palumbo
Centro de Asistencia a la Reproducción Humana de Canarias (FIVAP), La Laguna, Tenerife.

Tipo: **Investigación aplicada**

OBJETIVO: Presentación de los resultados obtenidos en ciclos en los que se ha realizado biopsia testicular (TESE) y aspiración de epidídimo (MESA) en nuestro Centro. Los parámetros tenidos en cuenta son los siguientes: tasa de fecundación, tasa en 3 pronúcleos, en 1 pronúcleo, no fecundados y tasa de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos analizado todos los ciclos donde realizamos una biopsia testicular o aspiraciones de epidídimo. Desde Abril 2001 y hasta Septiembre de 2005, se realizaron 31 ciclos de ICSI con espermatozoides recuperados de biopsias (TESE) y 4 ciclos con una aspiración de epidídimo (MESA). En 6 de los casos de TESE, se acudió a donación de semen por no obtenerse espermatozoides móviles. En 2 casos, se usó muestra congelada de biopsias previas.

RESULTADOS: Total de casos 35 Transferencias 31 Acuden a donación 8, Aspiración 4, Descongelado 2% Embarazo clínico (12/20) 60% % Embarazo evolutivo (10/20) 50% Edad media hombre 37,6 Edad media de mujer 33,47 Media ovocitos microinyectados 9,87% Medio 1 PN 1,6% Medio 2 PN 60,38% Medio 3 PN 1,67% Medio NF 26,56 Media de embriones transferidos 2,09% Medio Supervivencia D+1/D+2 86% % Medio Supervivencia D+2/D+3 82% Nota: los casos donde se acudió a semen de donante no se han tenido en cuenta.

CONCLUSIONES: Estos resultados corroboran que la fecundación de los ovocitos con espermatozoides obtenidos de biopsias testiculares presenta estadísticas muy similares a los casos en los que se utiliza semen de eyaculado, observándose lo mismo con la tasa de embarazo. No se observa mayor tasa de fecundación en tres pronúcleos ni de no fecundados.

P. 18.**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL PRODUCTO DE LIMPIEZA DE LABORATORIO PQ110**

M. Ardoy, J.M. Montejo, M. Marcos. HU La Paz, Madrid.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

El H.U. La Paz ha cambiado el producto de limpieza de superficies por uno nuevo, el PQ-110, detergente neutro a base de amonios cuaternarios, cloruro de benzalconio. Sus mecanismos de acción, posiblemente dosis-dependientes: desnaturalización proteica, inactivación enzimática, interferencia en proteínas G y rotura de membrana celular. Además de usarse para desinfección de superficies, el benzalconio es un espermicida (Apel-Paz et al., 2003). Aunque su evaporación es baja, y su uso extendido en laboratorios celulares, nos era desconocido si el ambiente del laboratorio de FIV, tras su uso y evaporación, podía tener efectos específicos sobre el espermatozoide y los sistemas de cultivo.

OBJETIVO: Evaluar toxicidad del producto PQ-110 mediante el test de supervivencia espermática dentro del proceso de control de calidad del laboratorio de FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio prospectivo casos-control. Medio de cultivo de prueba: Fert® sin HSA burbujeado con aire de un contenedor con PQ-110, éste simultáneamente se evaporaba con saturación superior a lo esperado en el laboratorio. Medio control: el mismo sin burbujear. Supervivencia espermática. 10 muestras seminales diferentes. REM mediante gradientes. Por tubo se dispusieron 5 millones de espermatozoides a+b en 1 ml de medio. El índice de supervivencia a las 24 horas (ITSS) se calculó: % espermatozoides a+b en tubo de prueba a las 24 h/ % espermatozoides a+b en tubo control a las 24 h, porcentuado. Sólo fueron incluidos tests con supervivencia en control >74%. Valor (-) en ITSS si >74%. También se realizó control de supervivencia de embriones de ratón. Procesado según instrucciones del proveedor de EmbryoTEST, ROMAL. 14 embriones desde D+1 en medio de prueba con HSA. No existió control. Valor (-) para supervivencia si alcanzan blastocisto aproximadamente el 70% de los embriones. Test Wilcoxon pareado y correlación de Spearman para valorar diferencias entre grupos. Test de una media para valor medio de ITSS frente al valor teórico 74.

RESULTADOS: Tabla: % de espermatozoides a+b a las 24 horas

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control %	56	32	58	50	26	15	58	25	78	20
Prueba %	52	36	57	25	28	14	54	22	72	15
ITSS %	93	112	98	50*	108	93	93	88	92	75

Comparación de % supervivencia de control vs. prueba: correlación de Sperman= 0,9; Wilcoxon pareado con $P=0,059$, no significativa. Media de ITSS: 90,2% DS de 17,4. Difiere estadísticamente del punto de corte de 75, $P=0,02$. Llegada a blastocistos de ratón: 65%,

COMENTARIOS: Salvo muestra 4, todos los ITSS son negativos, >75, esto, junto con valor medio de ITSS mayor y diferente estadísticamente de 75%, valida el test de toxicidad como negativo (Classeens et al., 2000; De Jonge et al., 2003). Aún así, podía existir cierta toxicidad que no afectara significativamente la supervivencia pero que marcara diferencias entre ambos grupos. El test de Wilcoxon muestra que las diferencias son debidas al azar. El valor de 65% de blastocistos es cercano al 70%, pudiendo aceptarse, máxime cuando algunos autores lo consideran aceptable si es >45-50%.

CONCLUSIONES: Podemos considerar como no tóxico el producto PQ-110 en su uso en el laboratorio de embriología. Pudiendo incluirlo en el protocolo habitual de limpieza de suelos y paredes.

BIBLIOGRAFÍA: Apel-Paz M, Vanderlick TK, Chandra N. A hierarchy of lipid construct for the sperm plasma membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003;309:724-732. Claessens OE, Wehr JB, Harrison KL. Optimizing sensitivity of the human sperm motility assay for embryo toxicity testing. Hum Reprod 2000; 15(7):1586-1591. De Jonge C J, Centola GM, Reed ML, et al. Human Sperm Survival Assay as a Bioassay for the Assisted Reproductive Technologies Laboratory. J Androl 2003; 24(1):16-18.

P. 19. TASAS DE SUPERVIVENCIA Y EMBARAZO TRAS TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CRIOPRESERVADOS EN D+2 EN 4-CÉLULAS TIPO I Y II

M. Mandiola, A. Guembe, F. Luceño, K. Carbonero, M.J. Iñarra, F. Atutxa, T. Ganzabal, A. López de Larrucea, G. Barrenetxea, R. Jimenez, JA. Aguirregoikoa.
Unidad de Reproducción Asistida. Quirón Donostia - Quirón Bilbao.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: La criopreservación de embriones humanos es un proceso rutinario en la mayoría de los Laboratorios de Reproducción Asistida. El objetivo del presente estudio es determinar el grado de supervivencia de los embriones criopreservados sobrantes de los ciclos de FIVTE/ICSI, y las tasas de embarazo conseguidas con el uso de los mismos. Para ello, sólo consideraremos los embriones criopreservados en el día + 2 en estadio celular de 4 células tipo I y tipo II. El hecho de sólo incluir en este estudio esta categoría de embriones es para asegurarnos que en el caso de que exista supervivencia de todos (o parte de ellos), partamos de embriones de buena calidad.

MÉTODOS: Revisamos los ciclos de transferencias de embriones criopreservados en estadio de 4 células tipo I-II realizados en nuestras Unidades de Reproducción de la Clínica Quirón Donostia y la Clínica Quirón Bilbao. Los embriones fueron criopreservados con los medios Freeze-kit 1, y descongelados con los medios Thaw-kit 1 de la serie G III de Vitrolife. Para el cultivo de los embriones se usó el medio G2, también de la serie G III de Vitrolife. La transferencia embrionaria es realizada 24 horas después de la descongelación.

RESULTADOS: Se revisaron 53 ciclos de congelación de embriones, y en un 84,90% de los casos (45) de los casos sobrevivió alguno de los embriones al proceso de congelación. En un 66,03% de los casos (35), los embriones se dividieron dentro de las 24 horas siguientes al proceso de descongelación, realizándose la transferencia. La tasa de embarazo por transferencia fue de un 31,43% (11), y la tasa de embarazo por ciclo fue de un 20,75%.

CONCLUSIONES: La conclusión a la que hemos llegado en nuestra Unidad de Reproducción es que si sólo congelamos embriones de buena calidad (es decir, de 4-células tipo I-II en el día +2), podremos esperar unas tasas de supervivencia, de división en las 24h posteriores a la descongelación y de embarazo razonables.

P. 20. GRADIENTES VS SWIM-UP: INTEGRIDAD DE MEMBRANA Y VIABILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE

E. García Mengual, D. García Tajada, I. Molina, J. Alfonso, A. Romeu
Hospital General Universitario La Fe de Valencia.

Tipo: **Gametos y Embriones**

La mejora *in vitro* del semen es fundamental para las diferentes Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). El *Swim-Up* (SW) selecciona los espermatozoides en base a su motilidad lineal progresiva, mientras que los Gradientes Discontinuos de Densidad (GD) lo hacen en base a su densidad! (Gorus & Pipeleers, 1981), que está estrechamente relacionada con la viabilidad y la morfología espermática (Mortimer, 1999). El SW proporciona un mayor Recuento de Espermatozoides Móviles (REM) en relación con el GD, sin embargo la tasa de fecundación en FIV es similar para ambas técnicas (Söderlund & Lundin, 2000).

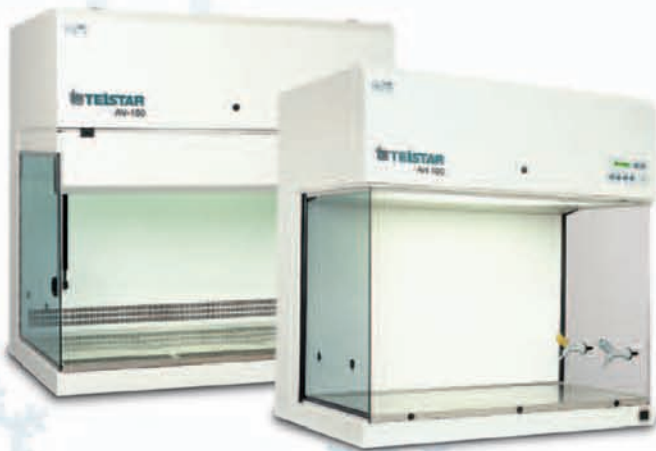
OBJETIVO: El objetivo de este trabajo es comparar la eficiencia de estas dos técnicas de selección espermática, valorando tanto la integridad de membrana (HOS test y Eosina) como la Progresión y Motilidad a las 24horas.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se utilizaron 29 muestras de eyaculado de pacientes del Hospital Universitario La Fe de Valencia recogidas entre Octubre y Noviembre de 2004. De ellas, 12 normozoospermicas y 17 astenozoospermicas según la OMS (WHO, 1999). Cada muestra se capacitó mediante las dos técnicas de selección espermática: SW 600g 10min, y GD de Puresperm® (90%-45%) 300g 20min. Tras la capacitación se valoraron tanto las variables relacionadas con la integridad de membrana (HOS test y Eosina) como el Test de Progresión (30min en Suero Glucosado a 37°C) y la Motilidad (A+B) a las 24h (Tª ambiente). Las variables estudiadas se compararon para ambas técnicas de selección espermática distinguiendo tres grupos: Normozoospermicos (N), Astenozoospermicos (A), y Total (N+A). Resultados: En el grupo Total, se observaron diferencias significativas para Eosina (SW: 81,9%*sig; GD: 74,3%), HOS (SW: 83,6%*sig; GD: 76,8%) y Progresión (SW: 27,2mm*sig; GD: 24,5mm) a favor del *swim-Up*. Sin embargo la motilidad a las 24 horas fue significativamente mayor para el Gradiente de Densidad (SW: 1,5%; GD: 27,6%*sig). Cuando se analizaron separadamente las muestras A y N los resultados fueron los siguientes: Para el grupo N solo se observaron diferencias significativas a favor del gradiente en la Motilidad a las 24 horas (SW:2,1%; GD: 25,0%*sig); sin embargo en el grupo A se observaron diferencias significativas para Eosina (SW: 81,2%*sig; GD: 71,4%), HOS (SW: 83%*sig; GD: 75,2%) y Progresión (SW: 27,6mm *sig ;GD: 24,6mm) a favor del *swim-up*, y la Motilidad a las 24 horas (SW: 1%; GD: 29,5%*sig) fue significativamente superior para el gradiente.

DISCUSIÓN: a) En las muestras Normozoospermicas la técnica de selección espermática no influye sobre las variables de integridad de membrana ni sobre la Progresión y la Motilidad a las 24horas. b) En las muestras Astenozoospermicas la técnica más efectiva fue el *swim-up*, que determinó una mayor integridad de membrana y una mayor progresión. c) La mayor motilidad a las 24 horas de cultivo tras la selección mediante gradiente, recomendaría el uso de esta técnica en aquellas muestras procedentes de biopsia testicular que se descongelen el día previo a la punción.

BIBLIOGRAFÍA: Gorus FK, Pipeleers DG: A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. Fertil Steril 1981, 35: 662-665.; Mortimer, D.: Structured management as a basis for cost effective infertility care. En: The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications. Gagnon C. (Ed.) Cache River Press, Illinois, USA, 1999. pp 363-370.; Söderlund B, Lundin K: The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. Hum Reprod 2000, 15: 857-860; World Health Organization (1999). WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge.

TELSTAR INDUSTRIAL



CABINAS DE FLUJO LAMINAR VERTICAL
Y HORIZONTAL TERMOSTATADAS



TANQUES DE ALMACENAJE
DE MUESTRAS EN NITRÓGENO LÍQUIDO
O EN FASE VAPOR DE GRAN CAPACIDAD



TANQUES CRIOGÉNICOS
(-196°C) PARA ALMACENAJE
DE MUESTRAS EN SECO



TANQUES DE ALMACENAJE DE MUESTRAS
EN NITRÓGENO LÍQUIDO O EN FASE VAPOR



CRIOCONGELADORES PROGRAMABLES
PLANER (-180°C)

LÍDERES EN CRIOCONGELACIÓN

La División de Equipos de Laboratorio de TELSTAR INDUSTRIAL concentra su actividad en la tecnología necesaria para llevar a cabo el trabajo de los laboratorios de investigación y control de calidad y análisis beneficiándose del background tecnológico que sólo

puede ofrecer un potente grupo de empresas. Líderes en el campo de la criogenia, nuestra experiencia y know-how nos permite a participar actualmente en proyectos de gran envergadura en criocongelación y criopreservación de muestras biológicas.

TELSTAR INDUSTRIAL, S.L.
Josep Tapiolas, 120
08226 TERRASSA (España)
Tel. +34 937 36 16 00
Fax +34 937 85 93 42
E-mail: telstar@etelstar.com

DELEGACIÓN MADRID
Santibáñez de Béjar, 2
28042 MADRID (España)
Tel. +34 913 71 75 25
Fax +34 913 71 79 41
E-mail: telstarm@etelstar.com



eTELSTAR.com
www.etelstar.com

P. 21. EMBARAZO TRAS ICSI USANDO ESPERMATOZOIDES SOMETIDOS A DOS CICLOS DE CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN EN UN VARÓN CON CARCINOMA TESTICULAR

J. Alfonso¹, C. Duque², I. Navarro¹, I. Molina², F. Naranjo, LA. Quintero¹ y V. Montañana^{1,2}

¹Instituto de Medicina Reproductiva (IMER) Valencia, ²H.U. La Fe, Valencia.

Tipo: Gametos y Embriones

INTRODUCCIÓN: La Criopreservación Terapéutica de Semen (CTS) permite preservar la fertilidad mediante Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) en aquellos varones con cáncer testicular y que van a ser sometidos a tratamientos genotóxicos. (Bussen y cols, 2004). Los espermatozoides humanos soportan ciclos consecutivos de congelación-descongelación, permitiendo la recuperación de espermatozoides viables (Verza y Esteves, 2004) Los contenedores para la criopreservación de semen deben permitir un almacenamiento seguro y una utilización razonable de las muestras.

OBJETIVOS: Valorar los resultados de tres ciclos consecutivos de ICSI en un varón con cáncer testicular que realizó CTS, mostró azoospermia en los controles post-tratamiento, y obtuvo gestación en el tercer ciclo de ICSI con espermatozoides congelados dos veces.

MATERIAL Y MÉTODOS: Varón de 31 años con carcinoma testicular realiza CTS previa a quimioterapia. La muestra se almacena en 5 criotubos de 2ml (18x10⁶spz/ml, 47% A+B) en el H.U. la Fe (Valencia) en Test Yolk Buffer (Irvine Scientific), mediante exposición de 30' a 5°C, 30' en vapores de nitrógeno e inmersión en nitrógeno líquido. El varón presentó azoospermia en los controles de espermatozoides viables (Verza y Esteves, 2004) La mujer de 35 años con aparente función reproductora normal tras el estudio adecuado. Tras 4 años, se realizan 3 ciclos de ICSI en diferentes centros obteniendo gestación en el último tras la microinyección de espermatozoides congelados dos veces.

RESULTADOS: En el primer ciclo se descongeló un criotubo sin obtener gestación tras ICSI. El segundo ciclo se descongeló otro criotubo (3x10⁶spz/ml, 85%A+B) y debido a la escasa muestra criopreservada la mitad se destinó a ICSI y la otra mitad se volvió a congelar. Se obtuvo una tasa de fecundación del 100% (8/8), y tras transferencia selectiva de dos embriones (8CG1, 6CG1) en D+3 no se obtuvo gestación. En el tercer ciclo utilizando la muestra recongelada en el ciclo anterior (6x10⁶spz/ml, 90%A+B), se obtuvo una tasa de fecundación de 90,9% (6/7) y tras transferencia selectiva de 3 embriones en D+2 (4CG1, 2CG2, 2CG2) se consiguió una gestación simple evolutiva.

CONCLUSIONES: a) La CTS es un método seguro, que permite mantener la viabilidad de los espermatozoides durante periodos de tiempo de al menos 5 años. b) La utilización de muestras congeladas por segunda vez en ICSI, en este caso parece no afectar a las tasas de fecundación y gestación. c) Se aconseja la CTS en contenedores de menor volumen que permitan descongelar únicamente el volumen necesario (pajuelas, píldoras).

BIBLIOGRAFÍA: Bussen S, Sutterlin M, Steck T, Dieta J. Semen parameters in patients with unilateral testicular cancer compared to patients with other malignancies. Arch Gynecol Obstet 269(3):196-8, 2004.; Verza S Jr, Esteves SC. Feasibility of refreezing human spermatozoa through the technique of liquid nitrogen vapor. Int. Braz. J. Urol. 30 (6):487-93, 2004.

P. 22. INFLUENCIA DEL DÍA DE LA TRANSFERENCIA (D+2 VS D+3) SOBRE EMBRIONES ÓPTIMOS

MD. Lozano, MA. Carracedo, E. Martínez, C. Moya, G. Antiñolo

Unidad Clínica de Genética y Reproducción, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío (Sevilla).

Tipo: Gametos y Embriones

La elección del día de la transferencia embrionaria aún plantea cierta controversia. Diversos autores consideran que retrasar la transferencia del D+2 al D+3 mejora los resultados en cuanto a Tasas de Gestación e Implantación en aquellos ciclos con más de tres embriones, ya que se favorece la selección embrionaria y la sincronía embrio-uterina. En los ciclos donde sólo se dispone de los embriones que van a ser transferidos no encuentran diferencias en dichas Tasas. Sin embargo, otros autores, no encuentran diferencias independientemente del número de embriones disponibles.

OBJETIVO: evaluar si la transferencia en D+3 frente a D+2 favorece las Tasas de gestación e implantación cuando se dispone de embriones óptimos en ambos casos, independientemente del número de embriones disponibles.

METODOLOGÍA: se han analizado 184 de los ciclos realizados en el año 2004. Con el fin de homogeneizar la muestra sólo hemos considerado aquellos que presentan al menos un embrión óptimo el día de la transferencia (4 células simétricas, <20% de fragmentación y mononucleadas para el D+2 y 7 células simétricas, <20% fragmentación y mononucleadas para el D+3). Se transfirieron de forma sistemática dos embriones. Se han realizado 2 grupos de estudio: ciclos con transferencia embrionaria en D+2 (grupo 1) y en D+3 (grupo 2). Ambos grupos son homogéneos en cuanto a la edad de las pacientes y medicación empleada. Resultados: T. Gest. clínica/Transfer T. Implantación GRUPO I (D+2) 52,1% 33,7% GRUPO II (D+3) 58,2% 35,8% P-valor >0,1 >0,1

DISCUSIÓN: cuando se dispone al menos de un embrión óptimo para transferir en D+2 ó D+3, no existen diferencias estadísticamente significativas en las Tasas de Gestación e implantación. No disponemos de un número suficiente de ciclos con embriones de calidad subóptima para poder compararlos y establecer si la transferencia en D+3 favorece a la selección embrionaria y como consecuencia a las Tasas de gestación. **Conclusiones:** consideramos, que aunque en D+3 las transferencias se acercan más al momento fisiológico de la anidación, esto no supone un factor determinante como para modificar las Tasas de Gestación e Implantación, lo que permite al Centro elegir el día de la transferencia a su conveniencia. En centros donde la transferencia no se realiza de forma sistemática en D+3 se tiende a no prolongar el cultivo embrionario si los embriones no son de buena calidad, transfiriéndolos en D+2, lo que en nuestra opinión originaría un sesgo a la hora de comparar ambos grupos y podría explicar los distintos resultados publicados por diferentes autores.

BIBLIOGRAFÍA: Laverge et al., Hum Reprod., 2001, 16:476-480; Carrillo et al., Fértil. Steril.,1998, 69:329-334; Gerris et al., Hum Reprod., 2002, 17:2626-2631; Pantos et al., Fértil Steril., 2004, 81:454-455.

P. 23. SEGUIMIENTO DE EMBRIONES DE CALIDAD SUBÓPTIMA

MA. Carracedo, MD. Lozano, E. Martínez, C. Moya, B. Sánchez y G. Antiñolo
Unidad Clínica de Genética y Reproducción, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío (Sevilla).

Tipo: Gametos y Embriones

Consideramos un embrión de calidad óptima si tiene <20% fragmentación, las blastómeras son simétricas, está en 4-5 células en d+2 ó ≥ 7 en d+3 y las células son mononucleadas; y embriones de calidad subóptima aquellos que tienen entre un 20-40% de fragmentación, alguna blastómera asimétrica, no-multinucleación y/o una cinética celular que no le corresponde a su estadio de desarrollo. Según diversos autores, en los embriones de calidad subóptima es más frecuente encontrar anomalías cromosómicas, las cuales son responsables de bajas tasas de gestación e implantación y de alrededor de un 50% de los abortos de 1º trimestre.

OBJETIVOS: analizar si la tasa de aborto es mayor cuando se transfieren embriones de calidad subóptima y confirmar que las tasas de gestación e implantación son menores.

METODOLOGÍA: se han analizado las 251 transferencias realizadas en el año 2004, comparando aquellas donde todos los embriones son de calidad óptima (grupo 1), las transferencias donde hay embriones de calidad óptima y calidad subóptima (grupo 2) y las transferencias donde todos los embriones son de calidad subóptima (grupo 3). El máximo de embriones transferidos fue de dos siendo la media de 1,9. Resultados: T. Gest. Clínica/Transf. T. Implantación T. Aborto Grupo 1 53,0% 34,2% 24,4% Grupo 2 45,7% 32,9% 18,8% Grupo 3 27,1% 15,3% 23,1% P-valor <0,01 <0,01 >0,1
Discusión: las tasas de gestación clínica/transferencia y de implantación son significativamente menores en el caso de que todos los embriones transferidos sean de calidad subóptima. La tasa de aborto no es significativamente diferente entre los grupos en estudio.

CONCLUSIÓN: si la probabilidad de anomalías cromosómicas es mayor en los embriones de calidad subóptima, la degeneración embrionaria consecuente se produce antes de la implantación, lo que conlleva tasas de gestación e implantación menores en este grupo, mientras que aquéllos que llegan a implantar tienen las mismas posibilidades de aborto que los de calidad óptima.

BIBLIOGRAFÍA: Pellestor F. et al., Hum Reprod 1994, 9:293; Grillo J. M. et al., J In Vitro Fert Embryo Transf. 1991, 8:317; Munné S. et al., Hum Reprod Update 1998, 4:842-855; Jurisicova A. et al., Mol Hum Repro 1996, 2:93-98; Anctczak M. et al., Hum Reprod 1999, 14:429-447.

P. 24. ESTUDIO DE LOS RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA SELECTIVA DE 2 EMBRIONES EN VEZ DE 3 EMBRIONES EN NUESTRA CLÍNICA

S. Rodríguez, F. Ávila, G. Segura, L. Rodríguez, N. Fernández, A. Mashlab
Instituto canario de Infertilidad. Las Palmas de Gran Canaria.

Tipo: Gametos y Embriones

OBJETIVO: El objetivo de nuestro trabajo es averiguar si dados nuestros resultados en la transferencia de 2 embriones con respecto de 3 embriones, podríamos disminuir sistemáticamente el número de embriones a transferir en las pacientes de 35 o menos años, con el fin de paliar el número de embarazos múltiples.

METODOLOGÍA: El estudio fue realizado con 83 pacientes de menos de 36 años de nuestro programa de ICSI del año 2004. En este grupo de pacientes, en el primer ciclo y si los embriones son de buena calidad, transferimos 2 embriones. Sólo se transfieren 3 embriones en casos de no embarazo en ciclos previos o en casos de embriones de mala calidad. En los casos en los que no hay posibilidad transferir más de 1 embrión, bien sea por baja tasa de recuperación ovocitaria, baja tasa de fertilización o división, se transfiere el único embrión posible así que estos casos no los tenemos en cuenta ya que no es una transferencia selectiva y en la mayoría de los casos se considera mal pronóstico (suelen ser casos de bajas respondedoras con altas dosis de FSH y suelen ser ovocitos de mala calidad). Calculamos el porcentaje de embarazo dentro de nuestro grupo de estudio según el número de embriones transferidos: NÚMERO DE EMBRIONES TRANSFERIDOS PORCENTAJE DE EMBARAZO 1 EMBRION 14,29 2 EMBRIONES 56,52 3 EMBRIONES 62,97. Además hay que tener en cuenta el número de sacos gestacionales dentro de cada grupo de embriones transferidos. 1 SACO 2 SACOS 3 SACOS 2 EMBRIONES TRANSFERIDOS 76,9% 23,1% 0% 3 EMBRIONES TRANSFERIDOS 65% 30% 5%.

RESULTADOS: Para el análisis estadístico utilizamos el programa estadístico SPSS 11.0. La diferencia en la tasa de embarazo transfiriendo 2 o 3 embriones no es significativa, pero si existe diferencia significativa cuando estudiamos el número de sacos gestacionales en la transferencia de 2 o 3 embriones.

CONCLUSIONES: Dados nuestros resultados podemos transferir 2 embriones evitando el embarazo triple sin disminuir el porcentaje global de embarazo. Este es un paso importante para poder plantear en un futuro como nuestro objetivo el de transferir un único embrión sin disminuir significativamente nuestras tasas de embarazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS: -Impact of patients choice for single embryo transfer of a top quality embryo versus double embryo transfer in the first IVF/ICSI cycle. Neubourg DD, Mangelschots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Ryckaert G, Valkenburg M, Barudy-Vasquez J, Gerris J. Hum. Reprod. 2002 Oct; 17 (10):2621-5. -Defining women who are prone to have twins in in vitro fertilization-a necessary step towards single embryo transfer. Hellberg D, Blennborn M, Nilsson S. Assist. Reprod. Genet. 2005 May;22 (5): 199-206.

P. 25.**COMPACTACIÓN EMBRIONARIA TEMPRANA COMO CRITERIO DE SELECCIÓN EMBRIONARIA**

M. Sánchez de Burgos; M. Martínez Burgos; L. Andrés Criado; E. Ricciarelli; ER. Hernández, JM. Cuadros Fernández
Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología "FIV Madrid". Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: En 2002 utilizamos un *score* de selección embrionaria en base a 8 parámetros, con el fin de transferir menos embriones y reducir los embarazos múltiples sin disminuir las tasas de gestación. Desde entonces, hemos continuado valorando otros parámetros, como el inicio de compactación en día 3. En este estudio evaluamos la influencia del inicio de compactación en día 3, considerando la posibilidad de incluirlo en nuestro *score* como otro criterio de selección.

MÉTODOS: Estudio retrospectivo de 228 ciclos de pacientes menores de 39 años, divididas en 2 grupos: el grupo 1 con 28 ciclos (en el que al menos uno de los embriones transferidos en día 3 presentaba inicio de adhesión entre sus células) y el grupo 2 con 200 ciclos (en el que ninguno de los embriones transferidos en día 3 presentaba inicio de adhesión entre sus células). Los embriones transferidos fueron seleccionados en base a nuestro sistema de puntuación. En ningún caso se seleccionaron los embriones por la presencia del inicio de compactación, sino por el índice del *score*.

RESULTADOS: La media de embriones transferidos fue de 2,1 en ambos grupos. En el grupo 1 el porcentaje de b-hCG+ fue de 57,1% (16/28) mientras que en el grupo 2 fue del 48% (96/200). La tasa de embarazo clínico en el grupo 1 fue del 50% (14/28) mientras que en grupo 2 fue del 39% (78/200). En ambos casos el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas. La tasa de implantación embrionaria en el grupo 1 fue de 21/58 (36,2%), mientras que en el grupo 2 fue de 100/149 (23,9%). La diferencia fue estadísticamente significativa ($P<0,05$).

CONCLUSIÓN: El incremento de la tasa de implantación embrionaria muestra que el inicio de compactación en D+3 podría incluirse como criterio de selección de la calidad embrionaria.

P. 26.**LA PRIMERA DIVISIÓN CELULAR DEL EMBRIÓN Y SU RELACIÓN CON LA IMPLANTACIÓN**

M. Sánchez de Burgos; M. Martínez Burgos; L. Andrés Criado; E. Ricciarelli; ER. Hernández y JM. Cuadros Fernández
Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología "FIV Madrid". Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: En nuestro centro, la valoración de la calidad embrionaria se basa en un sistema de puntuación que incluye criterios tales como el número de células, grado de fragmentación citoplásmica, ausencia de blastómeras multinucleadas, igualdad de tamaño de las blastómeras, número de blastómeras uninucleadas, etc. Con el fin de incluir en nuestro *score* más parámetros que nos puedan ayudar a seleccionar los mejores embriones, hemos continuado valorando otros criterios de selección embrionaria, tales como la división temprana. En esta comunicación presentamos la evaluación de la división temprana (DT), definida como la primera división mitótica del embrión a las 26-27 horas después de la microinyección (estadio de dos células), como factor pronóstico de buena calidad embrionaria.

MÉTODOS: En este estudio se incluyeron 59 ciclos de ICSI con transferencia embrionaria, en los que los embriones fueron evaluados a las 27 horas post-microinyección. Se hicieron dos grupos: el grupo DT, con ciclos donde al menos uno de los embriones transferidos presentaba división temprana (41 ciclos) y el grupo NO DT, con ciclos donde ninguno de los embriones transferidos presentó división temprana (18 ciclos). La media de embriones transferidos fue de 2,1 en ambos grupos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de Chi cuadrado. En ningún caso se seleccionaron los embriones por la presencia de división temprana, sino en base a nuestro *score*.

RESULTADOS: La tasa de b-hCG+ en el grupo DT fue de 58,5% (24/41), mientras que en el grupo NO DT fue de 16,7% (3/18). La tasa de embarazo clínico en el grupo DT fue de 43,9% (18/41), mientras que en el grupo NO DT fue de 16,7% (3/18). Las tasas de implantación embrionaria fueron de 25,6% (23/90) en el grupo DT y de 7,7% (3/39) en el grupo NO DT. La comparación entre los ciclos DT y los ciclos NO DT mostró diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) en todos los casos.

CONCLUSIÓN: Nuestros resultados indican que los embriones que inician la división celular a las 27 horas tienen mejores posibilidades de implantar que los embriones que empiezan el ciclo celular más tarde. Por tanto, la evaluación de la división temprana debería ser un criterio a tener en cuenta a la hora de seleccionar los embriones a transferir.

P. 27. GESTACIÓN POR REINSEMINACIÓN CON ICSI TRAS FALLO DE FIV CONVENCIONAL

S. Camacho; I. Galán; V. Badajoz; JA. Gragera; M. Alemañ; MC. Cañadas; JV. Martínez; R. Bonache; S. Lobo, A. Arenaza GINEFIV, Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Presentación de un caso de embarazo al reinseminar ovocitos, mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), tras fallo de fecundación por FIV convencional.

METODOLOGÍA: Paciente de 38 años con esterilidad secundaria de 1 año (descendencia con otra pareja). 4 IAH previas fallidas con actual pareja. En un control ecográfico 48 horas antes de la punción se visualizan 5 folículos de tamaño entre 1,6-1,8 cm y 7 folículos de 1,3-1,5 cm. Tras la punción obtenemos 15 ovocitos. En general, los complejos cúmulo-corona-ovocito presentan buen aspecto, menos en 5 de ellos, que poseen poca filancia y coronas compactas, indicador de un posible retraso en la maduración ovocitaria. El día de la punción la muestra de semen presenta Astenozoospermia, estando el resto de los parámetros dentro de la normalidad. Con un REM de 8×10^6 espermatozoides/ml, es considerada apta para FIV convencional. Debido al posible retraso madurativo de algunos de los ovocitos, inseminamos en 2 tandas: 10 de ellos a las 2 horas tras la punción, y los 5 de aspecto retardado a las 3 horas. Pasadas 18h post-inseminación, tras decumular, confirmamos que 3 de los ovocitos continúan en Metafase-I y en el resto no observamos signos de fecundación. La supervivencia espermática a las 24h es buena, pero no encontramos espermatozoides adheridos a las zonas pelúcidas. Decidimos microinyectar los 12 ovocitos no fecundados que se encuentran en Metafase-II 23h después de la punción.

RESULTADOS: Se obtienen 9 embriones que en día+2 post-inyección valoramos con calidades (0,1,8,0). A pesar de tener una calidad morfológica buena y seguir una velocidad de división normal, se les asignan calidades embrionarias menores debido a la reinseminación. Además, se generaron 3 embriones, procedentes de pre-zigotos polinucleados, que fueron desechados. Se transfieren a la paciente 2 embriones en día+2 (0,1,1,0) y el resto son criopreservados. A los 21 días post-transferencia se realiza una ecografía a la paciente, en la cual se visualiza una vesícula gestacional intrauterina de 6 mm. Se lleva a cabo un seguimiento del embarazo hasta la semana 6+2, en que se realiza un nuevo control ecográfico observándose un desarrollo de la vesícula gestacional hasta 19 mm con un embrión de 4 mm y un saco vitelino de 4mm. Actualmente la paciente se encuentra en la semana 17 de gestación, con una evolución normal del embarazo.

CONCLUSIONES: A la vista de los resultados, consideramos que le re-inseminación mediante inyección intracitoplasmática tras fallo de fecundación por FIV convencional puede ser un método válido en determinados casos para la obtención de embriones viables con capacidad de implantación y desarrollo.

P. 28. IMPLANTACIÓN TRAS ICSI EN DIA +1 (MADURACIÓN *IN VITRO* DURANTE 20 HORAS)

I. Galán; S. Camacho; V. Badajoz; JA. Gragera; M. Alemañ; MC. Cañadas; JV. Martínez; R. Bonache; S. Lobo, A. Arenaza GINEFIV, Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Presentación de un caso de embarazo al inseminar un ovocito mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) tras maduración *in vitro* durante 20 horas.

METODOLOGÍA: Paciente de 30 años que acude a nuestro centro por esterilidad primaria. En un control ecográfico 48 horas antes de la punción se visualizan 2 folículos de tamaño entre 1,3-1,8 cm. Tras la punción obtenemos 1 único ovocito. El complejo cúmulo-corona-ovocito posee poca filancia y un alto grado de compactación de la corona, indicadores de un posible retraso madurativo. Tras decumular el ovocito, se confirma que se encuentra en estadio de Metafase-I, por lo que se decide su cultivo *in vitro* a 37°C con un 6,0% de CO₂ a la espera de que alcance el estadio de Metafase-II, necesario para la microinyección. El día de la punción la muestra de semen presenta Astenozoospermia, siendo el resto de los parámetros normales; la muestra es apta para realizar la microinyección. Pasadas 20 horas se observa que el ovocito decumulado ha alcanzado el estadio de Metafase-II, de modo que se procede a la inyección intracitoplasmática. La morfología y textura del ovocito son de buena calidad.

RESULTADOS: Se obtiene 1 único embrión que en día +2 post-inyección se valora con calidad (0,1,0,0) y es transferido a la paciente. Se origina una gestación que resulta en gestación bioquímica, por lo que no progresa en su desarrollo.

CONCLUSIONES: Los embriones generados tras cultivo *in vitro* de ovocitos inmaduros poseen capacidad de implantación.

P. 29. RESULTADOS DE LOS CICLOS DE OVODÓN EN LOS CINCO AÑOS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN

P. Velarde, M. Figueroa, L. Molina, J. Girón, M. Muñoz, L. Fernández, MJ Aragón MJ, P. Vettori, A. González.
Centro Avanzado de Fertilidad, Jerez de la Frontera.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

OBJETIVOS: Presentamos los resultados obtenidos durante los cinco años de funcionamiento de nuestro centro, correspondientes a ciclos de donación de ovocitos, y buscamos estudiar la eficacia de las donaciones de ovocitos y como han progresado las mismas.

MÉTODOS: Se trata del estudio de los 170 ciclos de ovodón llevados a cabo en nuestra unidad de reproducción asistida y distribuidos en los cinco años que llevamos trabajando. Para el tratamiento de los datos y confección de gráficas se empleó el programa Microsoft Excel 2000.

RESULTADOS: Los resultados obtenidos son, por año: - 2000: 10 donaciones, con una tasa de embarazo por ciclo del 40%. - 2001: 12 donaciones, con una tasa de embarazo por ciclo del 8,33%. - 2002: 22 donaciones, con una tasa de embarazo por ciclo del 31,82%. - 2003: 18 donaciones, con una tasa de embarazo por ciclo del 22,22%. - 2004: 60 donaciones, con una tasa de embarazo por ciclo del 40%. - 2005 (hasta el mes de Julio): 48 donaciones, con una tasa de embarazo por ciclo del 41,83%.

DISCUSIÓN: Como se puede observar, existe un incremento considerable tanto en el número de donaciones como en la tasa de embarazo por ciclo, en los dos últimos años. Esto se ha conseguido tras el asentamiento y desarrollo de los esquemas de trabajo para los grupos de donantes y receptoras, acompañados de adecuadas campañas de información, en ambos grupos.

CONCLUSIÓN: Los ciclos de donación de ovocitos son una importante forma de satisfacer las expectativas de todas aquellas parejas que por distintos motivos no pueden emplear sus propios óvulos, y por ello es importante trabajar en mejorarlos.

BIBLIOGRAFÍA: 1.- Oocyte donation: an assisted reproductive technique. Curr Surg. 2004 Nov-Dec;61(6) : 563-4 Welch M 3rd. 2.- Recipients of oocyte donation : an integrative review. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs. 2004 Sep-Oct;33(5):610-21. Hershberger 3.- The effect of multiple cycles in oocyte donors Am J Obstet Gynecol. 2005 May;192(5) ; 1382-4 Jain A, Robins JC, Williams DB, Thomas MA.

P. 30. INFLUENCIA DE LA LEY 45/2003 EN LAS TASAS DE EMBARAZO

M. Mandiola, A. Guembe, F. Luceño, K. Carbonero, MJ. Iñarra, F. Atutxa, T. Ganzábal, A. López de Larrucea, G. Barrenetxea, R. Jimenez y JA. Aguirregoikoa
Unidad de Reproducción Asistida. Quirón Donostia - Quirón Bilbao.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Con la entrada de la nueva ley de Reproducción Asistida 45/2003 nos hemos visto obligados a limitar el número máximo de embriones transferidos (3) en parejas sometidas a tratamientos FIV-ICSI. Esto ha supuesto un motivo de preocupación sobre todo a las parejas subsidiarias de estos tratamientos que veían que quizá iban a disminuir sus posibilidades de conseguir un embarazo (fracasos repetidos, edad avanzada...). Con este estudio intentamos que disminuya la ansiedad de las parejas.

MÉTODOS: Estudio retrospectivo en la que hemos incluido grupos homogéneos, parejas sometidas a ciclos de Ovodonación FIV-ICSI antes y después de la aplicación de la ley. Hemos incluido 288 ciclos en los que la transferencia no estaba limitada y 194 ciclos después de la publicación de la ley. Las donantes de ovocitos se sometieron a procesos de estimulación estándar siguiendo el crecimiento folicular bajo control ecográfico. La captación ovocitaria se realizó 36 horas después de la inyección de hCG, y los ovocitos se inseminaron usando FIV o ICSI según las características propias de la pareja. La transferencia embrionaria en el útero de la receptora se realizó en D+2 previa preparación hormonal del endometrio. A los 14 días se determinó si se había producido o no embarazo.

RESULTADOS: Nº EMBRIONES Nº CICLOS Nº EMBARAZOS % EMBARAZO ET=4 212 104 49,04 ET<3 194 94 48,45

CONCLUSIONES: Los porcentajes de embarazos conseguidos en parejas sometidas a técnicas de ovodonación FIV-ICSI no han sufrido variación con la limitación del número de embriones transferidos con la ley 45/2003. Esto ha supuesto un gran alivio en las parejas que acudiendo a nuestras consultas presentaban esa duda y que se ha podido comprobar que sus posibilidades de embarazo por ciclo no se han visto modificadas.

P. 31.**PAPEL DEL HATCHING ASISTIDO (HA) EN LA MEJORA DE LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS DE ICSI**

M. Lara, C. Alonso, B. Buch, C. Segura, M. Martínez Moya. Unidad de Reproducción Centro Gutenberg. Málaga.

Tipo: **Gametos y Embriones****OBJETIVO:** El objeto de este estudio es comprobar si existen diferencias en tasas de embarazo y de implantación entre ciclos de ICSI donde se realizó HA respecto a los que no, distinguiendo en ellos grupos de edad y calidad embrionaria.**MATERIAL Y MÉTODO:** Se presenta un estudio comparativo de los resultados de 583 ciclos de ICSI con transferencia embrionaria realizados entre Abril de 2004 y Julio de 2005. Se realizó HA en 111 casos. Las indicaciones fueron: alteraciones de la zona pelúcida, edad, calidad embrionaria, fallos previos de implantación. La transferencia embrionaria se realizó en día +3 con un máximo de 3 embriones. El AHA se realizó con Ac. Tyrode's 30-60 minutos antes de la transferencia. Los medios de cultivo utilizados fueron los de la serie G III de Vitrolife. Se comparan los resultados entre ciclos sin y con HA distinguiendo tres grupos en función de la calidad de los embriones transferidos y a su vez diferenciando por rangos de edad. - Grupo A: ciclos en los que se transfirió al menos 2 embriones de buena calidad. - Grupo B: ciclos en los que se transfirió 1 embrión de buena calidad y 1 ó 2 embriones de intermedia o mala calidad. - Grupo C: ciclos con trasferencias de 2 ó 3 embriones de intermedia o mala calidad.**RESULTADOS:** Se comparan los resultados de ciclos sin HA vs ciclos con HA. GRUPO A: <30 años nº pac. 53 vs 4, tasa emb. 54,71% vs 25% , tasa impl. 30,18% vs 27,58%; 30-34 años nº pac. 153 vs 14, tasa emb. 60,78% vs 42,85% , tasa impl. 38,18% vs 27,58%; 35-39 años nº pac. 100 vs 18, tasa emb. 49% vs 33,33%, tasa impl. 26,76% vs 14,63%; 40-42 años nº pac. 10 vs 9 tasa emb. 20% vs 33,33%, tasa impl. 13% vs 9%; >42 años nº pac. 2 vs 2 , tasa emb. 0% vs 0%. GRUPO B : <30 años nº pac. 14 vs 1, tasa emb. 21,42% vs 100% , tasa impl. 0% vs 50%; 30-34 años nº pac. 41 vs 11, tasa emb. 39,02% vs 45,45% , tasa impl. 22,22% vs 33,33%; 35-39 años nº pac. 30 vs 14, tasa emb. 30% vs 55,55%, tasa impl. 12,69% vs 14,70%; 40-42 años nº pac. 16 vs 6 tasa emb. 12,5% vs 66,66%, tasa impl. 6,89% vs 40%; >42 años nº pac. 2 vs 4 , tasa emb. 0% vs 25%, tasa impl. 0% vs 20%. GRUPO C : <30 años nº pac. 4 vs 3 tasa emb. 25% vs 66,66% , tasa impl. 0% vs 37,5%; 30-34 años nº pac. 14 vs 10, tasa emb. 28,57% vs 60% , tasa impl. 17,24% vs 14,8%; 35-39 años nº pac. 29 vs 10, tasa emb. 24,13% vs 30%, tasa impl. 8,95% vs 9,52%; 40-42 años nº pac. 2 vs 4 tasa emb. 0% vs 50%, tasa impl. 0% vs 22,22%; >42 años nº pac. 2 vs 0 , tasa emb. 0% tasa impl. 0%.**DISCUSIÓN:** Los resultados globales demuestran beneficio del HA en pacientes de edad avanzada. En los resultados por grupos se observa mejor tasa de gestación y de implantación en los grupos B y C cuando se realiza HA. En el grupo A solo se observa diferencia en este sentido en las pacientes de edad avanzada.**CONCLUSIONES:** Los resultados demuestran que el HA es una técnica beneficiosa en los siguientes casos: 1- Ciclos en los que no se consigue más de 1 embrión de buena calidad. 2- En pacientes mayores de 39 años. Sería necesario ampliar el estudio y el nº de casos para obtener mejores conclusiones.**BIBLIOGRAFÍA:** 1. Cohen J. Assited Hatching of human embryos. J In Vitro Fert Embryo Transfer, 1991;8:179. 2. Katayama KP. Assited Hatching. The current status and future projections. Assist Reprod Rev, 1994; 4:33. 3. Calderón G, Prados N. Mejora en la viabilidad embrionaria tras Assisted Hatching y aspiración de fragmentos. 24 Congreso nacional SEF, Mallorca 2002, 255-256.**P. 32.****DETERMINACIÓN DE ENZIMAS GLICOSIDASAS EN EL LÍQUIDO FOLICULAR HUMANO**J. Marcos ^{1,2}, M. Avilés ¹, E. Gomes ², J. Landeras ², J. Ballesta ¹. ¹Depto. Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. ²IVI Murcia.Tipo: **Gametos y Embriones**El líquido folicular (LF) es un fluido que ocupa la cavidad antral de los folículos ováricos. Este LF se forma por filtración del plasma sanguíneo y por secreciones de las células del cúmulo y células de la granulosa¹. Diferentes estudios han demostrado que el LF y en particular algunos de sus componentes podrían jugar un papel destacado en la fisiología del ovocito (maduración) y del espermatozoide (reacción acrosómica)^{3,4}. Los carbohidratos parecen desempeñar una importante función en los procesos de reconocimiento celular entre espermatozoide-ovocito y espermatozoide-oviducto⁵. La presencia de estos carbohidratos puede estar regulada por la existencia de glicosidasas específicas.**OBJETIVO:** Analizar la composición del líquido folicular humano y en particular la existencia de diferentes glicosidasas.**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se analizaron cinco muestras de LF humano procedentes de pacientes sometidas a tratamiento de reproducción asistida. El LF se recogió mediante punción de folículos ováricos con un tamaño entre 13 y 20 mm. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 500g durante diez minutos para separar la parte hemática. Se determinó mediante fluorimetría la existencia de las siguientes glicosidasas: a-L-Fucosidasa, a-Galactosaminidasa, -Glucosaminidasa, -Manosidasa, Neuraminidasa, a-Galactosidasa y -Galactosidasa. Los enzimas fueron incubados en tampón PBS (pH 7) durante una hora a 37°C en presencia del sustrato específico.**RESULTADOS:** Se observó actividad específica para los enzimas -L-Fucosidasa y -Manosidasa, siendo la actividad de 60 y 2,5 unidades relativas de fluorescencia respectivamente. No se detectó actividad alguna con el resto de enzimas estudiadas.**DISCUSIÓN:** La composición del LF ha sido analizada previamente⁶; sin embargo, hasta la fecha no ha sido descrito la presencia de glicosidasas en la especie humana. El papel de estas glicosidasas permanece sin esclarecer pero diferentes estudios nos hacen sugerir que podrían estar involucradas en diferentes procesos. Así, podría participar en la modificación de los carbohidratos presentes en las glicoproteínas de la zona pelúcida (maduración zonal) y ser clave en el proceso de reconocimiento espermatozoide-zona pelúcida. Por otro lado, en el momento de la ovulación, una fracción del LF se introduce en el oviducto, en éste se producen múltiples interacciones espermatozoide-oviducto mediadas por carbohidratos pudiendo ser moduladas por la presencia de diferentes glicosidasas del LF y/o del fluido oviductal.**CONCLUSIÓN:** En este estudio demostramos la presencia de diferentes glicosidasas siendo la enzima -L-Fucosidasa la más abundante. en el líquido folicular humano Estudios futuros son necesarios para determinar el significado funcional de la presencia de estas glicosidasas en el líquido folicular humano.**BIBLIOGRAFÍA:** 1. Godsen et al. (1988). Journal of Reproduction and Fertility, 82, 813-825. 2. Dong et al. (1996). Nature, 383, 531-535; Simon et al. (1997). Nature, 385, 525-529. 3. Tesarik et al. (1985). Journal of Reproduction and Fertility, 74, 383-388 4. Yeung et al. (2003). Journal of Biological Chemistry, 278, 13570-13577. 5. Alhadeff et al. (2003). Biology of Reproduction, 68, 709-716. 6. Thompson et al. (2003). Human Reproduction, 9, 35-48.

Estudio financiado por la DGCYT BFU2004-05568.

P. 33.

LOS EMBRIONES CON HALO CITOPASMÁTICO EN DÍA 1 INFLUYEN POSITIVAMENTE EN LA CALIDAD EMBRIONARIA

Mt. Cañete Reina; P. Torres Tonda; A. Sánchez Oliver; A. Lami, C. Martínez García-Otero. C.I.V.T.E., Sevilla.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Valorar la evolución de los embriones halo-positivo en los ciclos de FIV e ICSI con transferencia.

METODOLOGÍA: Se realizó un estudio prospectivo de 65 pacientes, 15 pacientes de FIV y 50 de ICSI. Del total de las pacientes el 15% tenían esterilidad sin causa aparente, el 12% fallo ovárico, el 11% endometriosis y el 8% obstrucción tubárica y el 54% factor masculino. De las 65 pacientes se estudiaron todos los embriones de cada una de ellas en estadio de pronúcleos en día +1 visualizando la presencia o ausencia de halo citoplasmático. Se valoró morfología pronuclear, vacuolización, tamaño de pronúcleos y granulación citoplasmática. Fueron transferidos los embriones de mejor calidad en día 2-3.

RESULTADOS: De las 65 pacientes un total de 514 ovocitos eran metafase II. Utilizando las técnicas de FIV o ICSI, el 72,5% de los ovocitos se fecundaron correctamente, no hubo diferencia en la tasa de fecundación entre pacientes de FIV o ICSI. La edad media de la mujer era de 34 años; el nº de ovocitos maduros por FIV fue 110 y de ICSI. Se obtuvieron 71,3% embriones por FIV y el 74,1% por ICSI, de los cuales eran halo positivo el 69% y el 52% respectivamente. El porcentaje total de halo positivo fue de 56,4%. Al 75,4% de las pacientes se le transfirieron embriones halo positivo, de las cuales el 33,8% presentaban todos los embriones halo, el 23,1% 2 de cada 3 embriones presentaban halo, el 15,4% presentaban 1 de cada 3 halo y finalmente el 3,1% uno de los dos lo tenían. Al 48% de las pacientes se le transfirieron embriones sin fragmentación. Respecto de las 18 pacientes embarazadas, al 83,4% de estas se le transfirieron embriones halo-positivo, resultando un 27,7% la tasa de embarazos y un 10,6% la tasa de implantación.

DISCUSIÓN: El halo consiste en una zona translúcida subplasmática, inmediatamente anterior a la formación de los pronúcleos masculino y femenino y que progresa hasta completar la corteza citoplasmática (Payne et al, 1997). Este fenómeno es la manifestación de una translocación mitocondrial organizada por los microtúbulos, así como, otros componentes citoplasmáticos en el centro del ovocito. Scott y Smith (1998) fueron los primeros en atribuir cierto valor pronóstico a la presencia de halo, pero su impacto directo sobre la tasa de implantación sólo puede ser estimada. La subdivisión de halos podría ayudar a dilucidar su papel pronóstico en laboratorios de FIV. **CONCLUSIÓN:** La ICSI no tiene influencia en la formación ni extensión de halo. La transferencia exclusiva de embriones halo- positivo supone una tasa de embarazo mayor que de embriones que derivaban de embriones halo- negativo. Por tanto los embriones que deben ser elegidos para transferencia serán aquellos que muestren un patrón pronuclear bueno y cualquier tipo de halo en día 1.

BIBLIOGRAFÍA: T.Ebner, M.Moser, M. Sommergruber, U.GaisWinkle, R. Wiesinger, M.Puchner y G.Tews. (2003). Presence, but not or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. Hum. Reprod; 18, 2406-2412. Senn A, Urner F, Chanson A, Primi MP, Wirthner D, Germond M. (2005) Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. Hum. Reprod; Balaban,B., Urman,B., Isiklar,A., Alatas,C., Aksoy,S., Mercan,R.,Mumcu,A. and Nuhoglu, A. (2001) The effect of pronuclear morphology embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. Hum. Reprod; 16, 2357-2361. Ebner, T.,Moser,M., Sommergruber,M.,Puchner,M., Wiesinger, R. And Tews, G. (2003a) Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. Hum. Reprod; 18,1294-1298. Montag, M and Van der Ven, H. (2001) Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. Hum. Reprod; 16, 2384-2389. Payne,D., Flaherty, SP. Barry,M.F. and Mathews, C.D. (1997) Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear fom score as a prognostic tool in IVF treatment. Hum. Reprod; 12, 705-708. Salumets, A., Hyden-granskog, C.,Suikkari, A.M., Tiitinen, A. And Tuuri, T. (2001) The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum. Reprod; 16,2177-2181. Scott, L.A.(2003) Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. RBM Online, 6, 201-214. Scott, L.A. and Sith, S. (1998) The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. Hum. Reprod; 13,1003-1013. Scott, L.A.,Alvero,R., Leondires, M. Miller,B.(2000) The morphology of pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum. Reprod; 15, 2394-2403.

P. 34.

RELACIÓN DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y DE LA EDAD MATERNA CON LA TASA DE EMBARAZOS EN I.A.C.

B. Corcóstegui, R. Mendoza, A. Expósito, A. Fernández, O. Ramón, B. Prieto, JC. Melchor, R. Matorras. Laboratorio Andrología. URH. Hospital de Cruces.

Tipo: **El laboratorio de embriología**

OBJETIVO: Valorar la influencia que la morfología espermática y la edad materna tienen sobre las tasas de embarazo en ciclos de inseminación conyugal (IAC).

MATERIAL Y MÉTODOS: 186 ciclos de ciclos de IAC realizados en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital de Cruces (Vizcaya) durante el año 2004. En ellos estudiamos la edad materna y la morfología espermática analizada con los criterios estrictos de Kruger tanto en el grupo en que se consiguió el embarazo (n=74) como en el que no se produjo gestación (n=112). Únicamente han entrado en ciclo, pacientes con <40 años.

RESULTADOS: No hemos encontrado diferencias significativas entre los grupos con embarazo o no en cuanto a la edad materna (34,52±3,40 vs 35,35±3,23) ni en cuanto a la morfología espermática (16,11±8,25 vs 17,20±9,45).

CONCLUSIONES: En función de estos resultados no parece que en nuestro medio, ni la edad materna ni la morfología espermática tengan relación con la obtención de un embarazo en ciclos de IAC.

P. 35.**RENDIMIENTO EN CICLOS ICSI CON AGONISTAS vs ANTAGONISTAS DE LA GnRH**

PR. Duque, LM. Menes, N Alonso-Buenaposada, M. Vazquez, R. Mendez, B. Manzano, PE. de la Fuente, C. García-Ochoa.
Centro de Fertilización *In Vitro* de Asturias (CEFIVA) Gijón.

Tipo: Gametos y Embriones

OBJETIVO: El objetivo de este estudio ha sido analizar si existe una relación entre el protocolo de estimulación ovárica (agonistas vs antagonistas de la GnRH) y el rendimiento de la técnica, medido en términos de número de ovocitos totales, número de ovocitos maduros (MII) obtenidos y porcentaje de ovocitos maduros (MII) que presentan algún tipo de anomalía morfológica.

METODOLOGÍA: Estudio retrospectivo de 141 ciclos consecutivos de ICSI en los que se analizó la influencia del protocolo de estimulación ovárica (37 ciclos con agonistas y 104 con antagonistas de la GnRH) sobre el número de ovocitos totales, número de ovocitos maduros (MII) obtenidos y sobre el porcentaje de ovocitos maduros (MII) que presentaban algún tipo de anomalía morfológica (alteraciones del citoplasma, de la zona pelúcida, del corpúsculo polar o del espacio perivitelino).

RESULTADOS: Protocolo N N°Ovo Tot N°Ovo MII % Ovo MII %Ovo MII con por ciclo por ciclo por ciclo anomalías Agonistas 37 5,91±3,07* 4,30±0,45* 72,55 52,13 Antagonistas 104 7,57±3,71* 5,76±3,07* 73,06 58,89 * ($P<0,05$) En los ciclos en los que se empleó un antagonista de la GnRH se obtuvo un mayor número de ovocitos totales por ciclo ($P<0,05$) que en aquellos en los que se empleó un agonista, sin embargo no tuvo influencia sobre el porcentaje de ovocitos maduros (MII) ni tampoco sobre el porcentaje de ovocitos maduros (MII) que presentaban anomalías morfológicas.

DISCUSIÓN: El protocolo de estimulación ovárica (agonistas vs antagonistas de la GnRH) tuvo influencia sobre el número de ovocitos totales recuperados tras la punción, sin embargo no tuvo influencia sobre el porcentaje de ovocitos maduros (MII). No se encontraron diferencias en el porcentaje de ovocitos maduros (MII) que presentaban algún tipo de anomalía morfológica. Este hecho, pondría de manifiesto que el descenso en el porcentaje de gestación descrito en la literatura con el uso de antagonistas, no estaría relacionado con la calidad ovocitaria.

CONCLUSIONES: 1. El número total de ovocitos recuperados por ciclo fue mayor cuando se empleó un antagonista de la GnRH. 2. El porcentaje de ovocitos maduros (MII) obtenidos por ciclo fue similar en ciclos con agonista o antagonista de la GnRH. 3. No se encontraron diferencias entre los dos tipos de protocolos en el porcentaje de ovocitos maduros (MII) con anomalías morfológicas.

P. 36.**DESCRIPCIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN DEL PATRÓN MORFOMÉTRICO DE EMBRIONES TRANSFERIDOS EN DÍA 3 CON CAPACIDAD IMPLANTATORIA**

A. Camarena, G. Pérez-Bermejo, I. Peinado, M. De la Orden, CC. Duque, I. Molina y P. Fernández.
Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Tipo: Gametos y Embriones

OBJETIVO: estudio de los aspectos morfométricos que caracterizan a los embriones transferidos e implantados en D+3 tras un ciclo FIV/ICSI.

METODOLOGÍA: se analizaron prospectivamente 8 embriones transferidos a pacientes que se efectuaron una fecundación *in vitro* en el Hospital Universitario La Fe de Valencia de Febrero a Marzo del presente año. El análisis morfométrico se realizó mediante el programa informático de análisis de imagen CRONUS 3.1. Los parámetros estudiados fueron: diámetro medio del embrión; perímetro, área sección, diámetro máximo y mínimo de las blastómeras; porcentaje y tamaño de los fragmentos; perímetro externo e interno, área sección, grosor medio sección y anomalías de la zona pelúcida.

RESULTADOS: el análisis morfométrico del embrión implantatorio en D+3 viene definido por: diámetro medio embrión (125±9µm); perímetro (169±18µm), área sección (2155±486µm²), diámetro máximo (57±7µm) y mínimo (46±7µm) de las blastómeras; porcentaje y tamaño fragmentación (90% embriones fragmentados (100% pequeño tamaño) pero siempre <150%); área sección (6665±2905µm²), grosor medio sección (19±4µm), perímetro externo (524±25µm) e interno (400±13µm) de la zona pelúcida.

CONCLUSIONES: Los embriones transferidos en D+3 cuyos parámetros estén dentro de los rangos anteriormente citados, tienen un alto potencial implantatorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Desau N, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM.: Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. Human Reproduction 2000; 15: 2190-2196. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R.: Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. Human Reproduction 1995; 10: 2427-2431. Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W.: Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. Reproductive Biology 2004; 4: 5-22. Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wiker SR, Wright G.: Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. Fertil Steril 1989; 51: 820-827. Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KL, Loft A, Lindhard A, Nyboe: Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. Human Reproduction 2004; 19: 1457-60.

P. 37. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS FACTORES CON INFLUENCIA EN LAS TASAS DE EMBARAZO EN UN PROGRAMA FIV

T. Ganzabal¹, A López de Larruzea¹, A. Guembe², F. Luceño², M. Mandiola², JA. Agirregoikoa¹, MR. Jiménez¹, G. Barrenetxea^{1,3}
Quirón Bilbao.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: Han sido muchos los factores que han sido relacionados con las tasas de éxito en un programa de fertilización *in vitro* (FIV). Sin embargo, se hace necesario un estudio de la independencia de los factores predictores mediante un adecuado análisis multivariante.

OBJETIVOS Conocer la influencia que de forma independiente puedan tener diferentes factores clínicos y de laboratorio en las tasas de éxito gestacional en un programa FIV

MATERIAL Y MÉTODOS: Se estudian de forma retrospectiva un total de 654 ciclos de fertilización *in vitro* llevados a cabo en Quirón Bilbao durante los años 2003 y 2004. No se incluyen en el presente análisis los ciclos en los que se realizó una transferencia de blastocistos. Asimismo, se excluye el programa de ovodonación. Se analizaron variables como la edad de las pacientes, número de intentos previos, ovocitos obtenidos, embriones fertilizados y transferidos, *score* embrionario (desarrollo y fragmentación) y grado de dificultad de la transferencia embrionaria y su implicación en las tasas de embarazo e implantación. Las variables cuantitativas se compararon mediante la t para muestras independientes (utilizando previamente la prueba de Levene para homogeneidad de las varianzas). Se utilizaron tablas de contingencia y el test de 2 para variables cualitativas. Se aseguró la independencia de los factores estudiados mediante un análisis multivariante.

RESULTADOS: Se estudiaron un total de 654 ciclos. En un 81,80% (n=535) de los ciclos la fertilización *in vitro* fue llevada a cabo mediante una microinyección espermática. La edad media de las pacientes fue de 35,43±0,18 años (25-49). Se registraron un total de 250 embarazos (38,2% por ciclo). Las tasas de embarazo fueron diferentes en función del número de embriones transferidos (11,9%, 20,0%, 43,6% y 45,1% para transferencias de 1, 2, 3 y 4 embriones respectivamente) (2 de Pearson 32,677; P=0,0001). La tasa global de implantación fue del 18,4% por embrión transferido). También la posibilidad de selección de embriones para la transferencia se asoció con unas superiores tasas de embarazo (49,0% vs 28,9%; 2=21,702; P=0,0001). El *score* embrionario en lo que respecta a los 3 primeros embriones difirió de forma significativa en los ciclos en los que se consiguió un embarazo frente a los que se fracasó (P=0,0001). No encontramos diferencias en las tasas de embarazo en función del número de intento, ni de la mejor o peor visualización ecográfica o dificultad durante la transferencia. Mediante análisis multivariante solamente la edad de las pacientes, el número de embriones transferidos, la existencia de embriones sobrantes y el *score* del segundo embrión transferido demostraron una asociación independiente con las tasas de embarazo.

CONCLUSIONES: Las tasas de embarazo en fertilización *in vitro* se asocian con parámetros clínicos y de laboratorio aunque solamente algunos de ellos soportan un análisis multivariante.

P. 38. CARACTERÍSTICAS SEMINALES BASALES EN FUNCIÓN DE LA ABSTINENCIA. ESTUDIO A PARTIR DE MUESTRAS PREVIO A SU PROCESAMIENTO EN UN PROGRAMA DE INSEMINACIONES INTRAUTERINAS

T. Ganzabal¹, A López de Larruzea¹, A. Guembe², F. Luceño², M. Mandiola², JA. Agirregoikoa¹. Quirón Bilbao.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: Tradicionalmente, se ha dictaminado que la limitada producción diaria de espermatozoides aconseja una abstinencia determinada para conseguir una concentración adecuada tanto cara a la reproducción natural como en determinadas técnicas de reproducción asistida.

OBJETIVOS: Conocer la variabilidad de diferentes características seminales (volumen, concentración espermática, movilidad porcentual y absoluta) en función de la abstinencia previa a la obtención de la muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS: El protocolo de tratamiento mediante inseminaciones intrauterinas con semen conyugal (IAC) en Quirón Bilbao incluye la realización de 2 inseminaciones por ciclo. Ello permite, además de la obtención de resultados ya comunicados, analizar las características seminales basales en ambas muestras. La primera muestra (M1) es obtenida tras 3-4 días de abstinencia. La segunda muestra (M2) se obtiene tras una abstinencia inferior a 24 horas. Los parámetros analizados incluyen volumen de la muestra, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva rápida y/o movilidad progresiva lenta (en zig-zag) y número total de espermatozoides móviles. Se han comparado tales parámetros en ambas muestras mediante un análisis de la varianza para muestras independientes (tras la comprobación de homogeneidad de los datos mediante la prueba de Levene).

RESULTADOS: Se han analizado un total de 1984 muestras seminales (992 M1 y 992 M2). Volumen (cc) Concentración (millones/cc) M1 2,77±0,04 48,22±0,79 M2 2,29±0,03 43,93±0,70 F 87,58 16,57 p 0,000 0,000 Mov. Progresiva (A) (%) Mov. P. lenta (B) (%) Mov. Total (A+B) (%) Espermatozoides móviles (nx106) M1 8,76±0,30 35,90±0,57 44,66±0,65 54,84±0,65 M2 10,09±0,32 35,90±0,37 45,99±0,50 45,99±0,50 F 9,24 0,00 2,69 50,44 P 0,002 0,996 0,101 0,000 * media ± error típico de la media Tanto el volumen seminal como la concentración de espermatozoides fueron significativamente superiores tras una abstinencia de 3 días. Aunque el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva fue superior el segundo día (tras una abstinencia corta) el número total de espermatozoides móviles fue significativamente superior tras la abstinencia prolongada (3 días).

CONCLUSIONES: Una abstinencia de 3 días permite la obtención de una muestra seminal con una mayor concentración de espermatozoides tanto total como de espermatozoides móviles.

P. 39.**PARÁMETROS SEMINALES POST-PROCESAMIENTO Y RESULTADOS EN UN PROGRAMA DE INSEMINACIONES INTRAUTERINAS CONYUGALES. ANÁLISIS MULTIVARIANTE**T. Ganzabal ¹, A López de Larruzea ¹, A. Guembe², F. Luceño ², M. Mandiola ², K. Carbonero². Quirón Bilbao.Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: Las características del semen obtenido tras el correspondiente procesamiento se han relacionado con las tasas de éxito en programas de inseminaciones intrauterinas conyugales (IAC). Sin embargo, solamente un adecuado análisis multivariante es capaz de determinar aquellas que influyen de forma independiente en los porcentajes de éxito gestacional.

OBJETIVO: Conocer los parámetros seminales relacionados con la probabilidad de embarazo en un programa de inseminación intrauterina.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se analizaron de forma retrospectiva un total de 828 ciclos realizados en 333 pacientes entre Enero de 2002 y Diciembre de 2004 en Quirón Bilbao. Se excluyeron los ciclos de inseminación con semen congelado o de donante. Las parejas fueron incluidas en el protocolo de tratamiento una tras completar el correspondiente estudio diagnóstico. Sólo se indicó la IAC si el número de espermatozoides post-procesamiento con movilidad era igual o superior a 5x10⁶. La capacitación espermática se realizó mediante gradientes de densidad (Pure Sperm® Nidacom) y lavado mediante G-Sperm® (Vitrolife). Se programaron un máximo de 4 ciclos por pareja realizándose 2 inseminaciones por ciclo. Dentro de los parámetros seminales analizados, se incluyeron la concentración, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y total y el número absoluto de espermatozoides introducidos en cada inseminación. Se realizó un análisis multivariante para comprobar la independencia de los posibles parámetros seminales con capacidad de influencia en los resultados finales. El procedimiento multivariante permite un análisis de regresión para variables dependientes múltiples con una o más covariables.

RESULTADOS: Se diagnosticaron un total de 185 embarazos clínicos (22,34% por ciclo). Cuarenta y uno de los embarazos no fueron evolutivos (abortos o ectópicos (22,16%). El análisis de los parámetros seminales no permitió determinar ningún parámetro seminal que influyera en la tasa de embarazos (a diferencia de parámetros clínicos) 95% IC P Día 1 Concentración -2,566 (-6,78)-(1,16) 0,232 Motilidad (%) 0,601 (-1,86)-(3,06) 0,632 Motilidad progresiva (%) -0,594 (-3,33)-(2,15) 0,671 Espermatozoides móviles (nx10⁶) -0,666 (-2,33)-(1,00) 0,443 Día 2 Concentración -3,100 (-6,81) - (0,61) 0,101 Motilidad (%) 1,884 (-0,47)-(4,24) 0,117 Motilidad progresiva (%) 0,365 (-2,33) - (3,06) 0,790 Espermatozoides móviles (nx10⁶) -0,696 (-2,16) - (0,77) 0,351 : Coeficiente corregido (Constante= -1,233)

CONCLUSIONES: A pesar de que tradicionalmente se han relacionado factores seminales con el éxito reproductivo en inseminaciones, los factores clínicos parecen tener un mayor valor predictivo. Ello es explicable por el establecimiento de unos parámetros mínimos de capacitación seminal para la realización de esta técnica.

P. 40.**¿ES POSIBLE REALIZAR CAMBIOS QUE MEJOREN LOS RESULTADOS DE LAS IAH?**

M, Eibert, A. Calderon, M. Martín, G. Castillon, I. Sanchez, G. Calderon, A. Ballesteros. IVI, Barcelona.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: La inseminación artificial es una de las técnicas de reproducción asistida más comunes en el mundo y el porcentaje de éxito que se publica hoy en día varía entre un 13-18% por ciclo. Aunque aparentemente se trata de una técnica sencilla hay muchos factores que pueden influir en su éxito.

OBJETIVOS: Los objetivos de nuestro trabajo fueron dos. En primer lugar organizar y estabilizar el programa de inseminación artificial en nuestro nuevo centro y en segundo lugar superar la tasa de éxito por ciclo que refleja la bibliografía.

METODOLOGÍA: Para que una pareja fuera incluida en el programa de IAH se intentaba que el REM diagnóstico del paciente fuera superior a 3 millones de espermatozoides progresivos totales. La media de edad de las pacientes fue de 34,07±3,18 años. La estimulación de la paciente se consiguió mediante FSH, empezando el tercer día de ciclo. La paciente acudió cada 2-3 días a la clínica para ser valorada mediante ecografía y nivel de estradiol. Cuando se consiguieron de dos a tres folículos de 18-19 mm se suministró una inyección de hCG y tras 24 y 48 horas se procedió a la inseminación intrauterina. Los principales puntos que se pretendieron seguir fueron: 1) la muestra se debía conseguir siempre en el masturbatorio de la clínica tras 3-5 días máximo de abstinencia; 2) se procedió tan pronto como fuera posible a la inseminación artificial tras la recuperación de los espermatozoides mediante gradientes de densidad; 3) se efectuó un minucioso lavado del cérvix y vagina con medio de cultivo (HTF y estreptomycinina al 10%, a 37°C y 5% CO₂) para retirar el moco; 4) se usó una cánula suave (Wallace) intentando ser lo menos traumático posible y sin la menor presencia de aire en dicha cánula; 5) la inseminación se realizó bajo control ecográfico

RESULTADOS: Se han realizado 40 inseminaciones intrauterinas a un total de 31 pacientes desde Diciembre de 2004 hasta Septiembre de 2005. Los resultados de las inseminaciones han sido muy satisfactorias, consiguiendo un 32,5% de gestación por ciclo y un 42,0% por paciente.

CONCLUSIONES: Aunque el número de casos realizados hasta la fecha es pequeño porque el centro acaba de abrir sus puertas, pensamos que las medidas que hemos tomado son adecuadas. Realizando el proceso lo más cuidadosamente posible y minimizando el tiempo pasado tras la recuperación de los espermatozoides y la inseminación se pueden elevar las probabilidades de embarazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: *Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Janssen M, Nijs M. Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online*. 2003 Oct-Nov;7(4):485-92 *Janne-Meije van Weert, Sjoerd Repping, Bradley J. Van Voorhis, Fulco van der Veen, Patrick M.M. Bossuyt and Ben W.J. Mol Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: A meta-analysis *Fertility and Sterility*, Volume 82, Issue 3, September 2004, Pages 612-620 * Huang A, Ambartsumyan G, Ghadir S and . Decherney A. Abdominal ultrasound-guided intrauterine inseminations (IUI) as a means of fellowship training for embryo transfers (ET) *Fertility and Sterility*, Volume 82, Supplement 2, September 2004, Pages S261-S261 *Yavas Y, Selub MR Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertil Steril*. 2004 Dec;82(6):1638-47. *Paul B. Miller, M. Lee Acres, J. Glenn Proctor, H. Lee Higdon III and William R. Boone Flexible versus rigid intrauterine insemination catheters: A prospective, randomized, controlled study *Fertility and Sterility*, Volume 83, Issue 5, May 2005, Pages 1544-1546.

P. 41. LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA COMO CRITERIO FUNDAMENTAL PARA DETERMINAR LA TÉCNICA DE FECUNDACIÓN EN EL LABORATORIO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV)

R. Herrero, J. Serna, L. Herrero, Rosario Barría, JA. García-Velasco, Y. Mínguez. IVI, Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Determinar la importancia de la morfología espermática a la hora de decidir la técnica de fecundación (FIV convencional o microinyección intracitoplasmática, ICSI) en el laboratorio de FIV.

METODOLOGÍA: Estudio retrospectivo de 105 primeros ciclos de FIV/ICSI con morfología espermática realizada el mismo día de la aspiración ovocitaria o con seminograma previo en el centro, de los que se realizaron 101 transferencias. Se han estudiado un total de 1365 ovocitos. La media de edad de las pacientes fue de 34 años. Se obtuvo una media de 13,6 ovocitos por aspiración, de los cuales un 48% se destinaron a FIV convencional, mientras que un 52% se microinyectaron. La tasa de fecundación fue de un 58% tanto en FIV como en ICSI y se transfirió una media de 2,3 embriones en día +2 ó +3 de desarrollo. La tasa de gestación fue de un 53% y la de implantación de un 29,6, siendo la de gestación gemelar de un 28% y la de triples de un 3,7%. Para cada paciente se calculó la tasa de fecundación con FIV y con ICSI y la concentración de espermatozoides progresivos normales (EPN) de cada muestra seminal en fresco, diferenciándose en cuatro grupos: Grupo I: ciclos con hasta 0,2 millones/ml de EPN; Grupo II: ciclos entre 0,3 y 0,4 millones/ml de EPN; Grupo III: ciclos entre 0,5 y 0,6 millones/ml de EPN; Grupo IV: ciclos entre 0,7 y 1,5 millones/ml de EPN; Grupo V: ciclos entre 1,6 y 2,3 millones/ml de EPN; Grupo VI: ciclos entre 2,4 y 6,4 millones/ml de EPN, último valor del estudio (TABLA 1).

RESULTADOS: Tabla 1- Tasa de fecundación con FIV y con ICSI en función de la concentración de espermatozoides móviles progresivos normales. Se comparan los ovocitos fecundados con FIV y con ICSI en cada grupo.

	TASA FECUNDACIÓN FIV	TASA FECUNDACIÓN ICSI
Grupo I.	52% (63/122)	60% (84/141)
Grupo II	57% (74/129)	54% (76/144)
Grupo III	64 (78/121)	57 (68/120)
Grupo IV	57 (62/108)	71 (78/109) <i>P</i> <0,001 chi square
Grupo V	46%(47/101)	57 (54/94)
Grup VI	67% (56/84)	59%(54/92) <i>P</i> <0,001 chi square

CONCLUSIONES: La morfología espermática por sí misma no es un criterio determinante a la hora de elegir la técnica de fecundación en el laboratorio de FIV, ya que para los tres primeros grupos no hay diferencias significativas. Curiosamente, en los grupos IV y VI sí se aprecia diferencia estadística, que será objeto de estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA: - M. Planchot et al. Outcome of convencional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild males factor infertility.; Hum. Reprod vol 17, No2, pp 362-369, 2002. - Grigoriou O, et al. Impact of isolated teratozoospermia on the outcome of intrauterine insemination; Fertil. Steril. 2005, Mar; 83 (3), 773-5.

P. 42. TASAS DE DIVISIÓN E IMPLANTACIÓN DE PREEMBRIONES BIOPSIADOS: DGP

MJ. Iglesias, L. Peralta, MJ. López, M. Graña. ZYGOS, Centro Gallego de Reproducción, Santiago de Compostela.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Comparar el ritmo de división de los preembriones normales y afectados, antes y después de la extracción de la blastómera (1 o 2 según el caso) *Evaluar la tasa de implantación/ciclo de los preembriones biopsiados.

MÉTODOS: Se estudiaron 177 preembriones procedentes de un total de 25 ciclos estudiados que se desglosan del siguiente modo: *en 9 ciclos se realizó el estudio para 9 aneuploidías (XY, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22). *en 8 ciclos con translocaciones - 46XY t(11,22) (q23,q11) - 46XX t(2,21) (q35,q22) - 46XX t(2,7) (q31,p13) - 45XX der(13,14) (q10,q10) - 46XX t (5,8) (q13, q24) *y el resto de los ciclos eran estudios de enfermedades monogénicas (distrofia miotónica, fibrosis quística) o ligadas al sexo (hemofilia, retinosis pigmentaria y adrenoleucodistrofia) Se contabilizó el número de embriones sanos transferidos y la tasa de implantación.

RESULTADOS Tasa de división embrionaria (ritmo de división **antes/después** de la extracción de la blastómera)

Ritmo de división %

Nºembriones		N/N	N/L	N/R	L/N	L/L	L/R	R/L	R/N	R/R	-/DEG
SANOS	69	52.17	23.19	7.25	1.45	4.35	1.45	1.45	1.45	0	7.25
AFECTOS	108	55.56	20.37	0.93	3.70	3.70	2.78	0.93	0	0	11.11

N: normal, cuatro blastómeras el día +2, ocho el día +3 y blasto temprano día +4 L: lento R: rápido

- Tasa de implantación

De un total de 177 preembriones estudiados 69 (38,98%) eran sanos y 108 (61,02%) eran portadores de alguna anomalía, De los sanos, 48 son transferidos y se consigue implantación en 8 de los ciclos realizados: *tasa de implantación/ciclo: 32%

CONCLUSIONES: En base a los resultados obtenidos de los ciclos de DGP llevados a cabo en nuestro centro, hemos concluido: 1. No existen diferencias significativas en cuanto al ritmo de división de preembriones sanos y afectados, antes y después de la extracción de la blastómera. 2. Se observa una buena tasa de implantación de los preembriones biopsiados, teniendo en cuenta que solo el 38,98% son sanos.

P. 43. TASA DE FECUNDACIÓN Y GRADO EMBRIONARIO EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE OVOCITOS RECUPERADOS EN CICLOS DE FIV/ICS

L. Peralta, MJ. Iglesias, MJ. López, M. Graña. ZYGOS, Centro Gallego de Reproducción, Santiago de Compostela.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Evaluar las tasas de fecundación y grado embrionario en función del número de ovocitos recuperados mediante punción folicular en ciclos de FIV/ICSI.

MÉTODOS: Se realizó un recuento del número de ovocitos obtenidos tras punción folicular en 34 ciclos de FIV/ICSI. Debido a su homogeneidad en edades (18-30 años) y estado físico, se consideró el grupo de las pacientes donantes como el más idóneo. Quedan excluidos del estudio aquellos ciclos de ovodonación con factor masculino severo. Se evaluó la aparición de 2PN a las 16-18 horas tras la microinyección (ICSI) y posteriormente, en día +2, se valoró el grado embrionario (tamaño de sus blastómeras y presencia de fragmentos citoplasmáticos). Los ciclos se dividieron en tres grupos según el número de ovocitos recuperados: * grupo A: ≤ 10 * grupo B: entre 11 y 20 * grupo C: ≥ 21 Los parámetros a seguir en la clasificación embrionaria fueron: * grado 1: blastómeras iguales y sin fragmentos citoplasmáticos (menos del 5%) * grado 2: blastómeras iguales con algo de fragmentación (más del 5%) * grado 3: blastómeras desiguales con fragmentación (más del 5%) * grado 4: no se puede diferenciar una blastómera de un fragmento citoplasmático.

RESULTADOS:

Tasa de Fecundación

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
Nº ovocitos total	59	192	421
Nº maduros	40	126	280
2PN	23	73	191
% fecundados	57.5%	57.9%	68.21%

Grado embrionario

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
Grado 1	15 (65.21%)	24 (35.29%)	72 (39.13%)
Grado 2	2 (8.69%)	22 (32.35%)	64 (34.78%)
Grado 3	5 (21.74%)	18 (26.47%)	41 (22.28%)
Grado 4	1 (4.35%)	4 (5.88%)	7 (3.8%)

CONCLUSIONES: 1. No se observan diferencias en la tasa de fecundación con respecto al número de ovocitos recuperados. 2. Se observa una mejor calidad embrionaria en los ciclos en los que el número de ovocitos recuperados es igual o menor a 10. 3. Se considera estimulación "óptima" aquella que permita obtener hasta 10 ovocitos en la punción folicular.

P. 44. EVOLUCIÓN DE LOS EMBRIONES MULTINUCLEADOS EN DÍA +2, DEPENDIENDO DEL NÚMERO DE BLASTÓMERA

M. Vila, E. Ferrer, C. Calatayud, M. Ruiz
CREA, Centro Médico de Reproducción Asistida, Valencia.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Valorar la multinucleación en embriones con 2 y 4 células. el primer día de división (D+2) y ver cómo afecta a la tasa de formación de blastocisto en D+5.

METODOLOGÍA: Se incluyeron en el estudio sólo aquellos embriones (n= 474) en los que se observaron los núcleos de todas sus células en D+2, y que no fueron seleccionados para su transferencia en D+3, siendo cultivados en medios secuenciales y valorándose su desarrollo hasta el quinto día de cultivo (D+5). Todas las observaciones se realizaron mediante microscopio invertido a 400 aumentos.

RESULTADOS: En D+2, el 48,2% de los embriones con 2 células presentaron multinucleación en alguna de sus células, mientras que en embriones con 4 células, este porcentaje fue del 4,7%. Realizado el seguimiento hasta blastocisto, encontramos que los embriones no transferidos que presentaban 4 células en D+2, alcanzaron en un 28,7% el estadio de Blastocisto Tipo A en D+5 (blastocisto expandido y con botón embrionario bien delimitado) si no estaban multinucleados, mientras que sí lo estaban, lo alcanzaron en un 7,4% ($P < 0,001$). Los embriones que presentaron 2 células en D+2, alcanzaron en un 10,2% el estadio de Blastocisto Tipo A en D+5 si no estaban multinucleados, mientras que si lo estaban, lo alcanzaron en un 4,7%.

DISCUSIÓN: Según nuestros resultados, cuando hemos podido observar núcleos en todas las blastómeras el primer día de división, los embriones con 2 células tienen 10 veces más posibilidades de ser multinucleados que los embriones con 4 células. Dada la relación entre multinucleación y alteraciones cromosómicas, consideramos que este dato puede ser muy interesante, ya que nos podría indicar que en muchos casos, los embriones con 2 células en día +2 podrían ser multinucleados aún cuando no les pudiéramos observar los núcleos de todas sus células, lo que ocurre en un 53% de las veces.

CONCLUSIONES: - Aproximadamente la mitad de los embriones con 2 células en D+2, presentaron multinucleación. - Los embriones multinucleados en D+2 y con 4 células alcanzaron en menor medida el estadio de blastocisto que los embriones no multinucleados. - Los embriones en D+2 con 2 células, tuvieron una baja tasa de formación de blastocisto, independientemente de que estuvieran o no multinucleados.

P. 45. INFLUENCIA DE LA TÉCNICA EMPLEADA PARA EL PROCESADO DEL SEMEN EN TRA Y EL SEXO DEL EMBRIÓN

F.J. Guijarro, M. Gago, JA. Guijarro, S. Cortés, E. Ovejero. Clínica Tambre, Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Valorar si alguno de los parámetros utilizados en laboratorio en las técnicas de reproducción asistida influye en el sexo de los embriones implantados.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos analizado retrospectivamente los 300 últimos bebés nacidos de un embarazo conseguido mediante FIV o ICSI en nuestra clínica. Para cada uno de ellos hemos analizado el sexo del recién nacido, la edad materna, la técnica de procesado del semen, el día de la transferencia embrionaria y el número de embriones transferidos, valorando si se había realizado ovodonación o criotransferencia. No hemos analizado de forma independiente la técnica de fecundación utilizada dado que de forma sistemática en nuestro centro empleamos la técnica de gradientes de densidades de dos fases para los casos de FIV o FIV-ICSI y la técnica de *swim-up* para los casos de ICSI. Para el análisis estadístico hemos empleado test de chi cuadrado, análisis de varianzas (ANOVA) y regresión logística multivariante de Cox.

RESULTADOS: Las mayores diferencias en el sexo de los recién nacidos se dan en relación a la técnica de procesado del semen utilizada, con un 54,5% de mujeres cuando usamos técnica de gradientes y un 54,5% de varones cuando la técnica empleada es *swim-up*. Ninguna de las variables analizadas ofrece diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$). Sin embargo, si empleamos para el análisis una regresión logística multivariante que nos permite valorar la influencia en el sexo fetal de cada uno de los parámetros incluidos sin el sesgo de confusión del resto de parámetros, vemos como, efectivamente, el único que influye de manera significativa en la relación de sexos de los nacidos es la técnica de procesado del semen empleada (OR:1,84; $P<0,05$)

CONCLUSIONES: Aunque sin ninguna utilidad práctica para su utilización en la elección del sexo en TRA como algunos autores han propuesto, dado que el porcentaje de concordancia entre resultados pronosticados y reales es tan solo del 54,5%, nuestros resultados confirman una influencia significativa de la técnica de procesado de semen en la relación de sexos de los embarazos resultantes. Cuando se utiliza la técnica de *swim-up* se obtiene una proporción discretamente superior de varones que cuando se emplea técnica de gradientes.

P. 46. CORRELACIÓN DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA OBSERVADA AL MICROSCOPIO INVERTIDO CON EL PATRÓN PRONUCLEAR Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO

C. Albert, M. Meseguer, J. Zulategui, B. Gadea, JL.Romero, MJ. de los Santos. IVI Valencia.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Se sabe que la calidad espermática puede influir en la fecundación así como en la capacidad de blastulación embrionaria (Bourne, 1995). La teratozoospermia es una de las causas por las que se puede indicar ICSI. La calidad seminal puede dificultar en mayor o en menor grado la selección de espermatozoides normales para microinyectar. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la inyección de espermatozoides con apariencia normal o anormal sobre el patrón pronuclear de los cigotos (Scout, 2000; Gamiz, 2003) y posterior desarrollo embrionario.

MATERIALES Y MÉTODO: Estudio retrospectivo en el que se incluyeron un total de 8889 ovocitos de 762 pacientes de donación de ovocitos con utilización del ICSI como técnica de inseminación. Los criterios de inclusión en el estudio fue que el semen presentara de 0-5% de normales utilizando el criterio estricto de Kruger. La inyección fue realizada a 600x con un microscopio Olympus equipado con óptica Hoffmann. El puntaje pronuclear que utilizamos de rutina en la valoración de la fecundación se agrupa en tipo 1, 2, 3 y 4 previamente descrito por (Gámiz, 2004) El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico del SPSS, los tests de chi-cuadrado y Anova fueron utilizados para analizar las diferencias entre grupos.

RESULTADOS: En general, la microinyección de ovocitos con espermatozoides anormales, dio lugar a un incremento significativo del patrón pronuclear tipo 3 en comparación con el obtenido al microinyectar espermatozoides aparentemente normales (14,6% vs 10,5%), $P<0,05$. Para evaluar el efecto de la concentración en el resultado del ICSI, se establecieron 2 grupos en función de la concentración de espermatozoides: 10 millones o menos (grupo A) y más de 11 millones (grupo B). En el grupo B encontramos que la microinyección de espermatozoides anormales daba lugar a un incremento significativo del patrón tipo 3 (15,3% vs 10,5% $P<0,05$) y disminución del tipo 1 (27,3% vs 33,2% $P<0,05$). Si embargo, en el grupo A, no se observó ninguna influencia sobre el patrón pronuclear en función del tipo de espermatozoide utilizado para la microinyección. En cuanto al desarrollo embrionario observamos que el grupo A la inyección de espermatozoides anormales da lugar a una menor proporción de blastocistos que cuando se logran inyectar espermatozoides normales 6,8 vs 19,6% respectivamente. Mientras que en el grupo B no se observaron tales diferencias. Por otro lado, evaluamos el efecto de la movilidad de la muestra y diferenciamos 3 grupos: hasta 10% de progresivos (C), entre 11 y 20% (D) y entre 21 y 50% (E). En los grupos D y E, observamos, significativamente, más cigotos con patrón pronuclear tipo 3 al microinyectar espermatozoides anormales (21,4 vs 9,1, y 14,9 vs 10,0%, $P<0,05$ respectivamente.). Además, en el grupo E encontramos menos blastocistos en día 5 de desarrollo al microinyectar con espermatozoides anormales. 9,5 vs 17,6%, $P<0,05$.

CONCLUSIONES: La microinyección de espermatozoides anormales, procedentes de muestras seminales con grado de teratozoospermia grave o moderada, dan lugar a un mayor porcentaje de cigotos con peor pronóstico pronuclear así como embriones con menor capacidad de desarrollarse hasta blastocisto. Si embargo, este fenómeno desaparece a medida que las características seminales se vuelven más patológicas. En muestras seminales moderadamente patológicas la microinyección de espermatozoides normales puede mejorar el resultado reproductivo de un ciclo de ICSI.

BIBLIOGRAFÍA: 1. Bourne H..Reprod Fertil Dev. 1995;7(2):237-45. 2. Scott L. Hum reprod. 2000. 2394-2403. 3.

P. 47. INFLUENCIAS ESTACIONALES EN LA CALIDAD DEL SEMEN

M. Gago, FJ. Guijarro, JA. Guijarro, L.González-Viejo, P. López. Clínica Tambre, Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Valorar la influencia de la temperatura ambiental y sus cambios estacionales en la calidad del semen.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos analizado retrospectivamente un total de 16612 muestras de semen recibidas en nuestro centro durante un periodo de más de 18 años, desde Septiembre de 1986 a Diciembre de 2004, recogiendo la concentración de espermatozoides y su movilidad. Para su clasificación se han seguido las recomendaciones diagnósticas de la OMS considerado oligozoospermia cuando el recuento en fresco no alcanzaba los 20 millones de espermatozoides por mililitro (independientemente de la movilidad); astenozoospermia cuando la movilidad activa (rápida + lenta) no alcanzaba el 45% de los espermatozoides (independientemente de su recuento); oligoastenozoospermia cuando se daban ambos diagnósticos y normozoospermia cuando tanto el recuento como la movilidad superaban los límites citados. Estos datos han sido cruzados con los datos meteorológicos mensuales de temperatura media e índice de radiación global proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología. La media mensual de la temperatura media diaria pertenece al Centro meteorológico de Getafe y el índice de radiación global media corresponde al Centro meteorológico de Ciudad universitaria. Para el análisis estadístico hemos utilizado el test de Kolmogorov-Smirnov para confirmar la distribución Normal de la muestra, el test de correlación de Pearson, el análisis de varianzas (ANOVA) y el test de regresión lineal simple.

RESULTADOS: La variación del número de espermatozoides con respecto a las variables meteorológicas analizadas se ajusta a un modelo de regresión lineal simple ($P < 0,001$), observando un descenso con el aumento de cada una de ellas, especialmente con la variación en la temperatura media diaria. El efecto de la radiación, sin embargo, parece ser un artefacto pues desaparece cuando controlamos su efecto con las variaciones de la temperatura, como demuestra el modelo de regresión lineal múltiple. El efecto de la temperatura, sin embargo, se mantiene, independientemente de las variaciones en el índice de radiación y de las variaciones anuales. Igualmente observamos un discreto incremento de la movilidad espermática tanto con el aumento de la radiación como con el de la temperatura, si bien, solo el efecto de la temperatura es independiente tanto de la radiación diaria como de la evolución anual. El diagnóstico de oligozoospermia aumenta linealmente con el incremento de las radiaciones y la temperatura, aunque sólo el aumento de la temperatura influye de forma independiente en un incremento de los casos de oligozoospermia. Respecto a la movilidad, el diagnóstico de astenozoospermia disminuye ligeramente con un aumento de las temperaturas, lo que compensa el efecto anterior y hace que el porcentaje de espermiogramas alterados vs normozoospermicos no se vea alterado de forma significativa con los cambios de temperatura.

CONCLUSIONES: Las variaciones estacionales inciden en leves cambios en las muestras espermáticas por una influencia de la temperatura más que del índice diario de radiaciones. En este sentido el aumento de temperatura de los meses estivales se relaciona con un descenso en la producción espermática que se ve compensado con un aumento de la movilidad. Compensación que provoca que no se aprecien cambios apreciables en los diagnósticos de los espermiogramas en función de la temperatura.

P. 48. RESULTADOS DE FIV-ICSI CON RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA QUIRÚRGICA TESTICULAR: DETERMINANTES CLÍNICOS Y ANALÍTICOS

A. García¹, JA. Arrús², O. Martínez-Passarell¹, O. López¹, A. Mata¹, L. Bassas^{1,2}

¹Laboratorio de Seminología y Embriología, ²Servicio de Andrología - Fundació Puigvert, Barcelona.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Describir nuestra experiencia en FIV-ICSI con recuperación espermática quirúrgica testicular (REQt) y los factores que intervienen en sus resultados.

METODOLOGÍA: Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo en el que se incluyeron todas las parejas tratadas mediante FIV-ICSI con REQt (n=82) durante los años 2002 a 2004. Se realizaron 98 procedimientos de FIV-ICSI con REQt (12 parejas realizaron 2 ciclos, y 2 parejas 3 ciclos). La edad masculina media fue 37,3 años (rango 25 - 58), y la edad femenina media fue 33,3 años (rango 24 - 49). En 69 ciclos (70,4%) la espermatogénesis estaba conservada (35 azoospermias obstructivas, 23 agencias bilaterales de conductos deferentes, 7 casos de aneyaculación, 4 casos de astenozoospermia total), mientras que en 29 procedimientos (29,6%) había un fallo testicular severo (19 azoospermias secretoras, 10 criptoospermias). En el 64,3% de los ciclos se usaron gametos procedentes de pulpa testicular en fresco y en el 35,7% espermatozoides testiculares congelados.

RESULTADOS: La tasa de fecundación global media de los oocitos microinyectados fue del 54,2%, dando lugar a $4,0 \pm 2,8$ (media \pm DE) embriones, de los cuales el 73% eran de buena calidad (1+2). La tasa de gestación por punción fue del 50,0%, la tasa de implantación fue 32,7%, y la de abortos alcanzó el 18,4%, y la proporción de ciclos con nacidos vivos fue del 40,8%. No se apreciaron diferencias significativas en las tasas de fecundación (54,2% vs 54,4%) entre los ciclos con REQt en fresco (REQt-F) o congelada (REQt-C), ni en la proporción de embriones de buena calidad (70,8% vs 77,3%). También fueron similares los ciclos con gestación (50% REQt-F, 47,6% REQt-C) y la tasa de implantación (30,4% REQt-F, 37,1% REQt-C), tasa de abortos (26,6% REQt-F, 5,2% REQt-C) y tasa de niños nacidos vivos (34,9% REQt-F, 51,4% REQt-C). La concentración de espermatozoides recuperados fue $0,195 \pm 0,18$ millones en pacientes con espermatogénesis normal (N) y $0,092 \pm 0,11$ millones en hombres con fallo testicular (FT). Las tasas globales de fecundación fueron similares en ambos grupos (54,9% en N vs 54,5% en FT), y sólo mostraron descensos significativos por debajo de 50000 espermatozoides recuperados. Cuando la REQt fue menor de 10.000 espermatozoides la tasa de fecundación bajó a 23,3%. También fueron equivalentes los porcentajes de embriones de buena calidad (71,7% en N y 76,7% en FT) y las gestaciones conseguidas 50,7% en N y 48,2% en FT. No se observó mayor frecuencia de abortos en el grupo FT (14,3%) que en los casos N (20%). La movilidad inicial de los gametos testiculares no influyó en la fecundación (56,2% sin movilidad, 60,1% con alguna movilidad) ni en la tasa de gestación (45,5% vs 51,7% respectivamente).

CONCLUSIONES: Los datos de nuestra serie de FIV-ICSI con REQt 1) permiten identificar el principal factor limitante de eficacia (~10000 espermatozoides recuperados); 2) confirman que las variables analíticas y analíticas influyen poco en los resultados clínicos; 3) muestran que los gametos masculinos congelados mantienen un excelente potencial reproductivo.

P. 49.**PAPEL DEL HATCHING ASISTIDO EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS**

L. Molina, MJ. Figueroa, P. Velarde, J. Girón, L. Fernández, A. González.
Centro Avanzado de Fertilidad, Jerez de la Frontera

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Se considera al *hatching* asistido una técnica capaz de incrementar la tasa de embarazo en pacientes con pobre pronóstico. En nuestro estudio comparamos, retrospectivamente, la eficiencia del *hatching* asistido en transferencias de embriones crioconservados.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos realizado un estudio retrospectivo, que incluye X(194)* ciclos de transferencia de embriones congelados, de los cuales X(125)* fueron realizados sin *hatching* asistido, y X(69)* se llevaron a cabo con la previa realización de *hatching* asistido; una hora antes de la transferencia embrionaria, se realiza el *hatching* utilizando ácido Tyrode, y la transferencia embrionaria se hace bajo el control de ecografía guiada.

RESULTADOS: De las 125* transferencias efectuadas, sin *hatching* asistido, tan sólo 16* resultaron en embarazo, lo que supone una tasa de embarazo del 12,8%.* Mientras que de las 69* transferencias embrionarias que se realizaron tras la práctica del *hatching*, se obtuvieron un total de 17* embarazos, lo que supone una tasa de embarazo del 24,63%*.

DISCUSIÓN: Al comparar las tasas de embarazo obtenidas, de las transferencias de embriones congelados sin realizar y realizando el *hatching*, se aprecia una diferencia considerable y significativa* entre los resultados. El estudio estadístico de estos datos demuestra la existencia de diferencia significativa entre realizar o no el *hatching* asistido.

CONCLUSIONES: Nuestros resultados muestran que la realización de *hatching* asistido, utilizando ácido Tyrode, incrementa la tasa de embarazo en la transferencia de embriones congelados.

BIBLIOGRAFÍA: 1.- The role of assisted hatching in in Vitro fertilization : a review of the literature. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama, USA. Fertil. and Esteril., 82 Suppl 1:S164-5, Sep 2004. 2.- Assited hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. Gabrielsen A., Agerholm I., Toft B., Hald F, Petersen K., Aagaard J., Feldinger B., Lindenberg S., Fedder J. Human Reproduction 19(10):2258-62;Oct 2004.

*Todos estos datos están pendientes de confirmar, ya que hemos añadido nuevos datos al estudio y estamos a la espera de obtener los resultados de los test de embarazo, y puede haber alguna modificación.

P. 50.**USO DEL MEDIO DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EMBRYOGLUE® EN COMBINACIÓN CON HTF**

A. Santana, E. Gómez, D. López, B. Amoroch, M. Nicolas, L. Fernández, J. Landeras
IVI, Murcia.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Diferentes casas comerciales de medios de cultivo para fecundación *in vitro* han desarrollado en los últimos años un medio específico de transferencia embrionaria. Estos medios están enriquecidos con hialuronato, un glicosaminoglicano que favorece la adhesión célula a célula, entre otras propiedades. El objetivo de este estudio fue comprobar si el medio de transferencia EmbryoGlue® (Vitrolife) incrementaba nuestras tasas de gestación e implantación, cuando el medio utilizado para el cultivo celular hasta día 3 era HTF (producción propia).

METODOLOGÍA: Estudio prospectivo, llevado a cabo en el IVI Murcia desde el 1 de enero de 2004 hasta el 31 de agosto de 2005. Fueron analizadas las tasas de gestación e implantación de transferencias en día 3 de pacientes de FIV/ICSI (n=626) y de ovodonación (n=91). Los embriones fueron depositados en un medio de transferencia u otro aleatoriamente. Para la transferencia se utilizó una placa Falcon® de pocillo central (ref. 353037). Los embriones fueron pasados a esta placa con HTF o EmbryoGlue® entre 5 y 10 minutos antes de realizar la transferencia. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Chi cuadrado.

RESULTADOS: En 389 pacientes de FIV/ICSI se realizó la transferencia en medio HTF, el mismo con el que se habían cultivado los embriones hasta día 3. En 237 pacientes la transferencia se realizó en medio EmbryoGlue®. Ambos grupos de pacientes eran homogéneos. Las tasas de gestación fueron 43,7 y 39,7% respectivamente. Las de implantación 30,7 y 30%. En 41 pacientes de ovodonación se realizó la transferencia en medio HTF. En 50 pacientes la transferencia se realizó en medio EmbryoGlue®. Ambos grupos de pacientes eran homogéneos. Las tasas de gestación fueron 51,2 y 44 % respectivamente. Las de implantación 37,9 y 29,9 %.

CONCLUSIONES: Tras el análisis de nuestros resultados, podemos concluir que cuando los gametos, cigotos y embriones se cultivan en medio HTF, la utilización del medio de transferencia EmbryoGlue®, no produce ningún incremento en las tasas de gestación e implantación. En este momento estamos comprobando los posibles beneficios del medio de implantación utilizando los medios de cultivo embrionario de la serie III de Vitrolife.

P. 51.**GRADO DE CUMPLIMIENTO DE LAS ESPECIFICACIONES DE CALIDAD ANALITICA BASADAS EN LA VARIABILIDAD BIOLÓGICA PARA EL ANÁLISIS DE SEMEN**

Aguilar J^{1,4}, Álvarez C^{1,4}, Yoldi A^{3,4}, Fernández A^{3,4}, Vergara F^{3,4}, Ramírez JP^{3,4}, Duran I⁵, Castilla JA^{3,6} y Morancho-Zaragoza J.⁷
Clínica Avicena, Jaen.

Tipo: **Gametos y Embriones**

Introducción: Actualmente existen normas y sistemas que monitorizan la actividad de los laboratorios, los cuales contribuyen a prevenir el incumplimiento de los niveles de calidad exigible (especificaciones de calidad).

OBJETIVOS: El objetivo del estudio es comprobar en qué medida se cumplen las especificaciones de calidad analítica basadas en la variabilidad biológica para el análisis de semen

MATERIAL Y MÉTODOS: Las características seminales estudiadas fueron concentración, motilidad total, rápida y rápida progresiva, morfología y vitalidad. Los datos relativos a los coeficientes de variación biológica y los basados en el estado del arte fueron obtenidos de estudios previos del grupo (Álvarez et al., 2003; Castilla et al., 2005) y empleando el modelo de especificaciones de calidad de tres niveles: óptimo ($(\pm 1.65 \cdot 0,75CVBw + 0,375 (CVBw 2 + CVBb 2) / 2)$), deseable ($(\pm 1.65 \cdot 0,75CVBw + 0,250 (CVBw 2 + CVBb 2) / 2)$) y mínimo ($(\pm 1.65 \cdot 0,75CVBw + 0,125 (CVBw 2 + CVBb 2) / 2)$) propuesto por Fraser et al. (2001), donde CVBw es el coeficiente de variación biológica intraindividual y CVBb el coeficiente de variación biológica entre individuos. Utilizando las gráficas del estado del arte se determinó el número de laboratorios que alcanzaban los diferentes niveles de especificación para el error total basado en la variabilidad biológica.

RESULTADOS: Más del 80% de los laboratorios que respondieron al menos al 75% de las muestras alcanzaron al menos el nivel mínimo para concentración y motilidad total y progresiva. Más del 55% de los laboratorios que respondieron al menos al 75% de las muestras al menos el nivel mínimo para la vitalidad. Solamente el 30% de los laboratorios que respondieron al menos al 75% de las muestras alcanzan al menos el nivel mínimo para la morfología y la movilidad rápida progresiva.

CONCLUSIONES: La metodología y tecnología empleada por los laboratorios participantes parece la adecuada para determinar concentración, movilidad total y progresiva y vitalidad, sin embargo no es así para movilidad rápida progresiva y morfología.

P. 52.**CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS EN DÍA 2 DE EMBRIONES CON CAPACIDAD IMPLANTATORIA**

G. Pérez-Bermejo, A. Camarena, I. Peinado, M. De la Orden, T. García-Gimeno, A. Cabo y A. Romeu
Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Estudio de los parámetros morfométricos en día 2, que caracterizan a los embriones evolutivos e implantados tras ser transferidos en un ciclo de fecundación *in vitro*.

METODOLOGÍA: Se analizaron prospectivamente 19 embriones transferidos tras realizar la técnica de FIV o ICSI en el Hospital Universitario La Fe de Valencia de Febrero a Julio del 2005. Para el análisis morfométrico se utilizó el programa informático de análisis de imagen CRONUS 3.1. Los parámetros estudiados fueron: diámetro medio del embrión; perímetro, área sección y diámetro(máximo y mínimo) de las blastómeras; porcentaje y tamaño de la fragmentación; perímetro (externo e interno), área sección, grosor medio de la sección y anomalías de la zona pelúcida. Resultados: El análisis morfométrico de estos parámetros nos define el embrión implantatorio dentro de estos valores: diámetro medio embrión ($116 \pm 19 \mu m$); perímetro ($206 \pm 29 \mu m$), área sección ($3144 \pm 642 \mu m^2$), diámetro máximo ($69 \pm 7 \mu m$) y mínimo ($56 \pm 13 \mu m$) de las blastómeras; porcentaje y tamaño fragmentación (35% E no poseen fragmentación, 65% E fragmentados (90% pequeño tamaño) pero siempre <30%); área sección ($7922 \pm 1664 \mu m^2$), grosor medio sección ($18 \pm 4 \mu m$), perímetro externo($510 \pm 29 \mu m$) e interno ($389 \pm 29 \mu m$) de la zona pelúcida. No se observaron protuberancias en la ZP.

CONCLUSIÓN: Los embriones cuyos parámetros estén dentro de los rangos expuestos, tienen un alto potencial implantatorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W.: Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. Reproductive Biology 2004; 4: 5-22. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R.: Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. Human Reproduction 1995; 10: 2427-2431. Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wiker SR, Wright G.: Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. Fertil Steril 1989; 51: 820-827. Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KL, Loft A, Lindhard A, Nyboe: Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. Human Reproduction 2004; 19: 1457-60. Saldeen P, Sundstrom P. Nuclear status of four-cell preembryos predicts implantation potential in in vitro fertilization treatment cycles. Fertil Steril. 2005; 84(3): 584-9.

P. 53.**INFLUENCIA DE LOS CAMBIOS ESTACIONALES Y ESTADOS FEBRILES EN LOS PARÁMETROS SEMINALES**

JL. Girela, MJ. Gómez-Torres, J. De Juan. Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: Son numerosos los factores que se plantean como responsables de alteraciones en los parámetros seminales. Uno de ellos es el factor temperatura. Se sabe que la espermatogénesis es sensible a la temperatura y que pequeñas fluctuaciones de incluso sólo 2°C pueden alterar su proceso normal. Durante los episodios febriles, la temperatura corporal aumenta, lo que podría causar dichas alteraciones (Carlsen, 2003). Además, la exposición a altas temperaturas durante la época estival puede tener también un efecto deletéreo para la calidad seminal. Por otra parte se baraja la existencia de un ciclo circanual en cuanto a los parámetros seminales (Centola, 1999).

OBJETIVO: El objetivo de este estudio es identificar como determinados factores ambientales, los cambios estacionales y las elevadas temperaturas corporales producidas durante los estados febriles, pueden influir en los parámetros seminales.

METODOLOGÍA: El estudio se ha realizado sobre un grupo de 101 jóvenes universitarios, sin antecedentes por problemas de esterilidad. A cada uno de ellos se le realizó un análisis de semen basal siguiendo las instrucciones de la OMS. Junto a este análisis se le realizó a cada individuo una exhaustiva entrevista, mediante un cuestionario normalizado, en el que se le consultaron una gran variedad de datos (socioculturales, sociosanitarios y estilo de vida). Para estudiar el efecto de los cambios estacionales se clasificaron los individuos en función de la época del año en la que se había realizado el análisis (invierno, primavera, verano y otoño). Para los estados febriles se clasificaron los individuos en tres grupos: aquellos que habían sufrido fiebres elevadas en los últimos tres meses, los que las habían sufrido el último año pero hace más de tres meses, y aquellos que no habían sufrido fiebre el último año. Con todos los datos obtenidos se realizaron una serie de técnicas estadísticas mediante el programa estadístico SPSS v12.0.

RESULTADOS: Al comparar los diferentes grupos estacionales se encontraron diferencias para el volumen medio del eyaculado siendo máximo en otoño (4,58 ml) y mínimo en primavera (3,24 ml), para la concentración espermática media, presentando valores máximos en invierno (87,9 mill/ml) y primavera (71,7 mill/ml) y mínimos en otoño (49,1 mill/ml), y para la media del número total de espermatozoides por eyaculado, con un máximo en invierno (321,3 mill) y un mínimo en otoño (185,4 mill.). En el caso de los estados febriles se encontraron diferencias para el porcentaje de espermatozoides móviles, 41,4% frente a 56,1%, el porcentaje de espermatozoides vivos, 57,5% frente a 70,9%, y la concentración, 38,7 mill/ml frente a 79,8 mill/ml, siendo todos estos parámetros mínimos en aquellos individuos que habían padecido fiebres elevadas. Todas estas diferencias fueron significativas para un nivel de significación de $P \leq 0,05$.

DISCUSIÓN: La producción de espermatozoides (concentración y número total de espermatozoides por eyaculado), presenta un mínimo en otoño, y un máximo entre invierno y primavera. Como el proceso de espermatogénesis dura aproximadamente 64 días, aquellas muestras analizadas en otoño muestran el efecto de la exposición a elevadas temperaturas durante la época estival, y las analizadas en invierno y primavera muestran una exposición a temperaturas más suaves. En cuanto al efecto de la fiebre, se encontraron valores mínimos de los diferentes parámetros seminales en aquellos individuos que habían padecido episodios febriles en los últimos 3 meses anteriores al análisis.

CONCLUSIONES: Los datos obtenidos sugieren una influencia negativa de la temperatura sobre los diferentes parámetros seminales., debida a la exposición a altas temperaturas en el medio y al aumento de la temperatura corporal.

BIBLIOGRAFÍA: Carlsen, E. et al. (2003) Hum. Reprod. 18 (10): 2089-2092 Centola, G. et al. (1999) Fertil. Steril. 72 (5): 803-808 Estudio financiado por la Fundación Salud 2000, Ayudas Serono. 2004-07.

P. 54.**CAUSAS DE EXCLUSIÓN DE LOS DONANTES DE ESPERMA QUE ACUDEN A NUESTRO CENTRO**

G. López, R. Lafuente, M. Sala, M. Brassesco. CIRH, Barcelona.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Valorar los motivos de exclusión de los donantes de semen para conocer cuáles son las principales causas de exclusión

METODOLOGÍA: Se realiza un estudio retrospectivo de un total de 471 donantes de semen que acuden a nuestro centro desde el año 1995, sin tener en cuenta las historias clínicas incompletas de los candidatos que abandonaron el estudio previo. Se determina el porcentaje de donantes rechazados y se recopila información de su historia clínica para indagar sobre el motivo de exclusión. Agrupamos las causas de rechazo en 9 grupos: astenospermia, oligozoospermia, oligoastenospermia, alteración en sangre, anomalías genéticas, anomalías de visión congénitas, no resistencia a la congelación, varicocele y donaciones en otro centro. Los parámetros seminales de concentración, movilidad y morfología establecidos para aceptar a un donante son de 70 mill. esperm./mL y un 30% de espermatozoides grado III, así como un porcentaje de formas normales mayor al 20%.

RESULTADOS: De los 471 donantes que forman parte del estudio, tan solo 218 fueron aceptados. Esto supone que el 53,7% de los donantes fueron rechazados, frente al 46,3% de donantes aceptados. El 67,6% de los donantes no aceptados lo fueron por causa de alteración en algún parámetro seminal, dentro de este grupo, el 41% presentaba astenospermia. Un 12,3% de donantes fueron rechazados por anomalías de visión y prácticamente un 8% lo fueron por presentar anomalías genéticas propias o en familiares cercanos; mientras que tan solo un 3% de los jóvenes que acudieron a nuestro centro fueron rechazados por no resistir la congelación.

DISCUSIÓN: Observando los resultados obtenidos vemos que el porcentaje de donantes rechazados supera ligeramente el de donantes aceptados en nuestro centro. Referente a los motivos de exclusión podemos observar que las causas más comunes de rechazo son las relacionadas con la alteración de los parámetros seminales, siendo la causa mayoritaria la astenospermia. Cabe destacar un pequeño grupo de donantes rechazados que presentaban varicocele y como consecuencia también presentaban alguna alteración seminal. Es también remarcable el elevado porcentaje de donantes no aceptados por anomalías de visión congénita, en estos casos la miopía es la causa más frecuente de exclusión. Conclusiones: El porcentaje de donantes rechazados sin tener en cuenta la causa de exclusión está en aumento, y es algo que venimos notando desde hace tiempo. La alteración de los parámetros seminales es la causa más frecuente de rechazo, y aunque la mayoría de donantes presentan parámetros dentro de la normalidad (>20 mill. esperm./mL) se está haciendo relativamente frecuente encontrar candidatos que no superan los criterios de normalidad marcados por la OMS.

P. 55.**EFFECTO DE LA CALIDAD SEMINAL Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN LA FORMACIÓN DE LOS CUERPOS PRECURSORES NUCLEOLARES DE LOS CIGOTOS HUMANOS**

A. Santana, B. Amorochó, D. López, L. Fernández, M. Nicolas, J. Landeras, E. Gómez
IVI, Murcia.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVOS: Los estudios de Tesarik et al., en 1998 y Scott et al., en el 2000, demostraron la necesidad de valorar los patrones de distribución, tamaño y número de los cuerpos precursores nucleolares (nucleolos) en cada pronúcleo, para hacer una adecuada selección embrionaria en el momento de la transferencia. Nuestro objetivo es determinar si la calidad seminal y el tratamiento de reproducción asistida utilizado, influye en el número de nucleolos presentes en los pronúcleos de los cigotos.

METODOLOGÍA: Estudio retrospectivo, realizado en el IVI-Murcia, entre el 1 de Enero de 2003 y el 31 de Agosto de 2005. En 384 casos de pacientes, que pertenecen al programa de donación de ovocitos, se analizaron el número de nucleolos presentes en los pronúcleos y se relacionaron con la calidad seminal y la técnica de fecundación *in vitro* utilizada (FIV-ICSI). Los pacientes fueron divididos en dos grupos dependiendo de la técnica utilizada, FIV ó ICSI, igualmente se les clasificó en dos grupos dependiendo de la calidad seminal, no patológica y patológica (concentración menor de 5 millones/ml y movilidad A+B menor de 20%). Los cigotos se dividieron en dos grupos, dependiendo del número de nucleolos que presentaron los pronúcleos. Se consideró que un cigoto era negativo si alguno de sus pronúcleos tenía menos de 3 nucleolos, y positivo cuando los dos pronúcleos presentaron 3 ó más nucleolos. El análisis estadístico se realizó con el test de chi-cuadrado.

RESULTADOS: De los 184 ciclos que fueron inseminados con FIV, 155 presentaron todos los cigotos positivos y 29 (15,8%) al menos un cigoto negativo. Y en los 200 ciclos restantes, que fueron inseminados con ICSI, 151 fueron positivos y 49 (24,2%) negativos. El porcentaje de ciclos con cigotos negativos procedentes de ICSI fue estadísticamente ($P<0,05$) superior al de FIV. Al tener en cuenta la calidad seminal, el 21,7% de los ciclos presentaron cigotos negativos cuando el semen fue patológico ($n= 23$) y el 20,2% cuando el semen fue no patológico ($n= 361$). Estos porcentajes no fueron estadísticamente diferentes.

CONCLUSIONES: A la vista de los resultados podemos concluir que la utilización de la técnica de ICSI provoca un incremento en la incidencia de pronúcleos con menos de 3 nucleolos. De alguna manera la microinyección altera la formación de los cuerpos precursores nucleolares. No se observó este fenómeno cuando la calidad seminal fue muy baja (concentración menor de 5 millones/ml y movilidad A+B menor de 20%).

P. 56.**INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD ANALÍTICA EN EL TEST DE SUPERVIVENCIA ESPERMÁTICA A LA CRIOCONSERVACIÓN. APLICACIÓN AL BANCO DE SEMEN**

M. Sánchez, C. González-Varea, A. Garrido, C. Fernández, R. Martínez, M. Hernández, V. Maldonado, L. Martínez, JA. Castilla.
Unidad de Reproducción, H.U. Virgen de las Nieves, Granada.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: Según nuestro criterio de calidad seminal, la concentración de espermatozoides móviles progresivos óptima en una pajuela para inseminación es de 8 millones móviles progresivos/mL. Si suponemos una movilidad progresiva del 25% supone que para conseguir este nivel es necesario al menos una concentración de 32 millones de espermatozoides/mL. Pero, cuando nosotros analizamos los parámetros seminales en una pajuela estamos cometiendo un error analítico.

OBJETIVO: Determinar que valor debemos observar de concentración de móviles progresivos en una pajuela para estar seguros de que tiene un valor superior a 8 millones de spz móviles progresivos/mL.

MÉTODOS: Para calcular que valor debemos observar de movilidad y concentración espermática en una pajuela para estar segura con una determinada probabilidad de error (<5%, <10% y <20%), de que dicha pajuela tiene más de 8 millones de spz de movilidad progresiva/mL, se utiliza la siguiente fórmula: $xobs=TV+Z((CVa/100)*TV)$ donde CVa es el coeficiente de variación analítico y Z es el valor para la probabilidad (1.65 para $p<0.05$ considerando una cola) y TV es el valor real de concentración o el % de spz móviles. El CVa se obtiene de publicaciones previas de nuestro grupo (Alvarez et al., 2003) utilizando semen criopreservado.

RESULTADOS: La mínima concentración observada con la que tenemos <10% de probabilidad de obtener un valor real de 32 millones de espermatozoides (32 millones/mL + $1,28 * (0,118*32)=36,9$ » 37 millones/mL) es 37 mill/mL. De igual manera ocurre para la determinación de la movilidad espermática. El mínimo valor observado (xobs) para la movilidad progresiva con menos de un 10% de probabilidad de obtener un valor real en una pajuela menor del 25% de movilidad progresiva ($25 + 1,28 * (0,092*25) = 27,9\%$) es 28% de movilidad progresiva. Pajuelas con menos de un 29% de movilidad progresiva tienen una probabilidad mayor del 10% de no ser adecuados para inseminación sino presentan una concentración superior a 37×10^6 de espermatozoides. Pajuelas con más de un 28% de movilidad progresiva pueden reducir proporcionalmente estas concentraciones, e inversamente, pajuelas con menos de un 28% de movilidad progresiva deben incrementar las concentraciones de espermatozoides. Como consideramos una probabilidad menos del 10% como aceptable, proponemos esta regla para decidir si una pajuela es aceptable para inseminación. De todas formas, para otros bancos de semen más o menos estrictos se presenta estas reglas para distintos niveles de probabilidad (<5%, <10% y <20%) y distintos niveles de movilidad y concentración.

CONCLUSIÓN: Para poder garantizar un determinado número de espermatozoides móviles progresivos en una pajuela de semen se debe tener en cuenta la variabilidad analítica.

P. 57.**DESARROLLO DE UN CRITERIO DE CALIDAD SEMINAL PARA ACEPTAR DONANTES DE SEMEN**

M. Sánchez, C. González-Varea, A. Garrido, C. Fernández, R. Martínez, M. Hernández, J. Fontes L. Martínez, JA. Castilla.
Unidad de Reproducción, H.U. Virgen de las Nieves, Granada.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: Existe una gran variación en los resultados obtenidos en la descongelación de muestras de semen de diferentes bancos de semen, probablemente debidas a la diferente calidad de las muestras que se congelan. Esta variabilidad en los criterios de aceptación de donantes de semen hace que no siempre se pueda garantizar la calidad de las muestras de semen descongeladas.

OBJETIVO: Establecer unos criterios de calidad seminal que permitan reducir la variabilidad en la selección de donantes, y que tengan en cuenta tanto la variabilidad biológica intrínseca de los parámetros seminales como la variabilidad analítica del banco de semen.

MATERIAL Y MÉTODOS: Para establecer dicho criterio tuvimos que suponer varias premisas iniciales. En primer lugar, una movilidad progresiva inicial en la muestra de semen de más del 50%, y una supervivencia espermática elevada (75%) a la congelación. Segundo, que la concentración tras descongelación de espermatozoides móviles progresivos fuese al menos de 8 mill/mL y que el semen se diluía 1:1 con la solución crioprotectora. Esto nos llevó a establecer como requisito de aceptación una concentración en el semen en fresco de al menos 42,6 millones de spz/mL con una movilidad progresiva mínima del 50%. Para determinar la influencia de la variabilidad biológica inherente a la producción seminal y de la variabilidad analítica inherente al método usado a la hora de determinar dicha concentración, determinamos que valor se debía observar (Xobs) de movilidad y concentración espermática con diferentes niveles de probabilidad (<5%, <10% y <20%) teniendo un valor verdadero (TV) en una muestra de semen de acuerdo con la siguiente fórmula: $xobs=TV+Z((CVBw+a/100)*TV)$ donde CVBw+a es el total de coeficientes de variación obtenidos (Álvarez et al., 2003) y el valor Z apropiado para la probabilidad (1,65 para $P<0,05$ considerando una cola).

RESULTADOS: El valor mínimo con el que obtendré con menos de un 10% de posibilidades una muestra de semen menor que 42,6 millones/ mL (42,6 millones/mL + $1,28 * (0,281*42,6) = 57,9$ millones/mL) es 58x106/mL. De igual manera ocurre para la determinación de la movilidad espermática (xobs) es el menor valor observado de movilidad progresiva con el que se tiene <10% de probabilidad de obtener un valor real en una muestra de semen menor del 50% ($50 + 1,28 * (0,178*50) = 61,3\%$) es 61% de movilidad progresiva. Por lo tanto, donantes con menos de un 61% de móviles progresivos tienen una probabilidad mayor del 10% de tener eyaculados no aptos para congelación sino presentan una concentración superior a 58x106 spz/ml. Donantes con más de 61% de movilidad progresiva pueden reducir proporcionalmente estas concentraciones, e inversamente donantes con menos del 60% deben incrementarlas. Consideramos la probabilidad <0,10 aceptable, porque suponemos 75% un buen factor de criosupervivencia, y para evitar excluir donantes de semen de baja calidad pero alto factor de supervivencia a la descongelación, admitimos un error más alto que el habitual. Nosotros proponemos esta regla para decidir si un eyaculado es aceptable para la criopreservación. De todas maneras, otro banco de semen podría ser más o menos estricto en sus normas con diferentes niveles de probabilidad (<5%, <10% y <20%), por lo que presentamos las curvas de decisión para diferentes niveles de probabilidad, concentración y movilidad.

CONCLUSIÓN: A la hora de establecer un punto de corte en la calidad seminal para aceptar un donante debe tenerse en cuenta la variabilidad analítica y biológica de los parámetros seminales.

P. 58.**DIFERENCIA ENTRE LABORATORIOS EN EL USO CLÍNICO DE EMBRIONES MULTINUCLEADOS**

A. Garrido, C. González-Varea, M. Sánchez, C. Fernández, R. Martínez, M. Hernández, A. Yoldi, JP. Ramírez, JA. Castilla.
U. Reproducción, HU Virgen de las Nieves y CEIFER, Granada.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN: La calidad embrionaria es un factor determinante de la tasa de embarazos en FIV/ICSI. Una valoración adecuada y estandarizada de ésta es necesaria para garantizar los resultados del laboratorio de embriología. La multinucleación es un fenómeno que puede aparecer tanto en las primeras divisiones embrionarias como en estadios posteriores, habiéndose asociado a bajas tasas de implantación, desaconsejándose su congelación o transferencia por diferentes autores.

OBJETIVO: Determinar la variabilidad entre laboratorios nacionales en la valoración de la multinucleación y del destino final de estos embriones

METODOLOGÍA: Los datos se obtuvieron del Programa Nacional de Control de Calidad Externo del Laboratorio de Reproducción Asistida organizado por CEIFER y auspiciado por ASEBIR (2003 y 2004). De los 40 videos de embriones en días 2 y 3 de desarrollo enviados a un total de 30 laboratorios, 2 presentaron multinucleación evidente en al menos una blastómera. Los resultados de estos 2 embriones sobre su clasificación (Bueno, Regular y Malo) y decisión clínica (Transferencia, Criopreservación, Desechar) fueron analizados.

RESULTADOS: Uno de estos embriones fue clasificado como Malo por el 86,6% de los laboratorios y como Regular por el 13,4, sin embargo un 3,5 % de ellos consideró apropiada su Transferencia, mientras que el 75,8 % lo Desechaban y el 20, 7 lo Criopreservaría. En el otro caso el embrión fue catalogado de Malo en un 77,3% y de Regular en un 22,7%, y la decisión clínica tomada fue en su mayoría la de Desecharlo (76,20%), aunque un 23,8 % de laboratorios lo Criopreservaría.

CONCLUSIÓN: El destino de los embriones multinucleados depende en gran medida del observador. Creemos necesario establecer criterios estandarizados de actuación que reduzcan la variabilidad en la práctica clínica.

P. 59.

TRATAMIENTO DE ELECCIÓN EN MUJERES MAYORES DE 38 AÑOS CON BAJA RESPUESTA

J. Muñoz, J. Pellicer, R. Herrer, C. Bou, A. Mifsud, JA. García-Velasco, Mínguez Y. IVI, Madrid.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: Comparar la FIV convencional frente a ICSI como tratamiento de elección en pacientes mayores de 38 años con baja respuesta.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio retrospectivo que incluye 124 ciclos realizados en IVI-Madrid, durante los años 2003 y 2004, correspondientes a pacientes mayores de 38 años, bajas respondedoras (≤ 5 ovocitos en punción) y con sémenes aptos tanto para FIV como para ICSI (≥ 15 millones de spz/ml y $\geq 20\%$ de spz móviles progresivos). De 786 ciclos de FIV y 633 ciclos de ICSI realizados en esas fechas, 78 y 46 respectivamente cumplían los criterios establecidos. Se compararon ambas técnicas de inseminación fundamentalmente en términos de tasa de cancelación, fecundación, calidad embrionaria y éxito reproductivo. Para la comparación estadística entre grupos, se emplearon t-test y chi-cuadrado

RESULTADOS:

	FIV	ICSI
Nº procedimientos	78	46
Edad media (años)	40,5	40,8
Media FSH basal (UI/ml)	8,9	8,3
Nº transferencias	63	27
% cancelación	19,2 *	41,3 *
% fallo de fecundación	3,9 **	17,8 **
Cancelación por mala calidad embrionaria	15,3	23,5
Calidad ovocitaria (grado 1,2 y 3)	2,3	2,3
Media ovocitos	3,2	3,0
% fecundación	62,4	66,0
Media blastomeras DIA 2	4,0	3,9
Media fragmentos DIA 2	13,1	9,3
Media blastomeras DIA 3	7,1	6,9
Media fragmentos DIA 3	10,3	12,9
Media embriones transferidos	1,8	1,7
Media blastomeras transferidas	4,3	4,7
Media frag transferidos	13,6	10,6
% gestación / transfer	30,2	33,3
% gestación / ciclo	24,4	19,5
% aborto	37,5	25,0
% implantación	16,8	21,7

p=0,001 ** p=0,003

CONCLUSIONES: Los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan la técnica de FIV como más aconsejable frente al ICSI, debido a una disminución significativa del número de casos con fallo de fecundación y el número de cancelaciones, dando lugar a una mayor eficiencia del ciclo en estas condiciones.

P. 60.

VARIACIONES DE LA CALIDAD SEMINAL CON LA TEMPERATURA AMBIENTAL

JC. Martínez, E. Sellés, J. Marcos, J. Landeras. IVI, Murcia.

Tipo: **Gametos y Embriones**

OBJETIVO: En diferentes estudios se ha demostrado una relación directa entre la concepción humana, los índices de nacimiento y las estaciones del año. En los países con clima cálido se observa un aumento en los nacimientos en verano (concepción en invierno) y una disminución de los mismos en primavera (concepción en verano) El objeto de este estudio es determinar la influencia de la Temperatura ambiental en los distintos parámetros de los seminogramas realizados en nuestra clínica (IVI-Murcia) en el periodo comprendido entre 1999-2004 y comprobar si existen variaciones en los mismos que se relacionen con la estación del año en el momento de la concepción.

MATERIAL Y MÉTODOS: En este periodo se han estudiado concentración, volumen y motilidad en 2815 muestras de semen de varones que han acudido a nuestro centro. La morfología fue estudiada en 2434 de estas muestras. Las muestras fueron obtenidas tras un periodo de abstinencia de entre 3 a 5 días. Los datos se han dividido en 2 grupos: Verano: Incluye los meses de Junio, Julio, Agosto y Septiembre. Los datos del Instituto Nacional de Meteorología indican que la temperatura media en la región de Murcia en estos meses fue de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Resto del año: La temperatura media en el resto del año fue de $14 \pm 4^\circ\text{C}$. Los seminogramas se han realizado según manual WHO 1999. Estudio estadístico: Realizado mediante T de Student y la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA).

RESULTADOS: Los datos obtenidos se reflejan en la siguiente tabla: VERANO RESTO DEL AÑO VOLUMEN 3,62 ml 3,70 ml CONCENTRACIÓN 34,16x106 ml 39,08x106 ml MOTILIDAD TIPO A 0,57% 0,63% MOTILIDAD TIPO B 39,69% 41,28% MOTILIDAD TIPO C 8,11% 7,37% MOTILIDAD TIPO D 51,62% 50,22% ESPERMATOZOIDES NORMALES 9,19% 9,66% Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración ($P < 0,05$) y en la motilidad tipo B ($P < 0,05$)

CONCLUSIONES: Del estudio realizado se observa que el calor estival provoca una disminución en la concentración espermática, así como una disminución en los espermatozoides móviles progresivos tipo B. Esta podría ser una de las causas asociadas a la disminución en las tasas de embarazo durante el periodo estival y, por tanto, a la disminución de nacimientos en primavera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Lam DA, Miron Ja .Temperature and the seasonality of births. Adv Exp Med Biol 1991;286:73-88 Polasek O et al. Seasonality of births in Croatia. , Coll Antropol. 2005 Jun;29(1):249-55 Andolz P et al. Circannual variation in human semen parameters. Int J Androl 2001 Oct;24(5):266-71. Revelli A et al . .Seasonality and human in vitro fertilization outcome. Gynecol Endocrinol. 2005 Jul ;21(1):12-7 Levine RJ et al . Differences in the quality of semen in outdoor workers during summer and winter. N England j Med 1990. Jul 5;(1):12-6.

P. 61. ¿EXISTE UNA RELACIÓN ENTRE EL RIESGO OCUPACIONAL Y LA CALIDAD SEMINAL? CONDUCTORES PROFESIONALES Y AGRICULTORES

E. Sellés ^{1,2}, J.C. Martínez ², J. Marcos ², M. Mollá², M. Muñoz ¹, J.Gadea ³

¹ IVI – Alicante, ² IVI – Murcia, ³ Universidad de Murcia.

Tipo: Gametos y Embriones

INTRODUCCIÓN: Diversos estudios han sugerido que la calidad seminal puede verse afectada por riesgos asociados al desempeño de una profesión del varón (revisado por Frazeei, 2000; Younglai et al., 2005). Entre las profesiones que se han asociado a alteraciones de la funcionalidad reproductiva se encuentran por una parte los conductores profesionales (Figa-Talamanca et al., 1996), por una deficiente termorregulación testicular y por otra parte los agricultores (Petrelli y Mantovani, 2002) por la exposición a diversas sustancias químicas con acción tóxica o/y disruptores endocrinos.

OBJETIVO: El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad seminal de varones de estas profesiones y compararlas a un grupo control de varones no relacionados con profesiones de riesgo.

METODOLOGÍA: Se estudiaron 2535 muestras de semen de varones que asistieron a la clínica de reproducción asistida desde el 2000 hasta el 2004, que se agruparon de acuerdo a su profesión en conductores (178), agricultores (90) y control (2267). Para cada caso se registro la edad, volumen, concentración, total de espermatozoides en el eyaculado, motilidad (A+B), y porcentaje de espermatozoides con morfología normal según el criterio estricto. Se realizó una análisis de covarianza (ANCOVA) incluyendo la profesión como efecto fijo y la edad como covariante, lo que permite ajustar con mayor precisión el efecto del riesgo ocupacional. Los datos se expresan como medias±sem.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Con relación a los conductores se detecta una edad media significativamente inferior a la de los otros grupos, que podría indicar una mayor tasa de problemas reproductivos o una sensibilidad de estos profesionales mayor ante estos temas, lo que acelera la asistencia a un centro especializado. Sin embargo no se detectó ninguna diferencia significativa en cuanto a la calidad seminal. Figa-Talamanca et al. (1996) describen un menor porcentaje de espermatozoides con morfología normal en profesionales del taxi (45,8% vs 64,0%). Los agricultores presentan una concentración significativamente menor que el grupo control así como del total de espermatozoides en el eyaculado. Estas alteraciones pueden estar asociadas al uso de pesticidas como ha sido descrito previamente (Juhler et al., 1999; Abel et al., 2000). Tabla 1. Parámetros seminales de un total de 2535 muestras agrupadas por profesión.

	Edad	Volumen	Concentración	Total esperm.	Motilidad A+B	Morfología normal
Agricultor	36,18±0,58 ^a	3,89±0,18	20,54±3,96 ^a	80,75±14,95 ^a	39,87±2,29	8,76±0,9
Conductor	34,16±0,41 ^b	3,92±0,13	33,51±2,8 ^b	126,26±10,47 ^b	40,32±1,5	9,38±0,55
Control	35,47±0,12 ^a	3,68±0,04	36,51±0,78 ^b	127,22±2,94 ^b	41,43±0,42	9,26±0,15

a, b difieren significativamente P<0,05

Fuente variación	Edad	Volumen	Concentración	Total esperm.	Motilidad A+B	Morfología normal
Profesión	<0,01	0,12	<0,01	0,01	0,63	0,84
Edad	-	<0,01	<0,01	0,06	<0,01	0,64

CONCLUSIONES: Los riesgos ocupacionales en los varones dedicados a la agricultura parecen estar relacionados con una disminución significativa de la producción espermática. No se detecta una relación entre calidad seminal y riesgos ocupacionales en los varones dedicados a la conducción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Younglai et al. Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. Hum Reprod Update. 2005;11:43-57. Frazier. Workplace reproductive problems. Prim Care. 2000;27:1039-56. Effects of prolonged auto vehicle driving on male reproduction function: a study among taxi drivers. Am J Ind Med. 1996;30:750-8. Petrelli y Mantovani. Environmental risk factors and male fertility and reproduction. Contraception. 2002;65:297-300. Abell et al. Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. Scand J Work Environ Health. 2000;26:492-500. Juhler et al. Human semen quality in relation to dietary pesticide exposure and organic diet. Arch Environ Contam Toxicol. 1999 ;37:415-23

P. 62. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD ANALÍTICA DE LOS PARÁMETROS SEMINALES BASADAS EN EL ESTADO DEL ARTE

J. Aguilar ^{1,4}, C. Álvarez ^{2,4}, A. Yoldi ^{3,4}, A. Fernández ^{3,4}, F. Vergara ^{3,4}, JP. Ramírez ^{3,4}, I. Duran ⁵, JA. Castilla ^{3,6}, J. Morancho-Zaragoza ⁷
Clínica Avicena, Jaen.

Tipo: Gametos y Embriones

INTRODUCCIÓN: Los niveles de calidad que deben alcanzarse en el laboratorio clínico han de satisfacer las necesidades clínicas y deben contribuir a la toma de decisiones diagnósticas y de seguimiento. Dichos niveles de calidad, denominados especificaciones de calidad analítica, pueden establecerse según diversos criterios, uno de ellos se basa en los datos obtenidos en los programas de control de calidad externo (estado del arte).

OBJETIVO: El objetivo de este estudio es el de calcular especificaciones de calidad analítica expresada en error total de los parámetros seminales en base a los datos del estado del arte.

MATERIAL Y MÉTODOS: Los datos fueron obtenidos del programa nacional de control de calidad externo para el análisis de semen en el cual participaron en torno a 90 laboratorios desde 1999 a 2003. Las características seminales estudiadas fueron concentración, vitalidad, morfología, motilidad total, motilidad rápida y progresiva rápida. Se definió el valor diana (TV) como la media de los valores observados y se calculó el error total (TE)= ((X- TV)/ TV) * 100, siendo X la observación de cada laboratorio. Se obtuvo la proporción de laboratorios que respondieron al menos al 75% de las muestras enviadas y los que respondieron al 100% de las mismas y fue calculado el error total permitido basado en el estado del arte según los niveles de especificación analítica: óptimo (el 25% de los mejores laboratorios que responden al 100% de envíos), deseable (el 75% de los mejores laboratorios que responden al 75%) y mínimo (el 90% de los mejores laboratorios que responden al 75%)

RESULTADOS: Las especificaciones de calidad expresadas en error total basadas en el estado del arte para el nivel óptimo son: concentración 28%, morfología 60% y 66% (muestras teñidas y no teñidas), motilidad total 14%, motilidad progresiva 18% motilidad progresiva rápida 63% y vitalidad 23%. Para el nivel deseable: concentración 37%, morfología 85% y 88%, motilidad total 21%, motilidad progresiva 30% motilidad progresiva rápida 71% y vitalidad 35%. Para el nivel mínimo: concentración 54%, motilidad total 14% y motilidad progresiva rápida 63%. El resto de parámetros no fueron calculados debido al elevado error total obtenido.

CONCLUSIONES: Estas especificaciones de calidad analítica pueden ser utilizadas en los laboratorios de andrología para asegurar la calidad de sus resultados.

P. 63.**APLICACIÓN DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN PACIENTES CON MEIOSIS MASCULINA ALTERADA Y EN PACIENTES CON EDAD MATERNA AVANZADA**

E. Velilla, F. Fernández, M. Moragas, S. Egozcue, M. López-Teijón.
 Institut Marquès. La Masia-CIMA. Barcelona.

Tipo: **Genética**

OBJETIVO: El objetivo del presente estudio es analizar la validez del DGPI estudiando 9 cromosomas (XY, 13, 15, 16, 17, 18, 21,22) en parejas con meiosis masculina patológica y en parejas con edad materna avanzada (>37 años).

METODOLOGÍA: Las biopsias embrionarias se fijaron mediante el protocolo de fijación descrito por Tarkowsky et al. (1966) con ligeras modificaciones. Los núcleos fijados se hibridaron mediante el protocolo de hibridación estándar.

RESULTADOS: Se comparan los resultados obtenidos en un grupo de 20 ciclos que realizaron DGPI para meiosis alterada (edad media 34,68 años, 146 embriones analizados) con un grupo de 23 ciclos de DGPI por edad materna avanzada (edad media 39,3 años, 147 embriones analizados). No se observan diferencias significativas en el porcentaje de embriones portadores de anomalías cromosómicas entre los dos grupos (65,3% vs 67,8%). En cuanto al tipo de anomalía cromosómica en cada grupo no se encuentran diferencias significativas siendo los porcentajes de aneuploidías puras (31,7% vs 25,8%), de aneuploidías dobles (18,8% vs 22,5%), de cromosomopatías múltiples (tres o más cromosomas alterados) (43,53% vs 44,0%) y haploidías o poliploidías (5,88% vs 7,53). Se realizaron un total de 17 transferencias en el grupo de meiosis alterada y de 18 transferencias en el grupo de edad materna avanzada. Cabe destacar que aunque se observa un porcentaje de embarazo por transferencia estadísticamente no significativo en los dos grupos comparativos (47,10% vs 33,3%), existe un porcentaje de aborto por transferencia significativamente mayor en el grupo con meiosis alterada respecto al grupo con abortos de repetición (29,41% vs 0%).

CONCLUSIÓN: Estos resultados preliminares nos indican que a pesar de conseguir unas buenas tasas de embarazo con DGPI en casos de meiosis patológica, el porcentaje de abortos en este grupo de pacientes es considerablemente superior al encontrado en el grupo de edad materna avanzada. Esto puede ser debido en parte a que no se estudian todos los cromosomas que podrían verse afectados y/o a que los embriones diagnosticados como normales puedan presentar mosaicismo embrionario. Al existir gran variedad de patologías meióticas, sería interesante adecuar el 'cocktail' de cromosomas a estudiar en el DGPI en función de la patología meiótica descrita.

BIBLIOGRAFÍA: Tarkowsky et. al. (1966) Cytogenetics 5: 394-400.

P. 64.**EFFECTOS DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN DONANTES DE ESPERMA SOBRE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA MEDIDA CON EL *KIT* HALOSPERM (LABORATORIOS INDAS)**

R. Lafuente, M. Sala, G. López, F. Gil, M. Brassesco.
 CIRH, Barcelona.

Tipo: **Genética**

OBJETIVOS: Tratamos de valorar si la capacitación espermática en muestras de semen de donante puede afectar a la integridad del DNA de los espermatozoides.

MÉTODOS: Se han seleccionado muestras de donantes de semen de nuestro centro, que presentan embarazo previo, y se han capacitado mediante la técnica de gradientes de densidad en 2 capas al 80 y 40%. Una vez capacitadas las muestras se procede a realizar la determinación de fragmentación del DNA utilizando el *kit* Halosperm (Lab. Indas). Se usan dos determinaciones para cada donante, una de la muestra de esperma descongelada y otra de la muestra de esperma capacitada. Se comparan ambos resultados para evaluar los posibles efectos de la capacitación con gradientes de densidad en la integridad del DNA espermático.

RESULTADOS: Media Rango % de fragmentación post-congelado: 17,54% (14,4%-24,6%) % de fragmentación post-capacitado: 20,23% (17,4%-26,8%)

CONCLUSIONES: Como cabía esperar tratándose de donantes de esperma con embarazo previo, el nivel de fragmentación del DNA está dentro de la normalidad (<27%) aunque se observa que el porcentaje aumenta sensiblemente en todos los casos analizados después de capacitar la muestra de esperma. Sin embargo, este aumento en la fragmentación no es estadísticamente significativo.

P. 65. ¿POR QUÉ TENEMOS MÁS EMBARAZOS MÚLTIPLES DE LOS ESPERADOS SEGÚN LA TASA DE IMPLANTACIÓN? HIPÓTESIS DE LA TRANSFERENCIA NULA

F. Prados, N. Ortiz-Piñate, G. Pérez-Bermejo, F. Gallego-Terris, C. Hernández, A. Rubio, O. Collado. e I. Bruna
Unidad de Reproducción. Hospital de Madrid-Montepríncipe.

Tipo: **Gametos y Embriones**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS: En nuestro centro la tasa de embarazo múltiple es significativamente superior a la que corresponde según nuestra Tasa de Implantación (TI). Recientemente (1) se ha publicado un modelo matemático que se ajusta a los resultados de incremento de embarazos múltiples. Según este modelo, la implantación de un embrión facilita la del acompañante en la misma transferencia, dando lugar a un proceso de cooperación o sinergia embrionaria durante la implantación. Sin embargo, existe otra manera de explicar el exceso de embarazos múltiples. Supongamos que algunas transferencias son inútiles para conseguir embarazo. En tal caso, los embriones utilizados en estas transferencias se podrían considerar como "no transferidos". Al disminuir los embriones que consideramos transferidos manteniendo los que sabemos que han implantado, la TI aumenta y predice la tasa de múltiples real. El objetivo del presente trabajo es analizar matemáticamente el ajuste de nuestro modelo con los datos reales de nuestro centro.

MATERIALES Y MÉTODOS: Utilizamos los datos de 334 ciclos de FIV con ovocitos homólogos realizados en nuestro centro entre el 01/01/2001 y el 20/08/2005. Se descartaron los casos de pacientes mayores de 37 años y valoraron sólo las transferencias de 2 embriones de grados 1, 2 ó 3. Para este estudio consideramos implantación embrionaria aún no habiendo detectado latido cardíaco fetal. De este modo nos aseguramos de tener en cuenta todos los casos en que podemos constatar la actividad del embrión tras su entrada en el útero. La TI global observada se utilizó para predecir la tasa de gemelares esperada. Posteriormente aplicamos un algoritmo para hallar el número de transferencias inútiles que nos permite ajustar la tasa de gemelares esperada a la real observada.

RESULTADOS: De los 668 embriones transferidos de dos en dos, 248 (37,1%) implantaron en 187 gestaciones (56,0% por transferencia). Se produjeron, por lo tanto, 61 (32,6%) embarazos gemelares, mientras que la tasa de gemelares deducida a partir de la TI sería de un 22,8%. Para que las tasas de gemelar esperada y observada se igualen manteniendo fija la tasa de gestación, el número de gemelares debería haber descendido de modo significativo ($P < 0,01$) hasta los 38 (20,2%). Si lo que mantenemos fijo es la tasa de implantación, el número adecuado de gemelares sería de 46 (22,8%), la diferencia con lo observado también es estadísticamente significativa en este caso. Asumiendo el hecho del número de implantados real, los embriones "no transferidos" serían 164, es decir, 82 de las 334 transferencias (24,6%). De este modo, la TI sí que predeciría la incidencia real de gemelares. La nueva TI sería de 49,2%.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: La anómala tasa de embarazo múltiple puede explicarse si consideramos como nulas un 24,6% de las 334 transferencias analizadas. Se pueden considerar 3 causas para la nulidad de las transferencias 1/ Que en algunos ciclos, los embriones sean totalmente inviables independientemente de su morfología. 2/ Que ciertos endometrios sean muy poco receptivos a la implantación embrionaria. 3/ Que el proceso de la transferencia sea metodológicamente incorrecto en algunas ocasiones. Consideramos las 2 últimas opciones como las más probables. Proponemos el uso de este modelo para evaluar la calidad de los procesos de transferencia. La TI calculada según este modelo (49,2%) se podría considerar como un Máximo Ideal que se alcanzaría en el supuesto de transferencias correctas en úteros receptivos.

BIBLIOGRAFÍA: 1. Matorras, R., Matorras, F. Mendoza, R. Rodríguez, M., Remohí, J. Rodríguez-Escudero, F. J., and Simón, C. The implantation of every embryo facilitates the chances of the remaining embryos to implant in an IVF programme: a mathematical model to predict pregnancy and multiple pregnancy rates. Hum. Reprod. 2005 20: 2923-2931.

P. 66. INCIDENCIA DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN FETOS CONCEBIDOS A PARTIR DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*

N. Belzunces, D. Gomez, A. Cisneros, N. Capdevila, R. Garcia, ML. Perez, M. Costa, M. Piferrer, E. Borrás, C. Fernandez, JM. Cabada, L. Vives, E. Solsona, S. Torra, A. Alvarez, N. Alaoui, E. Garcia, A. Martinez, N. Santos y N. Baena
Balagué Center, Hospitalet de Llobregat

Tipo: **Genética**

INTRODUCCIÓN: La incidencia de defectos congénitos y anomalías cromosómicas tras una técnica de fecundación *in vitro* parece ser similar a la incidencia esperada en la población. Recientemente se han publicado estudios que muestran un riesgo aumentado de enfermedades causadas por *imprinting* en aquellos embriones concebidos tras una FIV.

OBJETIVOS: Valorar la incidencia de anomalías cromosómicas en fetos concebidos por FIV y presentar diversos casos de anomalías cromosómicas diagnosticadas prenatalmente.

METODOLOGÍA: Estudio citogenético prenatal a partir de muestras de líquido amniótico. Cultivo celular en frasco. Estudio citogenético mediante Bandas GTG y análisis de 20 metafases. Resultados: De 5000 muestras de líquido amniótico recibidas la indicación de la prueba invasiva fue por FIV en 20 casos. Se diagnosticaron tres casos con anomalías cromosómicas (15%): 46,XY,t(1;3)(p13.3;q12) de novo, 46,XY,inv(2)(p11q13)mat y 45,X. Dos de los 20 casos presentaron un índice de riesgo elevado para síndrome de Down de 1/180 y 1/31. Éste último caso corresponde a la translocación recíproca entre los cromosomas 1 y 3.

CONCLUSIÓN: A pesar del bajo número de muestras analizadas, se recomienda el estudio citogenético fetal a aquellas parejas que acceden a un programa de reproducción asistida.

P. 67. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FOXJ2 EN DOS CASOS DE FACTOR MASCULINO POR AZOOSPERMIA

Sánchez-Aparicio P, Palomo I, López N, Palomo A, Ramos R, Barcia P, Guntiñas A y Ordás J.

Tipo: **Investigación aplicada**

OBJETIVO: FoxJ2 es un factor de transcripción de la familia *forkhead* que actúa como activador transcripcional. El ratón transgénico para FoxJ2, obtenido recientemente, presenta espermatogénesis aberrante y fracaso reproductor (1). Presentamos en este estudio los resultados del análisis de la expresión a nivel de RNAm de FoxJ2 en biopsia testicular de dos varones con trastornos de infertilidad. El objetivo último es evaluar en humanos la posible implicación de FoxJ2 en espermatogénesis e infertilidad.

METODOLOGÍA: Una mínima fracción de la biopsia testicular de los varones analizados se congeló en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extracción quirúrgica. Se procedió entonces a la extracción de ARN total y a la valoración de los niveles de expresión de RNAm de FoxJ2 por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se usaron *primers* específicos y controles endógenos para GAPDH y 18s (Applied Biosystem).

RESULTADOS: Se presentan los resultados obtenidos en dos casos seleccionados de varones con trastornos de infertilidad: un varón azoospermico con síndrome de Sertoli y un varón con criptozoospermia muy severa y progresiva con Hiperplasia nodular de células de Leydig. Como control se utilizó un varón sano vasectomizado. Se procedió a la extracción de RNA de las muestras conservadas en nitrógeno y a la valoración de los niveles de RNAm de FoxJ2 en los dos pacientes. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de FoxJ2 de los dos pacientes con trastornos de infertilidad comparados con el control sano.

DISCUSIÓN: La distribución tisular, estructura y dominios funcionales de FoxJ2 se conocen con detalle (2). Sin embargo, se desconocen otros aspectos esenciales como es el caso de su función biológica y sus genes diana. El ratón transgénico para FoxJ2 demuestra que este factor podría desempeñar un papel relevante en la espermatogénesis murina. Sin embargo, se desconoce cuál podría ser su función biológica en humanos y en particular su posible implicación en espermatogénesis e infertilidad. La comparación de los dos casos con el varón vasectomizado muestra que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de FoxJ2. Trabajos previos muestran que en humanos los niveles de expresión de FoxJ2 son muy elevados en testículo (3) aunque se desconoce si existe una expresión diferencial entre las distintas poblaciones celulares, como así sucede en modelos animales (3). Podría darse la circunstancia que al tratarse en los pacientes de una población mayoritaria de células de Sertoli en un caso y de células de Leydig en otro, la expresión relativa de unas células y otras afecte al balance final de tal modo que no se apreciaran diferencias significativas frente al control. Por otra parte, podrían existir de hecho diferencias en ambos casos pero debidas a la expresión diferencial de distintas formas de ARNm indetectables con los *primers* aquí empleados.

CONCLUSIONES: Los resultados obtenidos con sólo dos pacientes no nos permiten establecer por el momento ninguna correlación entre los casos de infertilidad asociados a síndrome de Sertoli e Hiperplasia de células de Leydig con los niveles de expresión de FoxJ2. Nuestra intención es ampliar el tamaño de la muestra para descartar los posibles efectos discutidos y extender este estudio a otros casos de infertilidad masculina como por ejemplo pacientes con síndrome de Klinefelter.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: (1) Fernando Martín (Tesis doctoral 2005, U. Autónoma Madrid); (2) Gómez-Ferreira et al. 2003; (3) Granadino et al. 2000.

P. 68. RESULTADOS DE CRIOPRESERVAR 3, 4 ó 5 ZIGOTOS EN UNA MISMA PAJUELA

M Grossmann, MC Pons, I Vanrell, I Solvas, M Masramon y J Nadal
Unitat de Reproducció Assistida. Centro Medico Teknon. Barcelona.

Tipo: **Criopreservación**

INTRODUCCIÓN: En nuestro centro realizamos criopreservación de todos los cigotos en los ciclos de donación asincrónica de ovocitos, en los ciclos en los que las pacientes presentan riesgo de hiperestimulación ovárica, y también en aquellos ciclos de FIV en los que se han obtenido por lo menos 8 cigotos de buena calidad. Habitualmente agrupamos un mínimo de 3 y un máximo de 5 embriones en cada pajueta, y en ocasiones nos planteamos si deberíamos criopreservar los embriones en grupos reducidos (por ejemplo de 3 cigotos y así ofrecer mayor número de criotransferencias pero con menores posibilidades de seleccionar los embriones de mayor calidad), o bien ampliar hasta cinco el número de embriones agrupados en cada pajueta con el fin de ofrecer una transferencia electiva de los mejores embriones.

OBJETIVO: Comparar, en función del número de embriones en cada pajueta, las tasas de gestación de los ciclos de transferencia de embriones criopreservados.

MATERIAL Y MÉTODOS: Análisis retrospectivo de 111 ciclos de transferencia de embriones criopreservados realizados durante el periodo Enero 03 - Junio 05. Se han incluido todos aquellos ciclos en los que se criopreservaron más de 5 embriones (por tanto más de una pajueta por caso) y en los que se descongeló una única pajueta para cada una de las transferencias. La criopreservación (protocolo de Lassalle, Testart y Renard, 1985) se realizó siempre entre las 17 y las 20 horas postfecundación. Condiciones estándares de cultivo *in vitro* y transferencia embrionaria ecoguiada en día+3, en ciclo no estimulado, y previa eclosión asistida mediante solución ácida de Tyrode. Medios Vitrolife para el cultivo y la manipulación. Se han distribuido los 111 casos en tres grupos según el número de cigotos agrupados en cada pajueta (3, 4 y 5 cigotos, grupo G3, G4 y G5 respectivamente) y se compara (*Fisher's exact test*, $P > 0,005$) la supervivencia embrionaria a la descongelación y la tasa de beta +.

RESULTADOS: El grupo G3 incluye 36 casos de 30 pacientes. La supervivencia embrionaria fue del 86% (93/108) y la tasa de beta + por ciclo y paciente fue del 41,7 (15/36) y del 50% (15/30) respectivamente. El grupo G4 incorpora 57 casos de 51 pacientes, con una supervivencia embrionaria del 89,5% (204/228) y tasa de beta + por ciclo y paciente del 35% (20/57) y el 39,2% (15/30) respectivamente. Finalmente, el grupo G5 está constituido por 18 casos de 15 pacientes :La supervivencia embrionaria fue del 92,2% (83/90), mientras que la tasa de beta + por ciclo y paciente fue, respectivamente, del 50% (9/18) y del 60% (9/15). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN: Cuando un ciclo de FIV dispone de muchos (>8) cigotos para criopreservar, el modo de agrupar dichos embriones en las pajuelas de criopreservación parece que no afecte a los resultados, por lo que usando grupos reducidos se puede ofrecer a la paciente más oportunidades con la misma posibilidad de éxito.

BIBLIOGRAFÍA: Lassalle B, Testart J, Renard JP. (1985) Fertil Steril., 44 (5): 645-51.

Instrumentación para FECUNDACIÓN IN VITRO

Incubadores de CO₂:

Heracell 150/240

- ✓ Volumen recinto interior: 150 / 240 litros
- ✓ Sistema patentado de esterilización automática por vapor a 90 °C **Contracon**
- ✓ Sistema de alarma del nivel de agua
- ✓ Interface RS232
- ✓ Sistema **Data Control** opcional para control de todos los parámetros de varios equipos simultáneamente

Data Control opcional



Cabinas de flujo laminar para FIV:

Sterile SS / AI

- ✓ Cabinas de flujo laminar para técnicas de Fecundación In Vitro, con mesa de acero inoxidable calefactada por agua o mesa de aluminio calefactada eléctricamente
- ✓ Anchos disponibles: 90 / 120 / 150 / 180 cm
- ✓ Gran variedad de accesorios

Cabina con preparación para FECUNDACION IN VITRO



Centrífugas:

Multifuge 1

- ✓ Capacidad: 4 x 400 ml / 32 x 15 ml / 20 x 25 ml / 12 x 50 ml
- ✓ Velocidad máxima: 6.000 rpm
- ✓ FCR máx.: 6.842 xg
- ✓ Disponible versión refrigerada

Novedad

Centrífuga Multifuge 1



Autoclaves:

H+P Compact

- ✓ Modelos de sobremesa
- ✓ Capacidad: 75 / 135 litros
- ✓ Sistema de chaqueta para generación del vapor separada de cámara principal

Autoclaves H+P



Otros equipos relacionados



CONTROLTECNICA instrumentación científica S.L.
C/ Artesanos Parc. 18.4 28660 Boadilla del Monte (Madrid)
Tel. 91 728 08 10 Fax. 91 729 44 54
BARCELONA: 93 486 46 60 ANDALUCIA: 679 21 02 33
VALENCIA: 679 20 85 37 MURCIA: 686 93 68 31
GALICIA: 616 42 70 94
www.controltecnica.com

SORVALL®
Heraeus

CONTROLTECNICA
Instruments

Nuestro más sincero agradecimiento a las entidades colaboradoras:

Patrocinador principal
EQUIPOS MÉDICOS BIOLÓGICOS

Entidades colaboradoras y expositoras

SERONO

GRUPO HOSPITALARIO QUIRÓN

FERRING

MEDICULT LETI

BIOCARE EUROPE

BIOMERIEUX

CEIFER

CONTROL TÉCNICA

COOK

ITALFARMACO

IZASA

NUTRICIÓN MÉDICA

OLYMPUS

ORGANÓN

QUERMED

REPROGENETICS

SEID

SISTEMAS GENÓMICOS

SWEMED

A breakthrough in ART

EmbryoGlue[®]

Implantation promoting medium

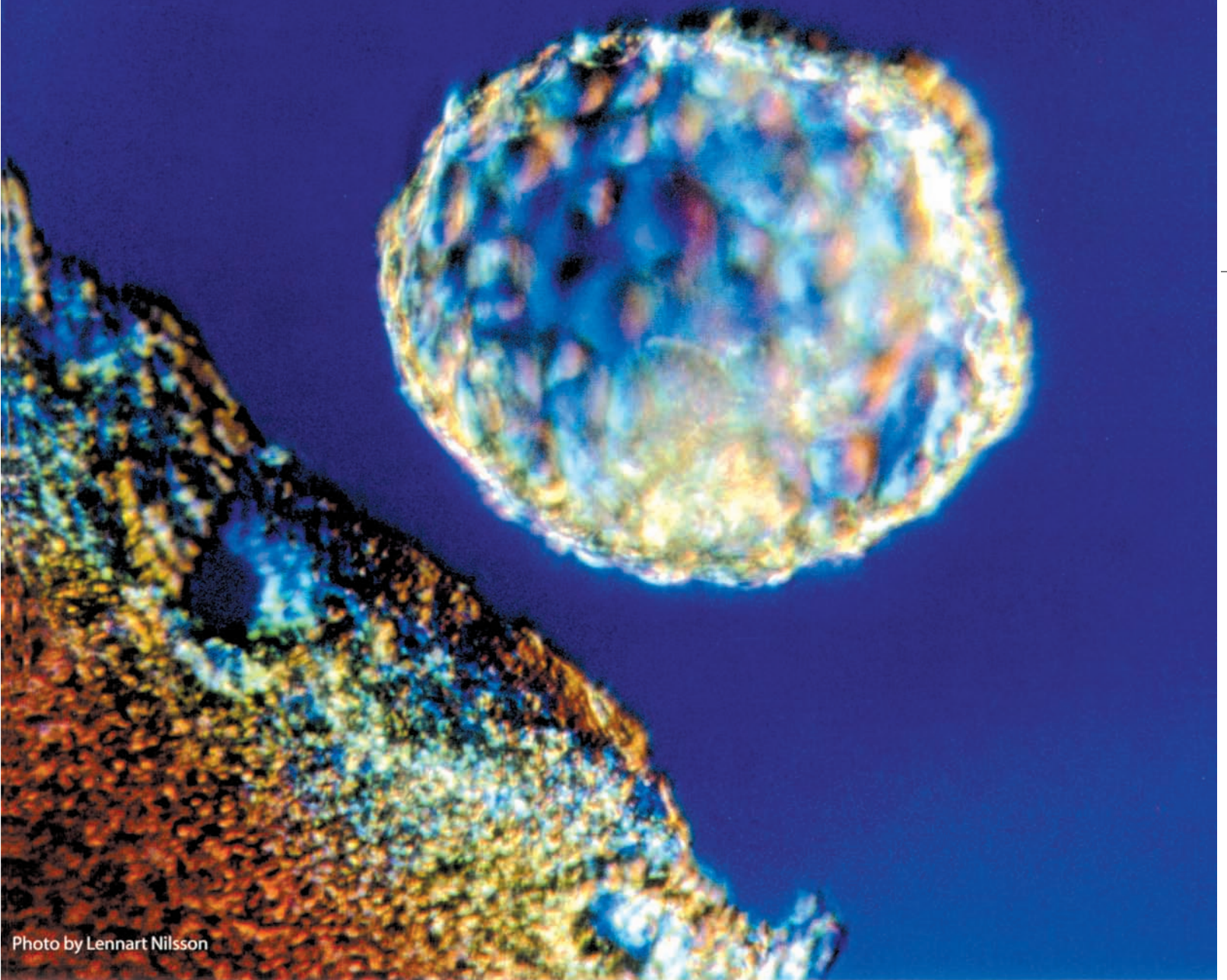


Photo by Lennart Nilsson

