



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE CIENCIAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA “VIDA”
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES PUERTA DE HIERRO

**“COMPARACION DE TASAS DE IMPLANTACION Y EMBARAZO
AL USAR ECLOSION ASISTIDA CON LASER EN EMBRIONES
CRIOPRESERVADOS DE BUENA CALIDAD”**

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE

ESPECIALIDAD EN:

BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

Presenta:

DR. HÉCTOR ARTURO VELÁZQUEZ MALDONADO

ASESOR ACADÉMICO

DR. EFRAIN PÉREZ PEÑA
DR. FRANCISCO ROJAS ROMERO

COLABORADOR:

BIOL. ANA KARINA ROBLES MURILLO
BIOL. ANTONIO VIDAL PASCUAL RODRÍGUEZ

Guadalajara, Jalisco.

Agosto del 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A MI ESPOSA:

Por estar conmigo en todo momento por
mas difícil que este sea, ¡gracias mi amor!

A MIS HIJAS

Por haber nacido en los mejores momentos,
por ustedes cada día busco ser mejor
en cada paso que doy

A MI MADRE Y ABUELOS

Por ser mis padres incondicionales; mi
forma de ser se la debo a ustedes

A MI MAESTRO DR. EFRAÍN

Por confiar en mí y convertirme
en un mejor ser humano

A MI MAESTRO DR. ROJAS

Porque gente a todo dar como usted,
hay poca, no cambie

A MIS COMPAÑEROS

Espero formen parte de mi camino
muchos años y podamos convivir más

ÍNDICE

RESUMEN.....	Pág. 4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	Pág. 5
ANTECEDENTES.....	Pág. 6
OBJETIVO GENERAL.....	Pág. 12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	Pág. 12
HIPÓTESIS.....	Pág. 13
JUSTIFICACIÓN.....	Pág. 14
MATERIAL Y MÉTODOS	
TIPO DE ESTUDIO.....	Pág. 15
METODOLOGÍA.....	Pág. 15
TÉCNICA.....	Pág. 15
PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA.....	Pág. 15
PROTOCOLO DE CRIOPRESERVACIÓN.....	Pág. 16
PROTOCOLO DE DESCONGELACIÓN	Pág. 17
PROTOCOLO DE TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.....	Pág. 17
PROTOCOLO DE PREPARACIÓN ENDOMETRIAL.....	Pág. 18
PROTOCOLO DE SOPORTE DE FASE LÚTEA.....	Pág. 18
TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	Pág. 19
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	Pág. 19
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	Pág. 19
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	Pág. 19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	Pág. 20
RESULTADOS.....	Pág. 21
DISCUSIÓN.....	Pág. 22
CONCLUSIONES.....	Pág. 23
ANEXOS.....	Pág. 24
CUADRO 1 Y 2.....	Pág. 24
FIGURA 1 Y 2.....	Pág. 25
FIGURA 3 Y 4.....	Pág. 26
FIGURA 5 Y 6.....	Pág. 27
REFERENCIAS.....	Pág. 28

RESUMEN

OBEJETIVO: Comparar la tasa de embarazo y de implantación de embriones criopreservados con la utilización de la eclosión asistida con láser y sin esta técnica.

MATERIAL Y MÉTODOS: el tipo de estudio es retrospectivo, el cual compara las tasas de implantación y embarazo en ciclos de transferencia de embriones descongelados en el periodo de enero 2004 a junio 2009 realizados en Instituto de Ciencias en Reproducción Humana “Vida” de Guadalajara, se siguieron estrictamente los protocolos de estimulación ovárica, criopreservación, descongelación, eclosión asistida, transferencia embrionaria, preparación endometrial y soporte de fase lútea que se manejan en nuestro Instituto.

RESULTADOS: Se obtuvieron 84 pacientes totales entre el grupo control y el grupo de tratamiento, de los cuales fueron 48 y 36 respectivamente, del periodo de enero del 2004 a junio del 2009. Se transfirieron 224 embriones: 129 del grupo control y 95 del grupo 2 con 2.68 y 2.63 embriones transferidos en promedio por grupo respectivamente ($p = 0.78$). En las tasas de implantación de 7.75% y 13.68% para el grupo control y de tratamiento respectivamente no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.19$). Las tasas de embarazo fueron 18.75% y 36.10% del grupo control y de tratamiento respectivamente, $p = 0.07$, la cual no demuestra diferencia estadísticamente significativa.

CONCLUSIÓN: Es necesario un mayor número de pacientes así como de trabajos de tipo prospectivos para poder encontrar diferencias significativas en los resultados y que confirmen nuestra hipótesis. Se da la pauta de que la eclosión asistida con láser es eficaz y en nuestro Instituto de Ciencias en Reproducción Humana sí mejora la tasa de implantación y embarazo, por lo que se sugiere continuar utilizándola, ya que esta confirmado, gracias a nuestros compañeros altamente calificados que lo manejan, que es una técnica segura, rápida y muy exacta.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe diferencia entre las tasas de implantación embrionaria y de embarazo al utilizar la técnica de eclosión asistida con láser en embriones descongelados y compararlas cuando no se utiliza esta técnica?

ANTECEDENTES

Para que ocurra el embarazo se necesita que el embrión en la etapa de blastocisto haga contacto directo con el endometrio y ocurra la implantación. Para que este fenómeno se lleve a cabo, el embrión debe ser capaz de salir de la zona pelúcida en un proceso denominado eclosión. La zona pelúcida es una matriz acelular compuesta por heterodímeros de las glucoproteínas ZP2 y ZP3 entrecruzados por filamentos de la proteína ZP1, que se ordenan formando tres capas, la interna, media y externa. La zona pelúcida cumple funciones importantes durante el desarrollo embrionario, primero como sitio de reconocimiento y unión de los espermatozoides mediante la ZP3 y una vez dada la fertilización participa en el bloqueo de la poliespermia. Posteriormente la zona pelúcida sirve de protección al embrión en división, ya que favorece la cohesión entre las blastómeras, protege del sistema inmune de la madre y facilita el transporte a través de la trompa de Falopio hacia el útero (1,2).

Sabemos que *in vivo*, antes de la implantación, los embriones llegan al endometrio en etapa de blastocisto, donde éste debe de ser capaz de eclosionar para lograr la implantación (2). Para lograr la eclosión debe existir un adelgazamiento de la zona pelúcida, el cual en estudios previos se señala que esta dado por influencia hormonal desde etapa preovulatoria, siendo mas claro durante la primera y segunda división embrionaria y continua progresivamente durante la formación del blastocisto. Al expandir el blastocisto la zona es muy delgada y se rompe bajo la presión de distensión, con una abertura necesaria para que el embrión salga. El adelgazamiento es regulado por proteasas producidas por el mismo embrión en desarrollo. Esta estipulado que embriones de pobre morfología tendrán como

resultado una insuficiente producción de proteasas y el embrión quedara atrapado, por lo que no ocurre la implantación, siendo esta una de las causas de falla de embarazo después de procedimientos de fertilización *in vitro*. Los mismos cambios hormonales causan variaciones como en las pacientes con niveles de FSH basal alterada y niveles de estradiol. (1,3)

La congelación de embriones es un procedimiento sencillo y su principal atributo es aumentar la tasa de embarazo por ciclo en pacientes que se someten a un tratamiento de fertilización *in vitro*. Permite postergar la transferencia embrionaria en casos de síndrome de hiperestimulación ovárica, baja respuesta endometrial o para la sincronización en ciclos de donación de óvulos. También es útil en casos donde se genera un exceso de embriones que no son transferidos y en donde la pareja desea más de un bebé. El primer embarazo a partir de embriones descongelados fue logrado en 1984 por Trounson y desde entonces el procedimiento de criopreservación forma parte integral de los ciclos de reproducción asistida. De acuerdo a los registros de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, tan solo en 2006 se realizaron 3052 transferencias de embriones descongelados dando por resultado 406 nacidos vivos para dar una tasa del 13.3% de bebé sano en casa. (4)

Los procesos de criopreservación-descongelación, cultivos de ovocitos y embriones, desde hace tiempo se sabe que inducen alteraciones en la matriz de las glucoproteínas causando su endurecimiento y engrosamiento de la zona pelúcida (2,5,6,7), lo que hace que estos embriones al ser transferidos tengan tasas de implantación mas bajas que los embriones transferidos en fresco (5,8), aunque en un estudio previo se demostró que el flujo de sangre endometrial y subendometrial medido por doppler, y ultrasonido

tridimensional, fue significativamente mas bajo con ciclos estimulados que en ciclo natural en las mismas pacientes, haciendo posible que el endometrio sea más receptivo en ciclo natural comparado a los ciclos estimulados (5).

Otras publicaciones coinciden en que la tasa de embarazo en ciclos de transferencia de embriones descongelados sigue siendo inferior a ciclos estimulados de fertilización *in vitro* y transferencia de embriones en fresco. Una explicación puede ser debido al endurecimiento de la zona pelúcida descrito anteriormente por el proceso de criopreservación (5,6,7).

Estudios *in vitro* con embriones humanos y de ratón indican que con una abertura artificial en la zona pelúcida por ejemplo, con eclosión asistida, mejoran significativamente la eclosión del blastocisto al comparar con embriones sin eclosión asistida (2,5,7,9).

La eclosión asistida se propuso como método para mejorar el potencial de la implantación (10), y se ha sugerido para mejorar la tasa de embarazo en determinadas condiciones (11).

Existen diferentes técnicas de eclosión asistida, donde el pionero en humanos fue Cohen en 1990 y desde entonces se han descrito: la mecánica o disección parcial de la zona pelúcida (fig. 1) la cual se realiza con micro aguja; perforación de la zona con ácido Tyrodes o química (fig. 2); remoción total de la zona pelúcida con pronasa ó enzimática (fig. 4); eclosión asistida con láser (fig 3) (1,12).

La introducción de la técnica del láser en campo de la reproducción asistida ha abierto posibilidades por ser una manipulación rápida eficaz y segura, y en la actualidad ha sustituido a los procedimientos mecánicos y químicos en la mayoría de los centros a nivel mundial (2,13). El láser se aplicó a gametos por primera vez por Tadir y colaboradores desde 1989 el cual utilizó neodimio, itrio de aluminio granate "Nd YAG" para manipular los movimientos de los espermatozoides (12); el primer láser de perforación de la zona pelúcida fue con ArF, exímer láser emisores de radiación UV considerado de contacto (14), también usado con micro manipulación para traspasar la zona pelúcida de ovocitos en hámster (15), posteriormente se demostró que este, no ocasionaba daño en el plasma del ovocito. Uno de los primeros láser de no contacto fue KrF de 248 nm usado para drilling de la zona pelúcida en embriones de ratón (16), también se utilizó Nd YAG láser de 1.06 μm . Es hasta 1994 cuando se introduce el diodo láser infrarrojo de no contacto que emite 1.48 μm , el cual es accesible y la longitud de onda emitida está muy lejos de la absorción máxima por el ADN (17), usado en ratones Germond y col (18), dieron lugar a embriones normales y con descendencia fértil, así como encontró mejora e tasas de implantación (19), este se considera que no tiene efectos tóxicos sobre las células vivas y es fácil de manejar (2,20).

Se le han dados múltiples indicaciones al láser como Viega (21) que lo aplicó a embriones humanos para la disección de la zona pelúcida con fines de biopsia de blastocisto para Diagnóstico Genético Preimplantatorio, con buenos resultados, se facilita la biopsia del cuerpo polar con la perforación de la zona pelúcida con el láser (22) y Boada logra el primer embarazo con éxito después de PGD en 1998 (23).

Balaban y col. en el 2002 compararon cuatro diferentes técnicas como viene siendo la química con ácido tyrodes, enzimática con adelgazamiento con pronasa, la mecánica, y con láser, concluyendo que los cuatro métodos utilizados en este estudio tienen tasas similares de implantación y embarazo (24).

En general es muy difícil comparar y correlacionar los hallazgos de diferentes estudios debido a su diseño diferente, criterios de selección de las pacientes y técnica de eclosión asistida (24), sin embargo existen múltiples estudios controversiales al respecto; una de las ventajas que ofrece el láser sobre las otras diferentes técnicas de eclosión asistida es que proporciona resultados reproducibles así como agujeros de diámetro definidos, el cual se hace en pocos milisegundos con uno o dos disparos (2), pero tiene su debate si realmente la eclosión asistida con láser tiene ventajas en algunos subgrupos definidos de pacientes (25,26,27,28). Como por ejemplo Antinori utilizo el láser en pacientes con fallas repetidas de fertilización in Vitro y las comparo con grupo control en su primer ciclo de fertilización in Vitro encontrando que la técnica dio un incremento significativo en tasas tanto de implantación como de embarazo (29). Mantoudis encontró una tasas mas alta de embarazo con eclosión asistida con láser de la cuarta parte de la circunferencia de la zona pelúcida (fig. 6) que con eclosión asistida parcial o total (fig. 5) (20), 2 meta-análisis (31,32) y otros estudios demostraron que con las eclosión asistida incrementan las tasas de implantación y embarazo especialmente en mujeres con pobre pronóstico, fallas repetidas y mujeres de edad avanzada (5,33,34), encontrando poca información sobre eclosión asistida en ciclos de transferencia de embriones descongelados (34). Pocos estudios concluyen que la eclosión asistida con láser mejora los resultados de transferencia de embriones

descongelados (7). Así mismo, también con la técnica de ácido tyrodes demostrada por Gabrielsen y col. (35).

Con el ácido tyrodes son varios estudios los que demuestran en pacientes que desde 1996 aumentan las tasas de embarazo y de implantación al comparar con ciclos sin la eclosión asistida (36,37), sin embargo se sabe que puede causar daño celular, por lo que el láser lleva ventaja al demostrarse con Ma y col. que no tiene efecto negativo sobre la tasa de anormalidad cromosómica en bebés vivos (38). Al comparar estas dos técnicas en tasa de implantación, embarazo o embarazo múltiple no hay diferencia. (39,40,41,42).

Otro de los usos del láser es el ICSI asistido con láser en donde Moser y col. encontraron menor tasa de degeneración de óvulos al momento del ICSI comparada con ICSI convencional, la cual fue estadísticamente significativa; aunque no se encontró diferencia en tasa de implantación o en calidad de los blastocistos, si encontraron diferencia en la tasa de embarazo clínico (43). También se ha mencionado el riesgo con esta técnica de aumento en la tasa de embarazos gemelares monocigóticos (1), sin embargo Ng y col. no encontraron diferencia en tasa de implantación y embarazo múltiple al remover la mitad externa de la zona pelúcida de un cuarto de la circunferencia de esta (20,44).

Cabe mencionar que no se ha encontrado mejoría en los resultados clínicos cuando esta técnica se realiza en pacientes de buen pronóstico (45), e incluso en mujeres mayores de 37 años (46).

OBJETIVO GENERAL

Comparar las tasas de implantación y embarazo en embriones descongelados con la utilización de eclosión asistida con láser y sin esta técnica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la tasa de implantación y de embarazo al transferir embriones descongelados sin la utilización de eclosión asistida con láser
2. Determinar la tasa de implantación y embarazo al transferir embriones descongelados a los que se les realizo eclosión asistida con láser
3. Comparar las tasas de implantación y de embarazo de embriones descongelados con y sin la utilización de la técnica de eclosión asistida con láser.

HIPÓTESIS

Hipótesis nula:

No existe diferencia entre las tasas de embarazo e implantación embrionaria de embriones descongelados al utilizar la eclosión asistida con láser y no utilizar esta técnica.

Hipótesis alterna:

La tasa de implantación embrionaria y de embarazo es más alta al utilizar eclosión asistida con láser en embriones criopreservados.

JUSTIFICACIÓN

Un paso muy importante en las técnicas de reproducción asistida es sin duda la transferencia embrionaria, la cual puede ser modificada de acuerdo a factores propios de la anatomía de la paciente y la capacidad de la persona encargada de realizarla, sin embargo, paso seguido es que los embriones tengan la capacidad de implantarse en el endometrio y existen situaciones que alteran la zona pelúcida como es el caso de la criopreservación, que causa un engrosamiento de la zona pelúcida lo que puede originar falla de la implantación y por consiguiente prueba de embarazo negativa, la técnica de la eclosión asistida con láser ayuda a la implantación pues adelgaza la zona pelúcida embrionaria y favorece que el embrión por varios mecanismos bioquímicos logren la implantación.

El conocer si la técnica de eclosión asistida con láser aumenta la tasa de implantación por ciclo y la tasa de embarazo servirá de mucho para continuar realizándola de manera cada vez más segura, e incluso poder identificar subgrupos de pacientes propias de nuestro centro de reproducción asistida para mejorar las tasas de implantación y de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tipo de estudio:

El diseño de esta investigación corresponde a un estudio retrospectivo, comparativo de la tasa de implantación embrionaria y la tasa de embarazo de embriones descongelados con la utilización de la técnica de eclosión asistida con láser y sin esta técnica.

2. Metodología:

El estudio se llevo a cabo en el Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida en Guadalajara, Jalisco. Se analizaron los datos obtenidos de los ciclos de embriones descongelados de enero del 2004 a junio del 2009 que cumplieran con los criterios de inclusión, de los cuales se dividieron en 2 grupos: grupo 1, 48 pacientes que se les transfirieron embriones descongelados sin eclosión asistida (grupo control). Grupo 2, 36 pacientes a las cuales se les transfirieron embriones descongelados con eclosión asistida con láser (tratamiento).

3. Técnica:

Protocolo de estimulación ovárica: Todas las pacientes fueron estimuladas utilizando un protocolo de estimulación ovárica controlada de ciclo corto con FSH recombinante (Gonal F, Serono), antagonistas de la GnRH (Cetrotide, Serono) y con HMG (Merapur, Ferring), aplicando disparo de HCG recombinante (Ovidrel 250µg, Serono) cuando la mayoría de los folículos alcanzaron un diámetro promedio de 18 a 20 mm. con captura de ovocitos 36 horas después bajo anestesia

general endovenosa, posteriormente se les realizo FIV o ICSI dependiendo de la alteración en el factor masculino. Se incluyeron ciclos en donde las pacientes criopreservaron embriones ya sea para postergar la transferencia embrionaria en casos de síndrome de hiperestimulación ovárica, baja respuesta endometrial o para la sincronización en ciclos de donación de óvulos. También en casos donde hubo un exceso de embriones que no fueron transferidos y la pareja iba en busca de más de un bebé. Solamente fueron criopreservados embriones de buena calidad: 6 a 9 células en tercer día de desarrollo embrionario con menos del 20% de fragmentación.

Protocolo de criopreservación: la criopreservación se llevó a cabo utilizando un congelador biológico programable Planer Kryo 10 serie II (Planer products Ltd, UK) con un protocolo de criopreservación con propaneíol (PROH) (Vitrolife Freeze Kit1, Denmark). Los embriones fueron expuestos a una solución buffer fosfato (PBS) por 5 minutos a temperatura ambiente y transferidos a la solución de congelación 1 por 10 minutos (PBS + 1.5 m/l PROH) y posteriormente expuestos por 15 minutos a la solución de congelación 2 (PBS + 1.5 m/l PROH + 0.5 m de sacarosa). Fueron introducidos en grupos menores a 4 embriones, dependiendo de la disponibilidad en pajuelas francesas de criopreservación (CryoBiosystems, Francia) y posteriormente introducidas a la cámara de criopreservación a 16°C y enfriados hasta -8°C a una tasa de -2°C / min. Se realizó el seeding de manera manual y se mantuvo la temperatura en -8°C por 5 minutos para continuar con el enfriamiento a -0.3°C / min hasta -30°C y después a una tasa de enfriamiento de -30°C / min hasta alcanzar -150°C. Seguido de esto, la pajuela con los embriones fueron almacenados en el banco de nitrógeno líquido a -190°C.

Protocolo de descongelación: la descongelación de los embriones se realizó en dos pasos utilizando el kit de descongelación de Vitrolife (Vitrolife Thaw kit 1, Denmark). El primero paso consiste en el calentamiento a temperatura ambiente por 30 segundos y posteriormente a 37°C en agua caliente por otros 30 segundos. Las pajuelas fueron cortadas en ambos extremos y el contenido vertido en una caja de 4 pocillos (Nunc, EU) en la solución de descongelación 1 (PBS + 1 m/ml de sacarosa) por 5 minutos, después transferidos a la solución de descongelación 2 (PBS + 0.5 m/ml de sacarosa) por 5 minutos y posteriormente a la solución 3 (PBS + 0.2 m/ml de sacarosa) por 10 minutos para finalmente exponerlos a una solución de PBS. Los embriones fueron enjuagados en medio G.1 + 10 % albúmina sérica humana (Vitrolife, Denmark) en cultivo con microgotas de 30 µl cubiertas con parafina líquida (LifeGlobal, E.U.) para evaluar la supervivencia embrionaria. Se consideraron aptos para ser transferidos aquellos embriones que sobrevivieron con al menos 4 blastómeras o el 50% del embrión o más.

Eclosión asistida: la eclosión asistida se realizó minutos antes de la transferencia embrionaria. Se utilizó un equipo Octax laser shot (MTG systems) de 1.48 µm en la misma caja de cultivo. Se realizaron de 5 a 6 disparos de 4.5 milisegundos para adelgazar la zona un cuarto de la circunferencia del embrión sin perforar la capa interna y en un sitio donde no hubiera blastómeras adyacentes a la zona. Posteriormente los embriones fueron transferidos a la caja de transferencia Falcon 3037 (Falcon E.U.) con medio G.1 + 10% HSA para ser transferidos.

Transferencia embrionaria: se realizó con vejiga llena para utilizarla como ventana óptica y guiada por ultrasonido, se colocó a la paciente en posición ginecológica, se retiró el moco del canal cervical y se lavó con medio de cultivo HTF modificado

para facilitar la extracción del moco, procurando no causar sangrado ni desencadenar contracciones uterinas. El cérvix libre de moco se canalizó con un catéter de transferencia (Ultrasoft Frydman set echotip, CCD Francia) hasta el orificio cervical interno utilizando guía con ultrasonido abdominal. Se procedió a cargar los embriones en el laboratorio de la manera siguiente: medio de cultivo, aire, medio de cultivo con embriones, aire, medio de cultivo en capas de 5 µl cada una. El catéter cargado ultrasuave se insertó en el catéter guía colocado en el cérvix y los embriones se depositaron de 1 a 1.5 cm del fondo del útero. Se retiraron ambos catéteres articulados y se pasaron al laboratorio de embriología para su revisión. En ningún caso hubo retención de embriones en el catéter.

Protocolo de preparación endometrial y soporte de fase lútea: se les administró Agonista de GnRh tipo Acetato de Leuprolide de 3.75 mgs en día 21 del ciclo previo, y se le inicio con valerato de Estradiol (Primogyn, Schering) 2 mgs por día por 7 días, aumentando a 4 mgs por DIA por 3 días, y posteriormente 6 mgs por día por 3 días más, se tomaron niveles séricos de Estradiol y progesterona, se toman como referencia Estradiol mayor de 250 pg/ml y nivel de progesterona menor de 1 ng/ml, se realizo ultrasonido vaginal y se verifico que el grosor endometrial fuera mayor a 7 mm. Se procedió a la aplicación de progesterona 50 mgs intramuscular, 4 días previos a la transferencia embrionaria. Se solicitó prueba de embarazo con gonadotropina coriónica humana cuantitativa, 16 días posteriores a la transferencia embrionaria. Se continuó con progesterona y Estradiol hasta 3 meses después de la prueba positiva de embarazo.

4. Tamaño de la muestra:

Se incluyeron todos los ciclos de transferencia de embriones descongelados del Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida Guadalajara que cumplieran con los criterios de inclusión en el período de Enero del 2004 a Junio del 2009.

5. Criterios de inclusión:

- a. Pacientes sometidos a ciclos de FIV e ICSI con gametos propios o donados, que tuvieron embriones para criopreservar y que al descongelar cada embrión a transferir tuviera al menos 4 blastómeras sanas y más del 50% de sobrevivencia.
- b. Embriones criopreservados por congelación lenta utilizando un congelador biológico programable Planer Kryo 10 serie II.

6. Criterios de exclusión:

- a. Embriones que al descongelar tuvieron menos del 50% de sobrevivencia
- b. ciclos de congelación por vitrificación
- c. ciclos de congelación lenta utilizando protocolo con el congelador biológico Cryobath.

7. Consideraciones éticas:

Se aprobó por el Comité de Ética del Instituto de Ciencias en Reproducción Humana “Vida” de Guadalajara, se explicó la naturaleza del estudio y el beneficio posterior al comparar los grupos del estudio.

8. Análisis estadístico:

Se realizó en programa Excel Microsoft Office 2007 para Windows Vista, se usaron recursos de estadística descriptiva e inferencial (Chi cuadrada, T de Student)

Se considerará una diferencia estadísticamente significativa si P es menor a .05

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 84 pacientes entre el grupo control y el grupo de tratamiento, de los cuales fueron 48 y 36 respectivamente, del periodo de enero del 2004 a junio del 2009.

La edad promedio para el grupo control fue de 33.6, y para el grupo de tratamiento de 34.9 con $p = 0.32$ por lo que no hubo diferencia significativa (cuadro 1).

En el grupo control fueron 17 ciclos de FIV (35.4%), 24 ciclos de ICSI (50%) y 7 ciclos de FIV-ICSI (14.5%). El 31.25% de estos ciclos fueron con donación de óvulos (15 ciclos).

En el grupo de tratamiento fueron 17 ciclos de FIV (47.2%), 18 ciclos de ICSI (50%) y 1 ciclo de FIV-ICSI (2.8%). El 27.7% de los ciclos fueron con donación de óvulos (10 ciclos).

Se transfirieron un total de 224 embriones: 129 del grupo control (2.68 ± 0.83 en promedio por transferencia) y 95 del grupo de tratamiento (2.63 ± 0.72 en promedio por transferencia), con $p = 0.78$ la cual no es estadísticamente significativa (cuadro 1).

La tasa de implantación del grupo control fue de 7.75 y en el grupo de tratamiento fue de 13.68 con una $p = 0.19$ la cual no demuestra diferencia estadísticamente significativa (cuadro 2).

La tasa de embarazo para el grupo control fue de 18.75% y para el grupo de tratamiento fue de 36.10% con $p = 0.07$, la cual no demuestra diferencia estadísticamente significativa (cuadro 2).

DISCUSIÓN

Se logró el objetivo general del estudio al comparar la tasa de embarazo y de implantación de los ciclos que se realizaron en nuestro instituto con embriones transferidos después de ser criopreservados y utilizar la técnica de la eclosión asistida con láser y sin esta.

Por las características de nuestro centro no se pueden evaluar variables étnicas, así como exagerar en los criterios de inclusión de los estudios por la cantidad de pacientes.

Las técnicas de reproducción asistida siguen teniendo tasas bajas de implantación y de recién nacido vivo (47), sin embargo, a nivel mundial siguen intentando mejorar estas tasas con diferentes técnicas, como la eclosión asistida en especial con láser (48), que desde su aparición en nuestra área (49) y recientemente se sigue observando que el láser tiene tasas más altas de implantación (8.2% vs. 3.8%) y de embarazo (31.8 vs. 16.1%) al compararla con las otras técnicas, como la química (39,40).

Con los resultados de nuestro estudio, aunque no fueron estadísticamente significativos, se logró observar una tendencia de mejoría en la tasa de embarazo y de implantación al utilizar láser para la abertura de la zona pelúcida, lo que coincide con múltiples estudios como el de Balaban y col (6), pero, como mencionan otros autores (50) la técnica con láser es más rápida, eficaz y precisa, aunque se prefiere para algunos subgrupos de pacientes como lo son las pacientes con falla previa de fertilización *in vitro* y de edad avanzada, no así en embriones criopreservados.

Se eligió embriones de día 3, ya que no se ha demostrado diferencia en los resultados al compararlos con etapa de blastocisto, lo que da más seguridad de tener a más embriones para transferir en ese mismo evento o posteriormente (51).

CONCLUSIONES

Gracias a los resultados de nuestro trabajo queda abierto un amplio e interesante campo para continuar investigando sobre estas técnicas de eclosión asistida, haciendo énfasis en que se deben tener estudios con variables mas precisas, así como comparar entre las diferentes técnicas de fertilización *in vitro* o ICSI, e incluso en pacientes mas especificas como podrían ser las receptoras de óvulos con fallas a ciclos previos.

Es necesario un mayor número de pacientes así como trabajos de tipo prospectivos para poder encontrar diferencias significativas en los resultados y puedan confirmar más claramente nuestra hipótesis.

Se da la pauta de que la eclosión asistida con láser es eficaz y en nuestro instituto de reproducción humana sí mejora la tasa de implantación y embarazo, por lo que se sugiere continuar utilizándola, ya que esta confirmado, gracias a nuestros compañeros altamente calificados que lo manejan, que es una técnica segura, rápida y muy exacta.

ANEXOS

CUADRO 1.

	AH Grupo	No AH Grupo	valor p	
n	36	48		
Edad	34.9	33.6	0.32	ns
Embriones transferidos	2.63 (±0.72)	2.68 (±0.83)	0.78	ns

Cuadro 1. Características del grupo control vs. grupo tratamiento.

CUADRO 2.

	AH Grupo	No AH Grupo	valor p	
n	36	48		
Embriones transferidos	2.63 (±0.83)	2.68 (±0.72)	0.78	ns
Tasa embarazo clínico	36.10%	18.75%	0.08	ns
Tasa de implantación	13.68%	7.75%	0.21	ns

Cuadro 2. Resultados de tasa de embarazo e implantación del grupo control y del grupo tratamiento.

FIGURA 1.

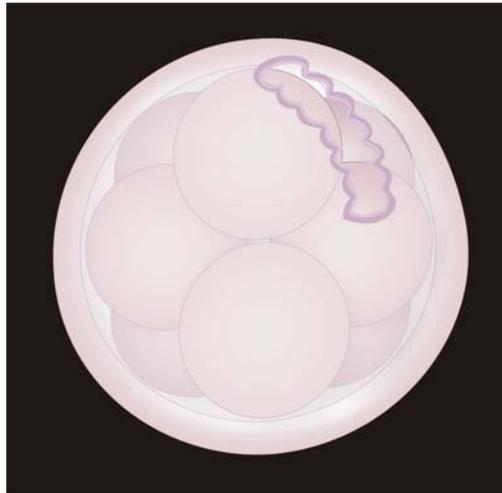


Fig. 1 Disección Parcial de la Zona Pelúcida (PZD)

FIGURA 2.



Fig. 2 Perforación de la zona con ácido Tyrodes (Zona Drilling)

FIGURA 3.



Fig.3 Eclosi3n asistida con LASER

FIGURA 4.

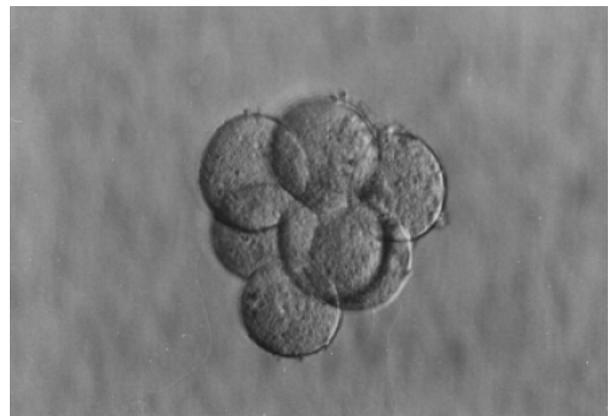
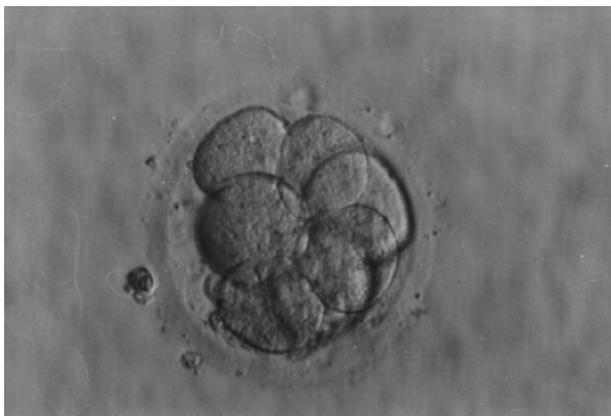
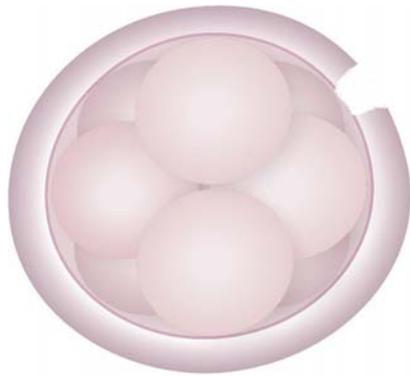
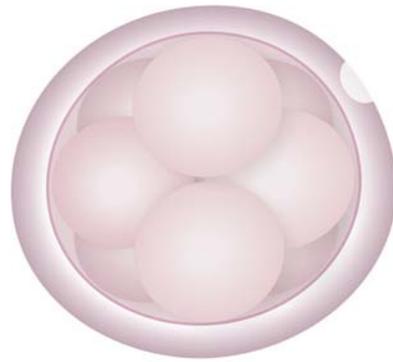


Fig. 4 Remoci3n total de la ZP con 1cido Tyrodes o Pronasa.

FIGURA 5.



Perforación total



Perforación parcial

FIGURA 6.

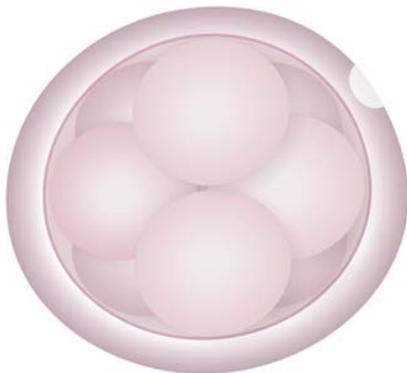
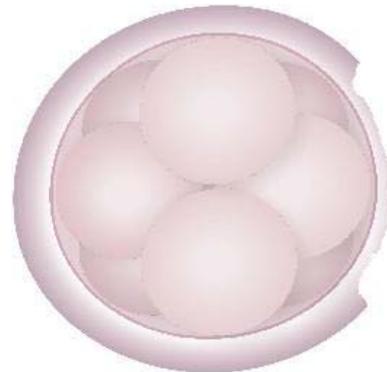


Fig.6 Adelgazamiento de un solo punto



Adelgazamiento de un cuarto
(Quarter assisted hatching)

REFERENCIAS

13. Al Hasani S, Ludwig, M., Karabulut O. (1999) Results of intracytoplasmatic sperm injection using microprocessor controlled TransferMan Eppendorf Manipulator system. Middle East Fertility Society 4; 41-44.
33. Al-Nuaim LA and Jenkins JM (2002) Assisted hatching in assisted reproduction. Br J Obstet Gynaecol 109; 856–862.
49. Antinori S, Panci C, Selman HA (1996a) Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. Hum Reprod 11; 590-594.
29. Antinori S, Selman HA, Caffa B (1996b) Zona opening of human embryos using a noncontact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. Hum Reprod 11; 2488-2492.
24. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A, (2002) A comparison of four different techniques of assisted hatching. Hum Reprod, 17; 1239-1243.
7. Balaban B, Urman B, Yakin K, Isiklar A. (2006) Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study. Hum Reprod, 21; 2136-2140.
27. Bider D, Livshits A, Yonish M (1997) Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age. Hum Reprod 12; 317-320.
48. Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR and Wikland M (2001) Laser zona pellucida thinning—an alternative approach to assisted hatching. Hum Reprod 16; 1959–1964.
16. Blanchet GB, Russell JB, Fincher CR, Portmann M (1992) Laser micromanipulation in the mouse embryo: a novel approach to zona drilling. Fertil. Steril 57; 1337-1341.
23. Boada M, Carrera M, De La Iglesia C (1998) Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. J. Assist. Reprod. Genet 15; 302-307.
6. Carroll J, Depypene H and Mathews CD (1990) Freeze-thaw induced changes of the zona pellucida explain decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. J Reprod Fertil 90; 547–553.

36. Check JH, Hoover L, Nazari A, O'Shaughnessy A and Summers D (1996) The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 65; 254–257.
15. Coddington CC, Veeck LL, Swanson RJ (1992) The YAG laser used in micromanipulation to transect the zona pellucida of hamster oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet* 9; 557-563.
10. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP and Wiemer K (1990) Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 5; 7–13.
9. De Vos A and van Steirteghem A (2000) Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs* 166,220–227.
47. Diedrich K, Fauser CJ, Devroey P, Griesinger G, Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. (2007) The role of the endometrium and embryo in human Implantation. *Hum Reprod Updt.*13; 365–377.
20. Ebner T, Moser M, Tews G, (2005) Possible applications of a non-contact 1.48 mm wavelength diode laser in assisted reproduction technologies. *Hum Reprod Updt* 11; 425-435
31. Edi-Osagie E, Hooper L, McGinlay P, Seif MW (2003) Effect(s) of assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD001894.
50. Edirisinghe WR, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, Suwajanakorn S, Pruksananonda K, Chinpilas V and Virutamasen P (1999) A study failing to determine significant benefits from assisted hatching: patients selected for advanced age, zonal thickness of embryos, and previous failed attempts. *J Assist Reprod Genet* 16; 294–301.
8. European IVF-Monitoring Programme (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2004) Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 19; 490–503.
40. Feng HL, Hershlag A, Scholl GM, Cohen MA, (2009), A retrospective study comparing three different assisted hatching techniques. *Fertil Steril*, 91; 1323-1325.
46. Frydman N, Madoux S, Hesters L, Duvernoy C, Feyereisen E, Du AL, Tachdjian G, Frydman R, Fanchin R, (2006) A randomized double-blind controlled study on the efficacy

of laser zona pellucida thinning on live birth rates in cases of advanced female age. *Hum Reprod* 21; 2131-2135.

35. Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, Feldinger B, Lindenberg S and Fedder J (2004) Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod* 19; 2258–2262.

18. Germond M, Nocera D, Senn A (1995) Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril* 64; 604-611.

19. Germond M, Nocera D, Senn A (1996) Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 micron diode laser beam. *Hum Reprod* 11; 1043-1048.

3. Gosden LV, Yin H, (2006) *Micromanipulation in Assisted Reproductive Technology: Intracytoplasmic Sperm Injection, Assisted Hatching, and Preimplantation Genetic Diagnosis*. *Clin Obst Gyn.* 49; 73–84

41. Hseih YY, Huang CC, Cheng TC, Chang CC, Tsai HD, Lee MS (2002). Laser assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. *Fertil Steril* 78; 179–82.

39. Lanzendorf SE, Ratts VS, Moley KH, Goldstein JS, Dahan MH, Odem RR, (2007) A randomized, prospective study comparing laser-assisted hatching and assisted hatching using acidified medium. *Fertil Steril* 87; 1450-1457.

28. Lanzendorf SE, Nehchiri K, Mayer JF (1998) A prospective, randomized, double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age. *Hum Reprod* 13; 409-413.

38. Ma S, Rowe T, Yuen BH, (2006) Impact of assisted hatching on the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a prospective, randomized clinical trial and pregnancy follow-up, *Fertil Steril* 85; 895-900.

11. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP (1998) Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum. Reprod* 13; 1331-1335.

42. Makrakis E, Angeli I, Agapintou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. (2006) Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril* 86; 1596–600.

30. Mantoudis E, Podsiadly BT, Gorgy A, Venkat G and Craft IL (2001) A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Hum Reprod* 16; 2182–2186.
22. Montag M., Van der Ven K, Delacretaz G. (1998) Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil. Steril* 69; 539-542.
43. Moser M, Ebner T, Sommergruber M, Gaisswinkler V, Jesacher K, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. (2004) Laser assisted zona pellucida thinning prior to routine ICSI. *Hum Reprod* 19; 573-578.
5. Ng EHY, Chan CCW, Tang OS, Yeung WSB and Ho PC (2004) Comparison of endometrial and subendometrial blood flow measured by threedimensional power Doppler ultrasound between stimulated and natural cycles in the same patients. *Hum Reprod* 19; 2385–2390.
44. Ng EHY, Naveed F, Lau EYL, Yeung WSB, Chan CCW, Tang OS, Ho PC. (2005) A randomized double-blind controlled study of the efficacy of laser-assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Hum Reprod* 20; 979-985.
14. Obruca A, Strohmer H, Blaschitz A (1997) Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er:YAG) laser. *Hum Reprod* 12; 2242-2245.
1. Pérez-Peña E. (2007) *Atención Integral de la Infertilidad*. 2da ed. Mc Graw Hill; 714-716.
4. Registro Latino Americano de Reproducción Asistida 2006. www.redlara.com/esp/reg_2006.asp
17. Rink K, Delacretaz G, Salathe RP (1994) 1.48 μm diode laser microdissection of the zona pellucida of mouse zygotes. *Proc. SPIE*, 2134A, 412-422.
45. Sagoskin AW, Levy MJ, Tucker MJ, Richter KS, Widra EA (2007) Laser assisted hatching in good prognosis patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 87; 283–287.
32. Sallam HN, Sadek SS and Agameya AF (2003) Assisted hatching—a metaanalysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet* 20, 332–342.
25. Schoolcraft WB, Schlenker T, Gee M (1994) Assisted hatching in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil. Steril*, 62, 551-553.

2. Schöpfer B, Ludwig M, Edenfeld J, Al-Hasani S, Diedrich K. (1999) Possible applications of lasers in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 14; 186-193.
12. Tadir, Y., Wright, W.H., Vafa, O. et al. (1989) Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap. *Fertil Steril*, 52; 870-873.
37. Tao J and Tamis R (1997) Application of assisted hatching for 2-day-old frozen-thawed embryo transfer in a poor-prognosis population. *J Assist Reprod Genet* 14; 128–130.
34. The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2008) The role of assisted hatching in in vitro fertilization: A review of the literature. A Committee opinion *Fertil Steril* 90; 196-198.
26. Tucker MJ, Morton PC, Wright G (1996) Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection: does co-culture or assisted hatching improve implantation rates? *Hum Reprod* 11; 2434-2437.
51. Utsunomiya T, Ito H, Nagaki M, Sato J, (2004) A prospective, randomized study: day 3 versus hatching blastocyst stage. *Human Reprod* 19; 1598-1603.
21. Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M (1997) Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 5; 351-354.