

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER, I.A.P.
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

**“ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE COINCUBACIÓN CORTA Y
COINCUBACIÓN LARGA DE GAMETOS HUMANOS EN
FERTILIZACIÓN IN VITRO”**

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
PRESENTA

DR. CARLOS LINDER EFTER

PROFESOR TITULAR DEL CURSO: DR. HECTOR HUGO BUSTOS LÓPEZ
PROFESOR ADJUNTO: DR. GABRIEL ROJAS POCEROS
ASESOR DE TESIS: DR. CARLOS NAVARRO MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER, I.A.P.

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. JOSÉ JAVIER ELIZALDE GONZÁLEZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN GINECOLOGIA Y
OBSTETRICIA

DR. HÉCTOR HUGO BUSTOS LÓPEZ

PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN GINECOLOGIA Y
OBSTETRICIA

DR. GABRIEL ROJAS POCEROS

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

DR. ÁNGEL MATUTE LABRADOR

DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS

DR. CARLOS NAVARRO MARTÍNEZ

CON INFINITO AGRADECIMIENTO A:

JULIE, DANIELLE Y GABRIEL

POR SER EL MOTOR QUE ME DA LA FUERZA Y EL IMPULSO
DE SEGUIR ADELANTE DÍA A DÍA

SAÚL, FEIGE, MARCOS Y CECILIA

POR SU GRAN APOYO DESINTERESADO E INCONDICIONAL

MIS MAESTROS, COMPAÑEROS Y TODOS AQUELLOS QUE
DE ALGUNA MANERA CONTRIBUYERON PARA HACER
QUE LLEGARA ESTE MOMENTO

ÍNDICE

| | Página |
|---------------------------------------|--------|
| I. INTRODUCCIÓN | 6 |
| II. MARCO TEÓRICO | 9 |
| II.1. CONCEPTOS BÁSICOS | 9 |
| II.2. ANTECEDENTES | 18 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 19 |
| IV. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| V. OBJETIVOS | 20 |
| VI. HIPÓTESIS | 20 |
| VII. MATERIAL Y MÉTODOS | 20 |
| VII.1. TIPO DE ESTUDIO | 21 |
| VII.2. UNIVERSO Y MUESTRA DEL ESTUDIO | 22 |
| VII.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN | 22 |
| VII.4. VARIABLES | 22 |
| VII.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 22 |
| VIII. ASPECTOS ÉTICOS | 23 |
| IX. RESULTADOS | 23 |
| X. DISCUSIÓN | 24 |
| XI. CONCLUSIONES | 25 |
| XII. BIBLIOGRAFÍA | 26 |
| XIII. TABLAS | 28 |

RESUMEN:

La Fertilización *in Vitro* (FIV) es el proceso mediante el cual, los gametos (óvulo y espermatozoide) se combinan en un plato de Petri, con el fin de obtener una fecundación y el desarrollo del embrión. En la FIV, los espermatozoides son introducidos en cuanto se observa la maduración del ovocito. Éstos son expuestos a los espermatozoides durante un promedio de 16 a 20 horas. La exposición por largo tiempo del ovocito al espermatozoide puede limitar las tasas de implantación y embarazo. La coincubación corta de gametos humanos ha demostrado tener mejores resultados en cuanto a las tasas de implantación y embarazo.

Objetivos. Evaluar la tasa de fertilización, implantación y embarazo tras la coincubación corta y coincubación larga de gametos humanos.

Material y Métodos. 284 pacientes que seguían tratamiento para FIV entre Enero del 2000 y Diciembre del 2006. Las pacientes fueron divididas en Grupo A (N=225), con 3212 ovocitos coincubados por un lapso de 2 horas. Grupo B (N=59), con 654 ovocitos incubados de manera tradicional por 16 a 20 horas. Se realizó la observación de 2PN en ambos grupos 18 horas posterior a la coincubación. Se determinó fracción β -hCG en suero al día 10 y 12 posterior a la transferencia y realización de USG transvaginal 15 días posterior a la β -hCG.

Resultados: La calidad embrionaria resulta ser significativa, encontrando una mayor calidad en el día 3 en el grupo de coincubación corta ($p=.023$). El porcentaje de sacos gestacionales resultaron tener una diferencia significativa, así como la tasa de implantación, obteniendo un valor de $p<.0001$ en ambos casos. La β -hCG presentan valores significativamente mayores en el grupo A, con $p=.001$ y $p<.001$ respectivamente. La tasa de embarazo entre el grupo A ($110/225 = 48.9\%$) y grupo B ($12/59 = 20.3\%$) resultó ser altamente significativa ($p<.0001$).

Conclusiones: El presente estudio demuestra que la exposición corta de gametos humanos incrementa significativamente las tasas de implantación y embarazo en comparación a la exposición larga. Aunque no existe diferencia en la tasa de fertilización, la calidad embrionaria en la coincubación corta es significativamente mejor.

I. Introducción:

Desde tiempos inmemoriales, la humanidad ha intentado modificar su potencial reproductivo, teniendo un interés científico enfocado a la fertilidad y el embarazo desde los tiempos de Aristóteles. Incluso, temas relacionados con la fertilidad humana han existido desde tiempos bíblicos y continúan vigentes a la fecha teniendo un profundo impacto en la sociedad (1).

La infertilidad es una condición común con implicaciones psicológicas, económicas, demográficas y médicas importantes, y es definida como la incapacidad de concebir después de 1 año de practicar relaciones sexuales con promedio de 2 a 3 veces por semana sin el uso de algún método anticonceptivo. En general, la pareja normalmente fértil, posee solo un 20% de probabilidad de lograr un embarazo por mes (2), obteniendo un porcentaje anual de probabilidad de embarazo del 93%.

Diversos factores etiológicos que incrementan el riesgo de infertilidad se han investigado y los más frecuentes son la edad, en donde la tasa reproductiva disminuye mientras la edad aumenta (3); enfermedad pélvica inflamatoria, donde existe riesgo de daño u oclusión tubaria secundaria al proceso infeccioso; factores de estilo de vida como el tabaquismo, el cual presenta un riesgo relativo de 1.36 en riesgo de infertilidad (4); alcoholismo, afectando principalmente al factor masculino; dieta y ejercicio extremo, en donde la obesidad y la pérdida excesiva de tejido graso limitan la función hormonal normal. Los factores ocupacionales y ambientales no han demostrado un peso

significativo en el área de la infertilidad pero aumentan de manera significativa la tasa de abortos espontáneos en caso de exposición a radiación expedida por equipos de video (5) y a la teratospermia presentada por individuos expuestos a ciertos pesticidas, plomo y otros metales pesados (6).

La evaluación diagnóstica de la pareja infértil debe incluir factores masculino, cervical, uterino o endometrial, tubario, endócrino y pélvico, los cuales son estudiados con métodos radiológicos, laparoscópicos y de laboratorio. Una vez obtenido el diagnóstico, se decide que tipo de asistencia en reproducción es el adecuado para cada pareja. Los diferentes métodos utilizados en estos casos van desde la programación de un coito de acuerdo al probable día de ovulación, hasta complejos métodos de fertilización *in Vitro*.

Desde el primer reporte de un embarazo humano exitoso posterior a una fertilización *in Vitro* (FIV) en 1978 (7), la FIV y las técnicas de reproducción asistida han alcanzado un puesto importante en el manejo clínico de la infertilidad.

La Fertilización *in Vitro* (FIV) es el proceso mediante el cual, los gametos (óvulo y espermatozoide) se combinan en un plato de Petri, bajo un medio ambiente estéril, con temperatura y pH controlados, con el fin de obtener las características ideales y el medio propicio para la fecundación y posteriormente el desarrollo del embrión.

La tecnología en reproducción asistida es utilizada ampliamente, contando cerca de 3 millones de nacimientos al año (8). Con el empleo de estas técnicas, la tasa de embarazos en la actualidad oscila entre el 20 a 25% por ciclo de tratamiento, cifra que lleva a una tasa acumulativa posterior a 4 intentos del 50 a 60% (9).

El proceso a seguir en un ciclo de FIV consiste en diversos pasos, que son:

- La hiperestimulación ovárica controlada, la cual consiste en utilizar medicamentos que logran el crecimiento y maduración de múltiples folículos ováricos para obtener por medio de una captura ovular, la mayor cantidad y calidad de óvulos a fertilizar.
- La captura ovular, que consiste en que, una vez que los folículos ováricos se encuentran maduros, estos son aspirados por vía vaginal mediante una aguja y con seguimiento ultrasonográfico.
- La fertilización de gametos, los cuales se coincuban durante 2 horas (coincubación corta) o 16-18 horas (coincubación larga) en platos de petri y medio de cultivo.
- La transferencia embrionaria, la cual se lleva a cabo a las 72 hrs posterior a la fertilización y consiste en el depósito de los embriones maduros (no mas de tres) a la cavidad endometrial a través del cervix

mediante un cateter. Es posible detectar un embarazo 10 días después de la transferencia embrionaria.

Los métodos comunes de FIV suelen emplear una incubación prolongada de óvulos y espermatozoides (16-20 horas). Durante los últimos 20 años, se ha intentado mejorar la tasa de fertilización, implantación y embarazo. En 1996, Gianaroli, et. al., describió la incubación corta de gametos, los cuales se coincubaban por solo 2-4 horas. Los resultados presentados tuvieron un aumento significativo en las tasas de fertilización e implantación (10).

II. Marco teórico

II.1 Conceptos básicos

- Infertilidad: Es definida como el transcurso de un año de relaciones sexuales sin protección y sin lograr la concepción. Aproximadamente entre el 85 y 90% de parejas jóvenes saludables concebirán en un lapso de un año, por lo que la infertilidad afectará al 10-15% restante.
- La fecundabilidad por ciclo es la probabilidad de que en un solo ciclo se logre un embarazo y fecundidad es la probabilidad de que un solo ciclo resulte en un nacimiento vivo.

Por el contrario de la percepción popular, la incidencia general de la infertilidad se ha mantenido relativamente sin cambio en las últimas 3 décadas, alcanzando 10.2% en mujeres de 15 a 44 años (11), aunque la evaluación y el

tratamiento de la infertilidad haya cambiado dramáticamente en este mismo lapso de tiempo. Tres puntos han afectado directamente este incremento. El primero fue la introducción de la fertilización *in Vitro* (FIV), el cual incrementa marcadamente el pronóstico para un número importante de parejas infértiles, especialmente para las parejas con factor tubario, en donde las salpinges se encuentran con un daño importante o con previa esterilización, o masculinos; en donde los niveles de espermatozoides sanos para lograr una fertilización normal no son óptimos. Segundo, y debido a la evolución, las mujeres buscan un embarazo a edades mas tardías cuando son biológicamente menos fértiles. Tercero, las parejas infértiles se encuentran mas interesadas en su fertilidad y su relación con su edad, por lo que buscan técnicas de reproducción asistida (TRA) mas pronto (11).

Las principales causas de infertilidad se pueden resumir en los siguientes grupos:

- Anormalidades en la producción de ovocitos maduros y sanos
- Alteraciones en la producción espermática
- Transporte alterado del óvulo, espermatozoide o embrión
- Anormalidades en el proceso de implantación
- Alteraciones inmunológicas o sistémicas que alteren las anteriores
- Idiopáticas

Técnicas de reproducción asistida y Fertilización *in Vitro*:

Históricamente, las técnicas de reproducción han avanzado enormemente con el paso del tiempo, siendo la más antigua la inseminación artificial heteróloga realizada de forma empírica, pasando por la inseminación artificial intrauterina homóloga hasta la fertilización *in vitro* tradicional (FIV), transferencia intratubaria de gametos, transferencia intratubaria de cigotos, hasta las técnicas más modernas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y el diagnóstico de preimplantación.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) envuelven a todas las técnicas que involucran la directa manipulación de los ovocitos fuera del organismo, siendo la más común la FIV. Estas nuevas técnicas han revolucionado tanto la evaluación como el tratamiento de la infertilidad. La FIV envuelve una secuencia de pasos altamente coordinados iniciando con una hiperestimulación ovárica controlada con gonadotropinas exógenas, seguido de una captura ovular desde los ovarios guiada por ultrasonido transvaginal, fertilización de los gametos en laboratorio y la consecuente transferencia de embriones dentro de la cavidad uterina y a través del cervix.

Indicaciones de la FIV

La FIV fue desarrollada inicialmente para pacientes con daño tubario severo e irreparable, pero es ahora aplicada a un campo mucho mayor en el tratamiento de casi todas las causas de infertilidad. La enfermedad tubaria severa secundaria a infecciones previas principalmente Chlamydia o Gonorrea y

grados avanzados de endometriosis y un factor masculino severo son las indicaciones más comunes. La FIV es también el mejor tratamiento para parejas con múltiples factores y para parejas con una infertilidad inexplicable.

El factor masculino aporta el 20% a las causas de infertilidad. Y es indicación de FIV cuando el número de espermatozoides obtenidos tras una eyaculación es menor a 13.5 millones de espermatozoides/ml, menos de 32% de motilidad progresiva o menos de un 9% de morfología normal espermática (Kruger) (13).

Otras indicaciones para FIV incluyen la falta de concepción posterior a 4 ciclos de inseminación intrauterina con patología detectada y corregida y falla ovárica prematura acompañada de donación de óvulos.

Evaluación de pacientes a someterse a FIV

Una vez obtenido un diagnóstico, es necesario someter a la pareja infértil a diferentes estudios adicionales antes de iniciar el tratamiento.

- Reserva ovárica: La medición de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) en el día 3 del ciclo nos da un valor pronóstico, siendo esta hormona inversamente proporcional a la respuesta ovárica.
- Factor masculino: El obtener una muestra de semen previo al tratamiento es necesario para determinar que tipo de técnica utilizar en el laboratorio (ICSI o FIV convencional). Así mismo, se deben realizar cultivos de líquido seminal para descartar algún proceso infeccioso y dar el tratamiento antibiótico indicado en su caso.

- Perfil de enfermedades infecciosas: VIH, hepatitis B y hepatitis C son estudios recomendados previos al tratamiento para la protección del equipo médico así como del laboratorio, y mas importante aún, para el producto derivado de la FIV.
- Prueba de histerometría previa a transferencia de embriones: Necesaria para conocer la profundidad de la cavidad uterina y alcanzar una transferencia lo menos traumática posible.
- Evaluación uterina: Realizar una histerosalpingografía previa al tratamiento es indispensable para conocer la cavidad uterina. Pólipos o fibromas submucosos pueden interferir con el resultado de la implantación y el desarrollo del embarazo, por lo que si se sospechara la presencia estos, se deberá realizar un histerosonograma o una histeroscopia diagnóstica y/u operatoria.

Hiperestimulación ovárica controlada (HOC):

Numerosos regímenes se han descrito y van desde la no estimulación (ciclo natural), a la mínima estimulación (citrato de clomifeno), a la estimulación moderada (tratamiento secuencial con citrato de clomifeno y gonadotropinas exógenas en dosis pequeñas), hasta una estimulación agresiva (grandes dosis de gonadotropinas exógenas solas, o en combinación con agonistas o antagonistas de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)). Cada régimen tiene sus ventajas, desventajas e indicaciones específicas. Sea el que sea el régimen, la finalidad de la HOC es obtener la mayor cantidad con la mejor calidad de ovocitos a capturar.

La vigilancia del crecimiento folicular ovárico se realiza mediante ultrasonido transvaginal y se realiza desde el inicio del ciclo (día 1-2), hasta alcanzar el diámetro promedio en el cual llegan a su madurez (promedio 18 mm). El seguimiento hormonal, principalmente de estradiol (E_2) durante la HOC es indispensable para valorar el crecimiento y maduración folicular. Los niveles de E_2 séricos son variables y se debe de correlacionar con el tamaño y número de folículos observados por ultrasonido.

Una vez obteniendo la maduración ovular requerida, se aplica una dosis de hormona coriónica gonadotrópica (hCG) para ayudar a completar la maduración folicular.

Captura ovular:

La captura ovular se realiza generalmente 36 horas posterior a la administración de la hCG. Esta captura ovular consiste en la aspiración folicular de los ovocitos mediante visión directa con ultrasonido transvaginal y una aguja de 35 cm, la cual tiene una guía sobre el transductor vaginal del ultrasonido. Se aspiran todos los folículos desarrollados para posteriormente, pasar a la identificación y estadiaje de los ovocitos capturados.

Laboratorio de cultivo

Cerca del 30% de los ovocitos capturados pueden ser inmaduros al momento de su captura, reflejando la variedad de tamaño entre folículos estimulados al momento de la administración de la hCG.

La maduración del ovocito se puede determinar por la expansión de la masa del cúmulus y la corona radiada, el tamaño y la cohesión de las células de la granulosa y el color y forma del ovocito. Una vez que el cúmulus es removido, se evalúa la presencia o ausencia del primer cuerpo polar y la vesícula germinal, ambas estructuras indicativas de madurez (metafase II).

Generalmente, los ovocitos requieren de una pequeña incubación preliminar y son inseminados a las 4 horas, en el caso donde se realicen coincubación corta y a las 16-18 horas, en el caso de la coincubación larga.

La FIV convencional utiliza para la coincubación de gametos entre 100,000 y 150,000 espermatozoides por mililitro de medio de cultivo. Esta cantidad de espermatozoides se adecua a las características de la muestra.

Una vez que se encuentran en contacto el espermatozoide y el ovocito por medio de su zona pelúcida, aparece la reacción acrosomal, la cual es esencial para permitir que el espermatozoide penetre la zona pelúcida. Esta zona está constituida por glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3), las cuales inducen la reacción acrosomal y la secreción de una proteasa llamada acrosina, la cual degrada las glicoproteínas de la zona pelúcida. El espermatozoide se abre paso a través de la zona pelúcida ayudado por la motilidad flagelar de su cola hasta fusionar su membrana acrosomal interna con la capa de microvellosidades del ovocito y posteriormente, se fusiona con la membrana plasmática del mismo (14). Al penetrar el espermatozoide al citoplasma del ovocito se reinicia la meiosis, experimentando una reacción cortical de despolarización de la membrana con

la posterior exocitosis de gránulos corticales, generando así un bloqueo espermático evitando la polispermia.

En este momento se inicia la evaluación de los ovocitos fertilizados entre 16 y 18 horas postinseminación. Posterior a la extrusión del segundo cuerpo polar y del cambio de metafase II a telofase II, los pronúcleos migran hacia el centro del ovocito para encontrarse. Los cromosomas de cada pronúcleo se aparean y fusionan, dando lugar al cigoto. Con la formación de este cigoto se reestablece la diploidía, el sexo genético y se marca el inicio del desarrollo embrionario.

Un ovocito fertilizado presenta por lo general 2 pronúcleos, 2 cuerpos polares, una forma esférica regular con un citoplasma homogéneo. La frecuencia de cigotos polispérmicos es del 2% con ovocitos maduros y 30% con ovocitos inmaduros.

Una vez obtenidos los embriones tras una fertilización exitosa, se procede a evaluar durante las primeras 72 horas el desarrollo de cada uno de los embriones y a seleccionar aquellos con alto potencial de desarrollo. Aquellos embriones con una adecuada morfología y un desarrollo cronológico adecuado, presentarán una tasa de implantación significativamente mayor.

Transferencia de embriones (TE)

Aunque los embriones se han transferido desde la etapa de cigotos hasta blastocistos, existe la tendencia de realiza la transferencia en el día 3 posterior a la captura ovocitaria y la fertilización.

Existen diversos sistemas para calificar a los embriones, pero en general la morfología se califica de manera similar en los diferentes grupos y esta debe incluir el número de células, la simetría y estado de las blastómeras, el porcentaje de fragmentación del citoplasma y la tasa de división celular. Un embrión ideal en día 3 debe incluir de 6 a 8 blastómeras de igual tamaño sin fragmentación citoplasmática.

Una vez teniendo calificados a los embriones, se transferirán aquellos con mayor probabilidad de lograr un buen término. Debido al incremento en los últimos años en los embarazos gemelares, triples y de alto orden fetal, se ha propuesto la transferencia de no mas de tres embriones en mujeres mayores de 40 años, y de no mas de 2 embriones en mujeres menores a esta misma edad (15).

II.2 Antecedentes

El desarrollo de la fertilización *in vitro* (FIV) para el tratamiento de parejas infértiles se ha enfocado en el establecimiento de condiciones adecuadas para facilitar la interacción del espermatozoide con el óvulo.

Desde los inicios de la FIV, los científicos han intentado mejorar día a día las tasas de fertilización, de desarrollo embrionario, de implantación y de embarazo mediante diferentes técnicas, que van desde el desarrollo de nuevos medicamentos para la hiperestimulación ovárica controlada hasta técnicas de laboratorio como son los diferentes medios y tiempos de cultivo. A partir de la década de los 80's se postuló la posibilidad de exponer a los ovocitos y los espermatozoides a un tiempo reducido debido a existía la teoría de que los radicales libres de oxígeno liberados por el exceso de espermatozoides en periodo de apoptosis en el mismo medio de cultivo en el que se encontraba el cigoto podría ser nocivo para la vida del mismo.

Aunque existen autores que demuestran que la coincubación prolongada de gametos incrementa las tasas de implantación y embarazo (16), la gran mayoría de los autores y expertos en el área exponen resultados en donde la coincubación corta de gametos (2 horas), realmente incrementan significativamente las tasas de fertilización, implantación y embarazo.

A diferencia de la teoría de los radicales libres de oxígeno, existe la teoría de Dirnfeld et. al, la cual dicta que la coincubación prolongada produce un

engrosamiento de la zona pelúcida lo cual afecta principalmente el proceso de implantación, ya que al momento de la implantación, debe de existir una ruptura de esta zona liberando así al blastocisto. Una zona pelúcida engrosada no permite la liberación del blastocisto lo que resulta en una falla en el mecanismo de implantación (17).

III. Planteamiento del problema

Hoy en día, las tasas de infertilidad tienden a ir en aumento. Gracias a la aparición de técnicas de reproducción asistida y a la fertilización *in vitro*, se ha intentado contrarrestar la tasa de fertilidad. Dentro de las mismas técnicas modernas de reproducción se busca de manera constante el obtener mejores resultados tanto en calidad embrionaria como en las tasas de fertilización, implantación y embarazo. Es necesario implementar nuevas técnicas tanto en la hiperestimulación ovárica controlada para obtener mejores ovocitos como en el laboratorio, donde como resultado, obtener mejores embriones para una mayor tasa de implantación, y como meta final, un embarazo.

IV. Justificación.

Dentro de las técnicas de reproducción asistida se implementan día a día nuevas modalidades, tanto en la inducción del tratamiento como en el manejo de los gametos humanos en laboratorio. Un nuevo método para lograr estas metas es la coincubación corta de gametos humanos, el cual ha demostrado en diversos centros de reproducción su eficacia para incrementar de manera

significativa las tasas de implantación y embarazo. El alto beneficio que ofrece esta técnica nos obliga a implementarla, incrementando así los índices de embarazo resultantes de la fertilización *in vitro*.

V. Objetivos.

Evaluar la tasa de fertilización, implantación y embarazo en un centro de reproducción humana tras la coincubación corta y coincubación larga de gametos humanos.

VI. Hipótesis.

Los embriones resultantes de gametos humanos coincubados durante 2 horas (coincubación corta), tienen una mayor tasa de fertilización, implantación y embarazo.

VII. Material y métodos.

Se seleccionaron un total de 284 pacientes que seguían tratamiento para FIV entre Enero del 2000 y Diciembre del 2006. Las pacientes fueron divididas en dos grupos de acuerdo al tiempo de incubación de los gametos. Grupo A (N=225), los gametos fueron coincubados por un lapso de 2 horas. Posteriormente el cúmulus fue removido y los óvulos fueron colocados en un plato de cultivo con medio de cultivo fresco. Grupo B (N=59), los gametos fueron incubados de manera tradicional durante la noche por un tiempo de 16 a 20 hrs.

Los ovocitos fueron calificados en cuanto a su madurez en la captura, y se incubaron durante las 4 horas previas a la fertilización en medio P1 con 10% de sustituto de suero sintético (SSS; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Los espermatozoides fueron preparados por centrifugación en gradiente de densidad Isolate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). La fertilización se realizó utilizando 150×10^3 espermatozoides móviles por plato en un volumen de $200 \mu\text{L}$, recubiertos por aceite mineral. En el grupo I (exposición corta), 3212 ovocitos fueron retirados del medio de inseminación tras una exposición de 2 horas. Estos ovocitos fueron enjuagados cuidadosamente y posteriormente cultivados en medio P1-SSS fresco. En el grupo II (exposición estándar) se coincubaron 654 gametos durante el tiempo convencional de 18 horas. Se realizó la observación de 2PN en ambos grupos 18 horas posterior a la exposición de los ovocitos con los espermatozoides.

Después de realizar la calificación de los cigotos, se procedió al cultivo embrionario en microgotas de $40 \mu\text{L}$ con medio P1-SSS, colocando no más de tres embriones por microgota.

La transferencia de los embriones fue realizada a las 72 h de la captura con un cateter de transferencia de Marrs (Cook Ob/Gyn, U.S.A.).

VII.1. Tipo de estudio

Estudio cuasiexperimental, de corte transversal, retrolectivo y analítico que comprende 284 ciclos de fertilización *in vitro*.

VII.2. Universo y muestra de estudio

Todas las pacientes sometidas a fertilización *in vitro* convencional en una clínica de reproducción asistida privada (Ginecología y Reproducción Humana) de Enero del 2000 a Diciembre del 2006.

VII.3. Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria sometidas a fertilización *in vitro* convencional

VII.4. Variables

Dependientes: Tasa de fertilización, tasa de implantación y tasa de embarazo.

Independientes: Coincubación larga y coincubación corta.

Co-variables: Edad materna, diagnóstico primario, total de ovocitos capturados, ovocitos inseminados, ovocitos fertilizados, tasa de fertilización, calificación embrionaria, número de sacos gestacionales por ultrasonido endovaginal, tasa de implantación, tasa de embarazo.

VII.5. Análisis estadístico

Se empleó para el análisis estadístico el programa SPSS versión 10 para Windows. Se utilizaron variables numéricas de tipo nominales y escalares.

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnof para determinar la normalidad de la muestra. Las variables numéricas escalares se resumen con mediana e intervalo intercuartilar [Md (25°-75°)]. Se define la mediana como el valor que deja a cada lado la mitad de los valores de la muestra, el intervalo intercuartilar

son los valores que se incluyen entre las percentilas especificadas. Las variables nominales se resumen en frecuencias y porcentajes.

Se empleó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar las variables numéricas escalares. Se utilizó la prueba de Chi cuadrada de Pearson o exacta de Fisher para las variables nominales.

Se consideró un nivel de significancia estadística con un valor de $p < 0.05$

VIII. Aspectos éticos

Se conservó en todo momento la confidencialidad de los pacientes, sin que el investigador tuviera acceso a ellos. Se decidió el cambio en el tiempo de incubación de los gametos humanos, de acuerdo a resultados previamente publicados por otros autores. Debido a que este estudio es cuasiexperimental y retrolectivo, no existen implicaciones éticas.

IX. Resultados

Se revisaron 284 ciclos de fertilización *in vitro* comprendidos entre Enero del 2000 a Diciembre del 2006. Se dividieron en 2 grupos de acuerdo al tiempo de coincubación de los gametos humanos. El grupo A (n=225), correspondiente a coincubación corta (2 horas) y grupo B (n=59), coincubación larga (16-18 horas).

La tabla 2 indica las características generales de ambos grupos, demostrando que no existe diferencia entre las edades en ambos grupos. El número total de ovocitos capturados en ambos grupos son proporcionalmente parecidos

obteniendo un promedio de ovocitos capturados por ciclo de 14.7 y 11.7 en los respectivos grupos.

En la tabla 2 se observa una proporción no significativa entre los ovocitos capturados, ovocitos inseminados y ovocitos fertilizados, obteniendo una tasa de fertilización comparable ($p=.22$). La calidad embrionaria entre ambos grupos resulta ser significativa, encontrando una mayor calidad en el día 3 en el grupo de coincubación corta ($p=.023$). el porcentaje de sacos gestacionales por ciclo observados por ultrasonido resultaron tener una diferencia altamente significativa entre ambos grupos, así como la tasa de implantación, obteniendo un valor de $p < .0001$ en ambos casos. Se midieron los niveles de fracción β -hCG en suero materno en los días 10 y 12 posterior a la transferencia embrionaria encontrando valores significativamente mayores en el grupo A, con $p = .001$ y $p < .001$ respectivamente. La tasa de embarazo entre el grupo A ($110/225 = 48.9\%$) y grupo B ($12/59 = 20.3\%$) resultó ser altamente significativa ($p < .0001$).

X. Discusión

Dentro de la fertilización *in vitro* convencional, los gametos humanos son coincubados por 16-18 horas para dar el tiempo suficiente para obtener una tasa de fertilización óptima. Aunque existe un estudio que describe mejores resultados en cuanto a tasa de embarazo a favor de la coincubación larga (16), el proceso de fertilización es generalmente completado dentro de las primeras 2 horas y la exposición prolongada de ovocitos a espermatozoides no es

necesaria (18). De hecho, esta corta exposición es suficiente para lograr tasas de implantación y embarazo aún mejores que la exposición larga (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con observaciones realizadas por otros autores (10, 18). Los efectos benéficos de la coincubación corta pueden ser debido, por un lado a la ausencia del exceso de espermatozoides muertos, lo que disminuye la exposición del cigoto a grandes concentraciones de radicales libres de oxígeno en el medio de cultivo. Estos radicales libres producen un endurecimiento de la zona pelúcida lo cual reduce la expulsión del embrión a través de esta y a su vez, una disminución en su viabilidad y en su implantación.

XI. Conclusiones

El presente estudio demuestra que la exposición corta de gametos humanos incrementa significativamente las tasas de implantación y embarazo en comparación a la exposición larga. Aunque no existe diferencia en la tasa de fertilización, la calidad embrionaria en la coincubación corta es significativamente mejor.

XII. Bibliografía

1. Eduards G, Brody S (1995) Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. Saunders, co.
2. Mariani P, Schuartz D. Sterility and fecundability estimation. J Theor Biol 1983; 105:211-223
3. Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. Science 1986; 223:1389-1394
4. Laurent SL, Thompson SJ, Addy C, Garrison CZ, More EE. An epidemiologic study of smoking and primary infertility in women. Fertil Steril 1992;57:565-572
5. Bryant HE, Love EJ. Video display terminal use and spontaneous abortion risk. Int J Epidemiol 1989;18:132-138
6. Thomas JA, Ballantyne B. Occupational reproductive risk: sources, surveillance and testing. J Occup Med 1990;32:547-554
7. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. Lancet 1978;2:366
8. Mukhopadhaya N, Arulkumaran S. Reproductive outcomes after in-vitro fertilization. Curr Opin Obstet Gynecol. 2007 Apr;19(2):113-9.
9. Carranza-Lira S. (1 ed) (2003). Fundamentos de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva. MDM
10. Gianaroli, L., Fiorentino, A., Magli, M.C. Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. Hum. Reprod. 1996a;11:2507-2511.

11. Stephen EH, Chandra A. Use of infertility services in the United States. 1995, *Fam Plann Perspect* 32:132,2000
12. Cates W, Jr, Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel, *Sex Transm Dis* 26:S2, 1999
13. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P. Sperm morphology, motility and concentration in infertile men, *New Engl J Med* 2001:345;1388
14. Yen, Jaffe, Barbieri (2001). *Reproductive Endocrinology*. Saunders
15. Aurell R, Tur R, Torello JM, Coroleu B, Barri P. Clinical strategies to avoid multiple pregnancies in assisted reproduction. *Gynecol Endocrinol*. 2006 Sep;22(9):473-8.
16. Boone WR, Johnson JE. Extending the coincubation time of gametes improves in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*. 2001 Jan;18(1):18-20.
17. Dirnfeld M, Shiloh H, Bider D, Harari E, Koifman M, Lahav-Baratz S, Abramovici H. A prospective randomized controlled study of the effect of short coincubation of gametes during insemination on zona pellucida thickness. *Gynecol Endocrinol*. 2003 Oct;17(5):397-403.
18. Kattera S, Chen C. Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: A prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2003 Oct;80(4):1017-1021

XIII. Tablas

Tabla 1. Características de los pacientes en los grupos de estudio A y B

| Características | Grupo A (Incubación corta) n=225 | Grupo B (Incubación larga) n=59 |
|--|--|---------------------------------------|
| Edad | 31.5 ± 6.7 | 34.6 ± 4.6 |
| Causas principales de infertilidad (%) | | |
| Masculino | 28.4 | 27.1 |
| Endometriosis | 13.3 | 18.6 |
| Endometriosis | 3.1 | 8.5 |
| Miomatosis | 26.2 | 33.9 |
| Factor Tuboperitoneal | 4.4 | 0 |
| Inmunológico | 16 | 0 |
| Falla ovárica prematura | 3.6 | 0 |
| Sx de ovario poliquístico | 2.7 | 10.2 |
| Esterilidad tubaria previa | 2.2 | 1.7 |
| Idiopática | | |
| No. Total de ovocitos | 3298 | 692 |
| Promedio de ovocitos por ciclo | 14.7 ± 7.8 | 11.7 ± 7.5 |

Tabla 2. Tasas de fertilización, calidad embrionaria (día 3), implantación y embarazo

| | Grupo A | Grupo B | Valor de P |
|-----------------------------------|-------------|------------|--------------|
| Ovocitos capturados (total) | 3298 | 692 | No valorable |
| Ovocitos inseminados (total) | 3212 | 654 | No valorable |
| Ovocitos fertilizados (total) | 2338 | 429 | No valorable |
| Tasa de fertilización | 73.5 | 72.0 | .220 |
| Calificación de embriones (día 3) | 4.0 | 3.6 | .023 |
| Sacos por USG (% ciclo) | .68 ± .87 | .29 ± .72 | < .0001 |
| Tasa de implantación (%) | 24.4 | 6.6 | < .0001 |
| β-hCG día 10 post TE (mU/ml) | 112.8 | 24.7 | .001 |
| β-hCG día 12 post TE (mU/ml) | 650.2 | 59.3 | < .001 |
| Tasa de embarazo | 110 (48.9%) | 12 (20.3%) | < .0001 |

Nota: β-hCG = fracción beta de la hormona coriónica gonadotrópica

TE = Transferencia embrionaria

VII. Material y métodos.

Se seleccionaron un total de 284 pacientes que seguían tratamiento para FIV entre Enero del 2000 y Diciembre del 2006. Las pacientes fueron divididas en dos grupos de acuerdo al tiempo de incubación de los gametos. Grupo A (N=225), los gametos fueron coincubados por un lapso de 2 horas. Posteriormente el cúmulus fue removido y los óvulos fueron colocados en un plato de cultivo con medio de cultivo fresco. Grupo B (N=59), los gametos fueron incubados de manera tradicional durante la noche por un tiempo de 16 a 20 hrs.

Los ovocitos fueron calificados en cuanto a su madurez en la captura, y se incubaron durante las 4 horas previas a la fertilización en medio P1 con 10% de sustituto de suero sintético (SSS; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Los espermatozoides fueron preparados por centrifugación en gradiente de densidad Isolate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). La fertilización se realizó utilizando 150×10^3 espermatozoides móviles por plato en un volumen de 200 μ L, recubiertos por aceite mineral. En el grupo I (exposición corta), 3212 ovocitos fueron retirados del medio de inseminación tras una exposición de 2 horas. Estos ovocitos fueron enjuagados cuidadosamente y posteriormente cultivados en medio P1-SSS fresco. En el grupo II (exposición estándar) se coincubaron 654 gametos durante el tiempo convencional de 18 horas. Se realizó la observación de 2PN en ambos grupos 18 horas posterior a la exposición de los ovocitos con los espermatozoides.

Después de realizar la calificación de los cigotos, se procedió al cultivo embrionario en microgotas de 40 μ L con medio P1-SSS, colocando no más de tres embriones por microgota.

La transferencia de los embriones fue realizada a las 72 h de la captura con un cateter de transferencia de Marrs (Cook Ob/Gyn, U.S.A.).

VII.1. Tipo de estudio

Estudio cuasiexperimental, de corte transversal, retrolectivo y analítico que comprende 284 ciclos de fertilización *in vitro*.

VII.2. Universo y muestra de estudio

Todas las pacientes sometidas a fertilización *in vitro* convencional en una clínica de reproducción asistida privada (Ginecología y Reproducción Humana) de Enero del 2000 a Diciembre del 2006.

VII.3. Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria sometidas a fertilización *in vitro* convencional

VII.4. Variables

Dependientes: Tasa de fertilización, tasa de implantación y tasa de embarazo.

Independientes: Coincubación larga y coincubación corta.

Co-variables: Edad materna, diagnóstico primario, total de ovocitos capturados, ovocitos inseminados, ovocitos fertilizados, tasa de fertilización, calificación

embrionaria, número de sacos gestacionales por ultrasonido endovaginal, tasa de implantación, tasa de embarazo.

VII.5. Análisis estadístico

Se empleó para el análisis estadístico el programa SPSS versión 10 para Windows. Se utilizaron variables numéricas de tipo nominales y escalares.

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de la muestra. Las variables numéricas escalares se resumen con mediana e intervalo intercuartilar [Md (25°-75°)]. Se define la mediana como el valor que deja a cada lado la mitad de los valores de la muestra, el intervalo intercuartilar son los valores que se incluyen entre las percentilas especificadas. Las variables nominales se resumen en frecuencias y porcentajes.

Se empleó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar las variables numéricas escalares. Se utilizó la prueba de Chi cuadrada de Pearson o exacta de Fisher para las variables nominales.

Se consideró un nivel de significancia estadística con un valor de $p < 0.05$

VIII. Aspectos éticos

Se conservó en todo momento la confidencialidad de los pacientes, sin que el investigador tuviera acceso a ellos. Se decidió el cambio en el tiempo de incubación de los gametos humanos, de acuerdo a resultados previamente publicados por otros autores. Debido a que este estudio es cuasiexperimental y retrolectivo, no existen implicaciones éticas.