



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**USO DE ECLOSION ASISTIDA EN DIA 3 EN COMPARACION
CON CONTROLES Y EVALUACION DE ÉXITO
DEPENDIENDO DEL DIA DE TRANSFERENCIA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
**SUB-ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN HUMANA**

PRESENTA:

DR. ALFONSO GERARDO CASTAÑEDA LOYA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JULIO CESAR ROSALES DE LEÓN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

MONTERREY, NUEVO LEÓN. FEBRERO 2017





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

Esta Tesis implica el cierre de un proceso de enseñanza mas, una meta cumplida, que marca el inicio de mi vida laboral y el comienzo de un sinfín de aprendizaje de otra manera.

Es propicio agradecer en este momento a los pilares fundamentales de mi vida en todos los aspectos, mis padres Alfonso y Verónica, ya que sin ellos, ninguno de los caminos que he recorrido serían posibles o hubieran sido mucho mas difíciles.

Quiero agradecer a mis mentores, en especial al Dr Pedro Galache, por ser una guía en nuestras vidas, no solo en el área profesional y académica, sino en el área personal de cada uno de nosotros. Al Dr. Roberto Santos, Dr. Pablo Díaz Spíndola y todos los maestros que forman este gran equipo, por enseñarnos el arte de la medicina e inculcar ese espíritu de servicio y emprendimiento en esta área.

En especial quiero darle las gracias a nuestro Jefe de Enseñanza Julio Cesar Rosales por ofrecernos no solo enseñanza, sino ser nuestro amigo, y de igual manera al equipo IECH formado por el Dr. Iram Obeso Montoya, Dr. Alberto Dávila y Dra. Ashanti Aguilar, por influir en nosotros a través del trabajo diario, la consulta y su amistad.

Gracias a todo el equipo administrativo de esta gran familia IECH, a las maestras y todo el personal que hacen de la estancia en esta institución un momento mas grato y llevadero, gracias por su amistad y apoyo.

Quiero mostrar mi agradecimiento al equipo de laboratorio conformado por el Biol. Genaro, Biol. Samuel y Biol. Oswaldo, que nos orientaron en un área desconocida para nosotros al inicio como lo es el laboratorio y sobre todo por ofrecernos su amistad.

Agradezco de manera muy especial el apoyo y ánimos que han representado para mi mis hermanos Alejandro y Liliana, Alex, Victoria y Jessica, por ser un motor en mi vida, y un gran ejemplo, que me animan a seguir día con día en mi desarrollo profesional, laboral y sobre todo personal.

Por último quiero hacer mención de mis compañeros Rocío, Efren y Carmen Adriana por habernos orientado al inicio de nuestro camino por esta residencia. A César, Jaime y Ricardo por ser mis compañeros de generación con los cuales compartí dos años de formación y crecimiento constante. A Edna, Arnoldo, Virgilio y Karla por su amistad y apoyo en el trabajo.

A Dios gracias por dejarme llegar a este momento y permitirme seguir en este camino de la vida. Muchas gracias.

ÍNDICE

Tema	Página
1.0 Introducción.....	5
2.0 Justificación.....	6
3.0 Marco teórico.....	7
4.0 Planteamiento del problema.....	20
5.0 Hipótesis	21
6.0 Objetivo.....	21
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivo específico	
7.0 Materiales y métodos.....	22
7.1 Diseño del estudio	
7.2 Población y muestra	
7.3 Grupos de estudio	
8.0 Criterios de selección.....	24
8.1 Criterios de inclusión	
8.2 Criterios de exclusión	
8.3 Criterios de eliminación	
9.0 Instrumentos y procedimientos.....	25
10.0 Resultados.....	27
11.0 Discusión.....	45
12.0 Conclusión.....	47
13.0 Bibliografía.....	48

1.0 INTRODUCCION

Desde la introducción a finales de 1970 de las técnicas de reproducción asistida, se desarrollaron avances tecnológicos muy importantes en esta área, como cambios en los protocolos de estimulación, aspiración folicular, fertilización in vitro, cultivo de embriones y transferencias, dando como resultado el uso de técnicas mas eficientes.¹

En la mayoría de las especies la implantación representa uno de los pasos mas críticos en el proceso reproductivo, para que sea exitosa requiere de un endometrio receptivo, embrión funcional en etapa de desarrollo adecuado y una interacción entre los tejidos embrionarios y maternos.

La exposición de los ovocitos y los embriones a condiciones artificiales, crean un efecto negativo en la habilidad del embrión para realizar una eclosión natural. Este proceso, consiste en el adelgazamiento y progresiva desaparición de un área de la zona pelúcida mediante enzimas proteolíticas para permitir la implantación. Los medicamentos empleados, alteran la eclosión disminuyendo el éxito de los procedimientos in vitro ya que la tasa de implantación embrionaria baja.

En 1989, Cohen y colaboradores, reportaron una tasa de implantación mayor en aquellas pacientes a las que se les transfirieron embriones con pequeños orificios en la zona pelúcida hechos mecánicamente, técnica que a través del tiempo se generalizó en los centros de fertilidad alrededor del mundo.¹

La Eclosión Asistida, tiene como objetivo crear, de manera artificial, un orificio en la zona pelúcida del embrión mediante diversas técnicas , con el objetivo de aumentar la tasa de implantación en aquellas pacientes con pronóstico de fertilidad pobre, o en embriones en los que la zona pelúcida se encuentra engrosada.²

Esta técnica fue creada basada en la hipótesis de que una modificación en la zona pelúcida, al realizar un orificio, adelgazamiento o alterando su estabilidad mediante medios químicos se promueve la eclosión o implantación

del embrión ya que sin este apoyo, el embrión no sería capaz de eclosionar por sí solo.

Definir una paciente con pobre pronóstico es difícil, ya que cada clínica de fertilidad tiene sus propios criterios, pero en general la ASRM (American Society for Reproductive Medicine) y la SART (Society for Assisted Reproductive Technology) definen este grupo como aquellas pacientes tienen por lo menos 2 intentos fallidos de Reproducción Asistida de Alta Complejidad, mayores de 38 años, o que desarrollan embriones de baja calidad. ³

2.0 JUSTIFICACION

En la mayoría de las especies, la implantación del embrión representa el paso más crítico del proceso reproductivo; para que sea exitosa requiere: endometrio receptivo, embrión funcional en etapa de desarrollo adecuado e interacción entre los tejidos embrionarios y maternos. La eclosión es el proceso donde el blastocisto se deshace de la zona pelúcida para poder implantarse. La falla o deficiencia en este factor puede generar problemas reproductivos, aun con técnicas de reproducción asistida. ⁴

Los tratamientos actuales de fertilidad, debido a la concentración elevada de hormonas que se utilizan para obtener una estimulación ovárica controlada con buena respuesta, provoca que la zona pelúcida sufra un engrosamiento en su estructura. ⁵ Esto aunado a otros factores, como la edad de la paciente, desarrollo del embrión, fragmentación excesiva entre otros, justifican el uso de la Eclosión Asistida para aumentar las tasas de éxito del tratamiento.

La eclosión asistida busca como objetivo realizar un orificio en la zona pelúcida del embrión mediante diversas técnicas. ⁴ En este protocolo se analiza el método de Láser para realizar la eclosión asistida. En muchos centros de fertilidad, este proceso se hace de forma rutinaria en la mayoría de los

embriones. Esto debe ser analizado para determinar si es un proceso que ofrece mas ventajas o desventajas y si se justifica el uso generalizado en todos los embriones.

Se ha observado que los mejores pronósticos para lograr un embarazo es realizar las transferencias embrionarias en etapa de blastocisto. Este estudio busca valorar si se obtiene un beneficio al realizar la Eclosión Asistida o no, y analizar en que día de transferencia se obtiene la mayor posibilidad de éxito.

Debido al buen pronóstico que representa la transferencia en blastocisto,⁶ como objetivo secundario se busca obtener información acerca del desarrollo embrionario, si la eclosión asistida afecta o no, para lograr que el embrión llegue al día 5 de su desarrollo.

3.0 MARCO TEÓRICO

ZONA PELÚCIDA.

La zona pelúcida es una capa extracelular transparente compuesta por glicoproteínas que rodea al ovocito. Su papel se encuentra relacionado con la fecundación del espermatozoide-ovocito, la inducción de la reacción acrosómica, el bloqueo de la polispermia y la protección del embrión⁶.

La síntesis y secreción de las glicoproteínas inicia cuando el ovocito se rodea por las células foliculares y empieza su crecimiento. La síntesis y secreción continua hasta que se acerca el momento de la ovulación con un pico de actividad cuando el ovocito alcanza su nivel máximo⁷.

Las glicoproteínas que conforman la zona pelúcida son expresadas y sintetizadas de forma secuencial durante la oogénesis en diferentes especies⁸, la cual es específica-específica ya que se ha demostrado que en cada especie la

expresión y aparición de estas glicoproteínas es distinta durante el proceso de crecimiento del ovocito.

Las teorías sobre el origen de estas glicoproteínas son muy polémicas aún, pero se ha llegado a la conclusión de que el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean son las responsables de la síntesis de estas glicoproteínas .

Estructura:

La estructura de la zona pelúcida es distinta de especie a especie. En el humano, el grosor de esta área es de 15-20 μm y su peso aproximado es de 30-33 ng.⁹ Es secretada en capas y posee asimetría entre la capa interna y la externa. La zona interna se localiza cerca del ovocito, desde la membrana plasmática hasta la mitad de la ZP, mientras que la externa se encuentra cerca de las células del cúmulo y medía la interacción con el espermatozoide.

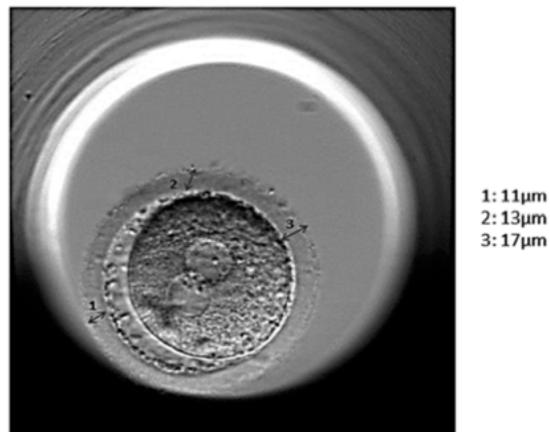
Mediante microscopía de luz polarizada se logran identificar tres capas, una zona interna donde los filamentos se orientan radialmente, una zona externa donde los filamentos se orientan tangencialmente y la zona media, donde hay desorden en el orden de los filamentos. Estas capas conforman una red dispersa de numerosos poros, presentando una morfología en la superficie externa similar a la de un queso suizo, mientras que la superficie interna muestra una apariencia regular y rugosa⁷.

La naturaleza porosa de la zona pelúcida permite la penetración de un relativo número de moléculas grandes como las inmunoglobulinas. Por otro lado pequeñas moléculas como la heparina no penetran, por lo cual el tamaño no es el único factor que permite el ingreso a la zona pelúcida, sino otras propiedades bioquímicas y fisicoquímicas como la carga de las moléculas¹⁰.

La morfología en el ovocito humano cambia al ser fecundado, los no fecundados presentan una zona pelúcida porosa con estructuras en forma de aro superpuestos en capas con un diámetro de 4 micrómetros que va disminuyendo de tamaño en los poros interiores. En los ovocitos fertilizados, la

zona pelúcida se compacta, se funden los anillos y los poros se borran siendo reemplazados por un material amorfo.

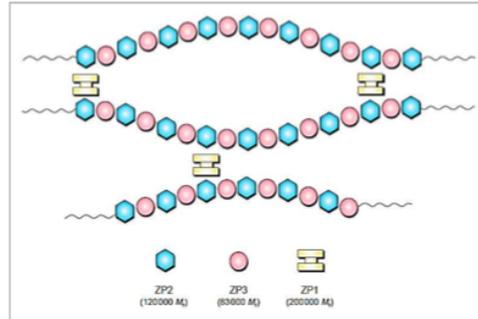
El grosor de la zona pelúcida en humanos también es diferente según la etapa de desarrollo. Los embriones poseen una ZP fina, de $15,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$, mientras que los ovocitos inmaduros de $20,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$ y los ovocitos maduros de $19,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$. Esto se debe a la disminución de la capa externa con el desarrollo progresivo del embrión ¹¹.



Ovocito humano fecundado: medidas de la ZP indicadas por flechas.

Glicoproteínas:

Las proteínas que conforman la zona pelúcida están altamente glicosiladas por lo que se les denomina glicoproteínas. Las glicoproteínas son cuatro en la especie humana, denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. Su aspecto es de bandas que puede ser ancho ya que las proteínas son muy heterogéneas en su grado de glicosilación. El dominio ZP está compuesto por una secuencia de 260 aminoácidos, que contiene 8 residuos de cisteína y se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína ¹².



Los filamentos están contruidos por unidades repetitivas ZP2-ZP3 y Entracruzados Por ZP1.

Función de la Zona Pelúcida:

La zona pelúcida esta involucrada en diferentes etapas críticas durante el proceso de la fecundación. Provee los receptores para el proceso especie-específico de la adhesión y la unión de los espermatozoides capacitados. La eliminación de la zona pelúcida tiene como consecuencia el derribo de una de las barreras para que se produzca la fecundación in vitro del ovocito por espermatozoides de otras especies ¹³.

Además presenta componentes que inducen la reacción acrosómica. Al penetrar el espermatozoide, se produce un cambio en la zona pelúcida, la reacción zonal, cambio que evita la polispermia. Presenta también un importante papel en la diferenciación de las células de la granulosa y la foliculogénesis, así como factor protector del desarrollo temprano del embrión.

La macromolécula presente en la ZP es la responsable de la unión primaria con la membrana de la cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto.

La reacción acrosómica que presenta el espermatozoide, es causada por diversos factores como la progesterona y también por la zona pelúcida al entrar en contacto con el espermatozoide lo que produce un aumento del Ca^{2+} intracitoplasmático.

INDICACIONES DE ECLOSION ASISTIDA:

Para realizar el proceso de eclosión asistida, existen varias indicaciones específicas, las cuales son:

- 1) *Edad de la mujer:* A partir de los 37 años la tasa de implantación disminuye gradualmente, y el descenso notable se presenta a los 40 años de edad. En este grupo de pacientes, el proceso de envejecimiento afecta a los óvulos de diversas formas, dificultando la eclosión del blastocisto al presentarse un engrosamiento de la zona pelúcida. La edad también altera cromosómicamente al óvulo., se afecta la meiosis , elevando hasta en un 79% las aneuploidías, cuya incidencia se estima en un 17% en las pacientes mas jóvenes. ⁴
- 2) *Aumento de la FSH basal sérica:* Este es el primer cambio neuroendócrino durante el envejecimiento ovárico. Este cambio puede afectar al ambiente endocrino, parácrino y autócrino del folículo y la zona pelúcida del ovocito. Se ha demostrado que existen bajas tasas de implantación en pacientes con elevadas concentraciones de hormona foliculo estimulante con un punto de corte de 9 mIU/mL en el día 3 del ciclo menstrual.¹⁴
- 3) *Esterilidad de origen desconocido:* Cuando los fallos repetidos de los tratamientos no pueden ser atribuidos a una causa específica, se puede utilizar la Eclosión Asistida como una técnica de rescate, obteniendo resultados variables según la experiencia del embriólogo. ⁴
- 4) *Antecedentes reproductivos:* Dos fallos previos de reproducción asistida de alta complejidad, independientemente de la edad de la paciente, es suficiente para considerar el uso de esta técnica, ya que favorece que la implantación del embrión en desarrollo sea más temprana al permitir una sincronía mas adecuad entre el embrión y el endometrio. ¹⁵
- 5) *Ritmo de división embrionaria:* Los embriones con un ritmo de división lenta (≤ 6 células al día 3 de desarrollo) tienen una tasa de implantación menor que los embriones con un ritmo normal.

6) *Multinucleación*: Embriones que presentan al menos una blastómera multinucleada en el día 2 del desarrollo embrionario, tienen una menor tasa de implantación y pueden verse beneficiados con esta técnica.

7) *Zona pelúcida de coloración anormal*: El aspecto post maduro o cambios en la coloración pueden mejorar sus tasas de implantación con la Eclosión Asistida.⁴

8) *Grosor de la Zona Pelúcida*: El grosor de esta zona varía durante el desarrollo embrionario y se va adelgazando durante la primera y segunda división celular hasta hacerse una fina capa cuando el blastocisto se está expandiendo. El fallo en este proceso puede alterar la implantación, y se ha propuesto utilizar la Eclosión Asistida en aquellos embriones con un grosor de la zona pelúcida mayor a 15 micrómetros.¹⁴

9) *Baja respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada*: Este grupo de pacientes suele tener mayores alteraciones en la zona pelúcida que aquellas pacientes normorrespondedoras. La elasticidad y el grosor de la zona pelúcida están influidos por el ambiente endócrino durante el desarrollo folicular. Sin embargo, la baja respondedora que presenta niveles elevados de FSH sérica basal, se ve beneficiada con esta técnica.¹⁵

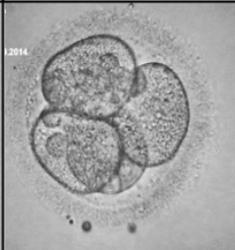
10) *Fragmentación excesiva*: los fragmentos celulares son porciones de citoplasma carentes de núcleo y rodeados de una membrana. La mayoría de los fragmentos se forman durante la mitosis, durante las 2 primeras divisiones celulares, y su presencia es común en los embriones humanos, aunque se desconocen las señales extrínsecas o intrínsecas que los genera.¹⁶

Aún así, se cree que en cuanto mayor es el grado de fragmentación menor es la capacidad del embrión para realizar una adecuada división celular. Por lo tanto, los embriones que muestran menor cantidad de fragmentos se consideran más competentes desde el punto de vista de desarrollo y se les da prioridad para la transferencia.¹⁶

El potencial de implantación de los embriones fragmentados no sólo se determina por su grado de fragmentación sino también por su tamaño y distribución dentro del embrión. La eclosión asistida, elimina los fragmentos, con

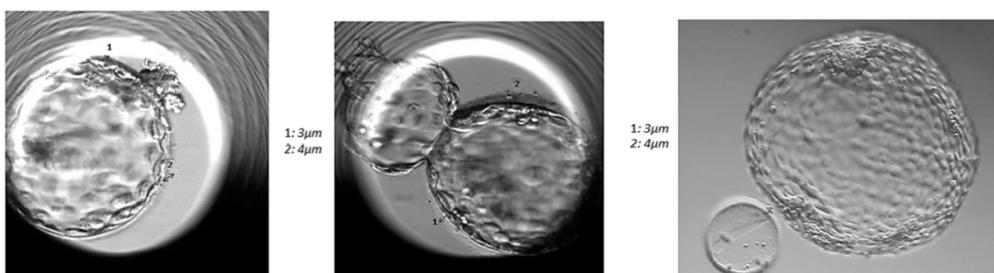
el objetivo de restablecer la capacidad de desarrollo en embriones con más del 25% de fragmentos, independientemente de su tamaño y distribución.

Con su uso, se reestablece la relación espacial de las blastómeras, el contacto entre las células y los planos normales de división del embrión, dando lugar a la formación de blastocistos de mejor pronóstico ¹⁶.

Grade	0	1	2	3
	0%	Up to 10%	10 - 25%	> 25%
Amount Of Fragmentation				

Clasificación del embrión según el % de fragmentación.

11) *Criotransferencia*: Las tasas de embarazo e implantación en transferencia 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 llega a comprometer la viabilidad del embrión. Al realizar la Eclosión Asistida, se consigue restablecer la capacidad de desarrollo e implantación en estos embriones una vez descongelados. ¹⁷



Proceso de Eclosión del humano desde la división pre embrionaria hasta la liberación completa del embrión de la zona pelúcida.

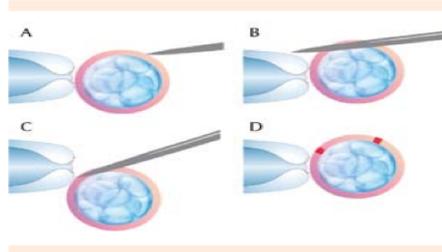
ASPECTOS TECNICOS DE LA ECLOSION ASISTIDA:

Se describen varias técnicas para realizar este procedimiento que consisten en 3 métodos: mecánicos, químicos y con láser.¹⁷ El uso de la técnica depende de la experiencia del embriólogo y la disponibilidad de la técnica. Los riesgos que existen es la lisis de alguna célula del embrión que disminuya la posibilidad de éxito.¹⁸

El defecto que se crea en la zona pelúcida es solo en una porción, la remoción completa de la Zona Pelúcida no debe realizarse antes de la compactación ya que no existen uniones estructurales entre las células.¹⁸

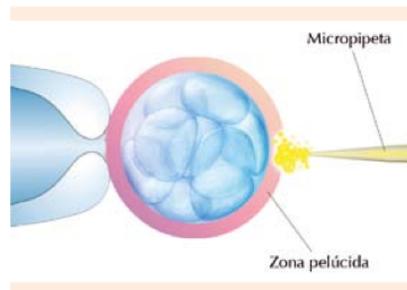
Mecánico: Esta técnica no se emplea mucho en la actualidad, consiste en realizar pequeños orificios con microagujas de vidrio en dos sitios de la zona pelúcida en el área donde el espacio perivitelino sea mayor, para disminuir el riesgo de daño. Todo el proceso es calculado mediante la visión directa con el microscopio, proceso en el cual fácilmente se pueda dañar a las células por ser operador-dependiente. Mediante la micropipeta de fijación que funciona con succión, se hacen los cortes en la zona pelúcida con la pipeta de inyección que se utiliza para el ICSI, buscando realizar los cortes de manera que se forme un orificio en forma de cruz.¹⁹

El objetivo de la técnica mecánica es crear el orificio en todo el espesor de la Zona Pelúcida, ya que otras técnicas utilizadas como el ácido Tyrodes o el láser, pueden no perforar la zona pelúcida en todo su espesor, dejando la capa más interna intacta, provocando que la eclosión sea difícil.²⁰



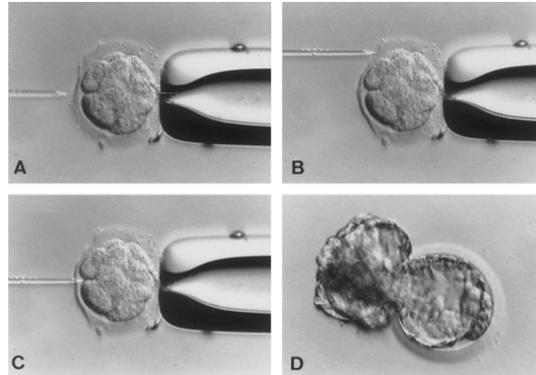
Disección parcial de la zona. El embrión se sostiene con el micromanipulador y con la microaguja. Se realizan dos orificios de manera tangencial.

Ácido tyrodes: Descrita por Cohen y cols en 1990, esta técnica consiste en depositar con una micropipeta fina, una solución de ácido Tyrodes cerca de la zona pelúcida, en una zona de 20 a 30 μm en la capa interna y de 30 a 50 μm en la capa externa de la solución que presenta un pH 2.35, que logra disolver esa área de zona pelúcida, posteriormente, el embrión se lava con medio fresco y se coloca en cultivo hasta el momento de la transferencia.²¹



Aplicación de la solución de ácido tyrodes para disolver la zona pelúcida.

Micromanipulador Piezo: Esta técnica utiliza un micromanipulador creado en un principio para realizar ICSI, el cual mediante pulsaciones piezoeléctricas, produce un adelgazamiento del 75% de la zona pelúcida y un orificio de 20 μm en el sitio de unión de las blastómeras.²²



Utilización de Micromanipulador PIEZO, donde se observa mediante vibraciones se adelgaza en un 75% el grosor de la ZP y se crea un orificio de 20 Mm.²³

Láser: Es la técnica actualmente mas utilizada alrededor del mundo, ya que el láser puede ser utilizado también en adelgazamiento de la zona pelúcida, toma de biopsia de blastómeras, biopsia de trofoectodermo y biopsia de cuerpos polares.

Funciona mediante un haz de láser enfocado durante un corto tiempo que calienta y desintegra la zona pelúcida con magnífica precisión. Todos los lasers disponibles funcionan en el mismo espectro de luz, cercano a lo infrarrojo a 1480nm de longitud de onda. Los rangos de poder varían de 100mW a 400 mW y algunos sistemas ofrecen rangos variables.²⁴

Debido a que su uso es mediante un software preciso, garantiza la seguridad de su operación, aunque aun no se logra determinar el probable daño a las células circundantes que pueda provocar la energía y la temperatura. En el caso de Eclosión Asistida, se utiliza una onda de 400 mW durante 200 μ s para realizar un orificio de 8 μ m.²⁴



Orificio creado en la Zona Pelúcida mediante el uso de Laser.

Con el paso del tiempo y la evolución de la tecnología, las primeras técnicas fueron disminuyendo su uso debido a que son técnicas altamente dependientes de la experiencia del embriólogo que las realiza, dando paso al láser, debido a su alto margen de seguridad y a la precisión de los cortes en su manejo.

Comparación de técnicas:

Actualmente las técnicas mecánicas ya no son muy utilizadas, y el uso de ácido Tyrodes y el Laser son los métodos mas comunes. Aunque algunos autores mencionan que el uso de ácido Tyrodes pueden presentar dificultades al momento de eclosionar.²⁵

El uso de las dos técnicas es seguro, pero debido a que el Laser es mas sencillo, con tiempos mas cortos para su realización, una relativamente corta curva de aprendizaje por parte del operador, su precisión tan elevada y sus múltiples funciones como la toma de biopsias, se ha vuelto el método de elección.

La tasa de desarrollo de blastocistos, es similar en ambas técnicas, reafirmando que el uso de láser no impide el desarrollo embrionario.²⁶

Método	Ventajas	Desventajas
Mecánicos	No hay exposición a calor o químicos potencialmente embriotóxicos, no se ha demostrado que afecte el desarrollo embrionario, económico.	Requiere tiempo, doble micromanipulador, adiestramiento específico, al realizar la disección de la ZP se pueden dañar las blastómeras.
Químicos	El tamaño de la perforación de la zona pelúcida es mayor y favorece la eclosión, costo bajo.	Requiere doble manipulador, no se puede regular el tamaño de la perforación, puede ser embriotóxico.
Láser	No requiere micropipetas o manipuladores, genera resultados consistentes y tamaño de la apertura de la ZP es controlado, provoca menos grado de lisis de las blastómeras comparado con los medios químicos, es un método rápido y fácil de realizar.	El tiempo de exposición prolongado puede dañar los embriones, equipo muy costoso, la perforación realizada puede causar constricción y lisis de las blastómeras.

Tabla: comparación de técnicas.²⁷

Riesgos durante el proceso Varios son los riesgos que se corren durante la práctica de la eclosión asistida como lo son el uso excesivo de ácido Tyrodes lo que disminuye el pH de el área donde se realizará el orificio, uso de materiales de succión controlados manualmente que no permiten la liberación controlada de los fluidos durante el proceso, creación de orificios menores de 10 μm que no permite la eclosión correcta, o mayores de 25 μm que provocan la pérdida de células.²⁸

Riesgos de malformaciones congénitas.

Un estudio realizado en Tokyo, (. Junna Jwa MD, et. al., Julio 2015) con la base de datos del Registro Nacional de Reproducción Asistida de Japón, que analiza el riesgo de malformaciones congénitas mayores en recién nacidos a los que se les realizó Eclosión Asistida durante el tratamiento de invitro, entre el 2010 y 2012, analizó un total de 72,128 ciclos, de los cuales 35,488 (49.2%) fueron sometidos a este procedimiento, demostró que no hay diferencias significativas.

El estudio, consideró anomalías congénitas mayores, a aquellas catalogadas por la CDC y las guías de prevención, excluyendo las anomalías congénitas menores y complicaciones por prematuridad.

En el grupo de pacientes estudiadas, se presentó un total de 1,046 anomalías congénitas mayores, que representa un 1.4% de las pacientes, comparado con el 1.5% de las pacientes con anomalías congénitas a las que no se les realizó la Eclosión Asistida.

Los resultados sugieren que la Eclosión Asistida por sí sola, no representa un mayor riesgo en la aparición de malformaciones congénitas mayores.²⁹

Otro estudio realizado en China en el 2014 (Hanying Zhou et. Al) , sugiere que no existen efectos adversos en los resultados obstétricos y perinatales utilizando Láser en el procedimiento de Eclosión Asistida. Este estudio valoró a 699 mujeres y 392 recién nacidos, comparando dos grupos: Grupo A (480 embriones descongelados en día 3) al que se le realizó EA con láser y Grupo B (335 embriones) al grupo control. El Grupo A presentó una tasa de implantación del 31.85% vs 16.95% del Grupo B, embarazo clínico de 53.96% vs 33.43% y nacido vivo de 44.58% vs 23.88%. No existieron diferencias en la edad gestacional, peso del recién nacido y calificación de Apgar.

Se presentaron 4 malformaciones congénitas en el Grupo A y 3 en el Grupo B (2 menores y 1 mayor), lo que sugiere el uso de Laser en Eclosión Asistida como un método seguro.¹⁴

4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tratamientos actuales de fertilidad de Alta Complejidad, a pesar de los avances tecnológicos en el área de la ciencia, siguen ofreciendo tasas bajas de éxito en relación a la obtención de una prueba de embarazo positiva, y con mayor proporción en el nacido vivo que llega a casa. Un alto porcentaje de nuestra población de pacientes, presenta los criterios de inclusión de este estudio, debido a que generalmente son pacientes que postergan su maternidad, y requieren altas dosis de medicamentos para obtener respuesta ovárica.

Los tratamientos que actualmente ofrecemos, pueden tener un efecto deletéreo en el embrión y su desarrollo, aumentando el grosor de la zona pelúcida. Lo anterior disminuye la morfocinética de la división celular y aumenta el grado de fragmentación en el embrión. Esto provoca un engrosamiento de manera importante y endureciendo la zona pelúcida.

Como médicos, debemos de buscar el mayor beneficio de nuestras pacientes, buscando el uso de la tecnología disponible en nuestro medio, pero sin perder de vista que no todos los procesos, tecnología y ciencia son aplicables en todas las pacientes, cada caso es distinto y necesita una atención especial.

Debido a que un proceso como lo es la Eclosión Asistida, es operador dependiente, es importante analizar y clasificar nuestra experiencia en el centro de fertilidad, para poder definir de manera exacta a que pacientes se les va a ofrecer un beneficio real y a que pacientes se les puede perjudicar en los resultados al realizar este procedimiento.

Es de muy importante realizar un estudio retrospectivo de nuestra experiencia para definir que procesos se están aplicando, y hacia donde debemos de dirigir nuestra práctica, creando pautas precisas de nuestro centro de fertilidad de acuerdo a la experiencia obtenida, y que sean comparables con las normas internacionales establecidas para aplicar el proceso de la Eclosión Asistida de manera eficaz y bien indicado.

5.0 HIPÓTESIS

Hipótesis de Investigación.

La eclosión asistida en el día 3 tiene mayor tasa de formación de blastocisto y una tasa de implantación mayor en comparación con los embriones en los que no se realiza.

Hipótesis Nula.

La eclosión asistida en el día 3 no tiene efecto en el índice de implantación ni en la evolución a blastocisto en comparación con los embriones en los que no se realiza, sin depender del día de transferencia

Hipótesis de Alterna.

La eclosión asistida en el día 3 tiene menor índice de implantación en comparación con los embriones en los que no se realiza, sin depender del día de transferencia

6.0 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar si el uso de Eclosión Asistida mediante Laser, aumenta la tasa de implantación en relación con las pacientes a las que no se les realizó este procedimiento.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar las características demográficas y clínicas del grupo de estudio (pacientes sin Eclosión Asistida) y los grupos control (grupo de pacientes con Eclosión Asistida en D3 con transferencia embrionaria en D3 y Eclosión Asistida en D3 con transferencia embrionaria en D5).
- Conocer el mejor perfil para lograr éxito en la implantación

7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo replicativo, observacional, transversal, ambispectivo, analítico y comparativo en la población de pacientes sometidas a tratamientos de estimulación ovárica para un tratamiento de fertilización in vitro, homólogo con transferencia en fresco. A los embriones se les realizó el procedimiento de Eclósión Asistida con Láser comparándolo con aquellos embriones en los que no se utilizó dicha técnica. El estudio se llevo a cabo en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey Nuevo León, en el periodo comprendido de enero del 2014 a octubre del 2016.

Este estudio fue aprobado para su realización por la Dirección y el Comité de Ética del Centro de Fertilidad IECH Monterrey.

7.2 Población y muestra

El presente estudio se llevo a cabo en el periodo comprendido de enero del 2014 a octubre del 2016, en la población de pacientes que entraron al programa de In Vitro en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey Nuevo León. Se analizaron los expedientes físicos de el Centro de Fertilidad y de el Laboratorio de In Vitro del IECH, realizando una comparativa con la base de datos electrónica general del centro de fertilidad.

El total de pacientes que ingresaron a tratamiento en el IECH durante este periodo fue de 909. Las pacientes que fueron consideradas para este estudio por cumplir con los criterios de inclusión establecidos fueron un total de 637 pacientes (272 no fueron contempladas por no cumplir con los criterios de inclusión o pertenecer al grupo de eliminación).

7.3 Grupos de estudio

Para cumplir el objetivo del presente estudio se incluyeron 2 grupos principales:

- Grupo 1: Pacientes a las cuales se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida durante su tratamiento de fertilidad, siendo un total de 222 pacientes.
- Grupo 2: Pacientes a las cuales no se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida durante su tratamiento de fertilidad, las cuales fueron 415 pacientes.

Dentro de los grupos, se crearon subgrupos de la siguiente manera:

- Grupo 1:
 - I. Subgrupo 1.1: Pacientes a las cuales se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida en día 3 de desarrollo embrionario y se realizó la transferencia en etapa de blastocisto (día 5 de desarrollo embrionario).
 - II. Subgrupo 1.2: Pacientes a las cuales se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida en día 3 de desarrollo embrionario y se realizó la transferencia en día 3 de desarrollo embrionario.
 - III. Subgrupo 1.3: Pacientes a las cuales se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida en día 5 de desarrollo embrionario y se realizó la transferencia en día 5 de desarrollo embrionario.
- Grupo 2:
 - I. Subgrupo 2.1: Pacientes a las cuales no se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida y se realizó la transferencia embrionaria en día 3 de desarrollo embrionario.
 - II. Subgrupo 2.2: Pacientes a las cuales no se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida y se realizó la transferencia embrionaria en etapa de Blastocisto (día 5 de desarrollo embrionario).

8.0 CRITERIOS DE SELECCIÓN

8.1 Criterios de inclusión

- Pacientes atendidas en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey.
- Pacientes que asistieron al Centro de Fertilidad IECH, en el periodo comprendido de enero del 2014 a octubre del 2016, que entraron al programa de Fertilización In Vitro.
- Ciclos Homólogos de fertilización in Vitro.
- Pacientes a los cuales la transferencia embrionaria se les realizó en fresco.

8.2 Criterios de exclusión

- Pacientes de baja complejidad.
- Pacientes del programa de donación óvulos.
- Pacientes del programa de muestra espermática heteróloga.
- Pacientes que no fueron transferidas en el mismo ciclo de la estimulación.

8.3 Criterios de eliminación

- Se eliminó el grupo 1.3, debido al escaso número de pacientes que conformaba este grupo (N=13), ya que no es una comparación significativa con los demás grupos.
- Expediente extraviados.
- Expediente ilegibles.
- Expediente incompletos.
- Ausencia del resultado de la prueba de embarazo.

9.0 INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS

Procesos y métodos de confiabilidad:

El procedimiento de la Eclosión Asistida, fue realizada mediante láser con el instrumento ZILOS-tk (Zona Infrared Laser Optical System), de la compañía Hamilton Thorne, Version 5.11 del 2013. Se realizaron orificios en la Zona Pelúcida de 8 μm , durante 600 a 700 μs , a una capacidad de intensidad del 100%, con una longitud de onda de 1480 nm con el objetivo de minimizar la duración de los pulsos y disminuir el riesgo de la propagación del calor a las células vecinas. El procedimiento realizado en D3, se lleva a cabo en el área en la cual se presente mayor porcentaje de fragmentación o exista mas espacio disponible para realizar el procedimiento sin dañar al embrión. En etapa de blastocisto, la acción del rayo láser, se realiza lo mas alejado posible de la masa celular interna para disminuir el riesgo de daño.

El orificio se realiza solo en una sola área de la zona pelúcida, ya que si se realiza en varias zonas, se corre el riesgo de pérdida del embrión durante el proceso de eclosión y un desarrollo anormal. También al realizar orificios pequeños puede provocar una constricción del embrión y un desarrollo embrionario anormal, por lo que es muy importante realizar el orificio del tamaño adecuado.

Al realizar la medición y dureza de la zona pelúcida, se utiliza el pulso que se requiera en cada embrión, utilizando una duración de bajo pulso en zonas pelúcidas delgadas de $<10\mu\text{m}$ con una sola pulsación, una duración media de pulsos en caso de remoción de la zona y una duración de pulso alto en aquellas zonas pelúcidas de $>17\mu\text{m}$ de grosor.

HERRAMIENTAS

IBM SPSS v24 ° R STUDIO 1.0.136 – 3.3.2 ° 2016 MSO Excel 16.0.6925

La captura de datos se realizó de manera manual, seleccionando las relacionadas con el perfil sociodemográfico y clínico de las pacientes; los datos fueron capturados en una base de datos desarrollada en Excel Microsoft Office para posteriormente ser analizados en el programa

ANÁLISIS INICIAL

Se determinaron valores de tendencia central, desviación estándar, análisis de normalidad e histogramas de frecuencia para variables cuantitativas. Se determinaron proporción de frecuencia, porcentaje en relación al total de entradas además de proporción de frecuencia para escalas al estudiar variables categóricas.

ANÁLISIS DE POBLACIÓN

Se evaluaron datos demográficos y antecedentes que prevalecieron en la muestra que pudieran ser de interés.

ANÁLISIS COMPARATIVO E INFERENCIAL

Se agrupó a los embriones según recibieran Eclosión Asistida o No en su día 3 o 5, a partir de este punto de comparación se estudiaron las relaciones entre las variables paramétricas y no paramétricas. Para las variables de tendencia central se compararon con T de Student ajustado a normalidad de dos colas los grupos de interés a tomar como significativos valores de P menor a 0.05, en caso de no ser paramétrica se estudió con la prueba pertinente de acuerdo a cantidad de categorías presentes en la variable. Otros resultados fueron interpretados por el autor reportándose datos interesantes para el estudio. En caso de requerirse se realizó GLM para múltiples variables a comprar en función de la varianza.

Para los muestreos categóricos a comparar se empleó prueba de Fisher o la distribución χ^2 según la característica de la contingencia, para describir las diferencias entre los grupos de comparación, se tomó significativo P menor a 0.05.

Se elaboró dispersión y regresión para datos significativos correlacionables. Se estudió la muestra para observar factores de riesgo/beneficio al analizar grupos y subgrupos (Coeficiente de Momios OD, Riesgo Relativo RR, Numero Necesario a Tratar).

10.0 RESULTADOS

Se analizaron un total de 637 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para el estudio. A un total de 222 pacientes (34.5%) se les realizó el procedimiento de Eclosión Asistida con Laser, mientras que a 415 pacientes (65.15%) no se les realizó el procedimiento.

Dentro de la división por subgrupos., al Subgrupo 1.1 (EA D3 TED5) fue conformado por 72 pacientes (11.3%) y el subgrupo 1.2 (EA D3 TED3) por 150 pacientes (23.55%).

El subgrupo 2.1 (No EA TED3) es de 207 pacientes (32.5%) y el subgrupo 2.2 (No EA TED5) por 208 pacientes (32.65%).

Realizando la comparación de pacientes del Subgrupo 1.1, con el Subgrupo 2.2, observamos que no existen diferencias en la edad (35 ± 4 años, $P= 0.143$) de estos grupos, tampoco hay diferencia en la cantidad de folículos observados en el ultrasonido de ($M 9.9 \pm 4.59$, $P=0.095$), además, en cuanto a recuperación de blastocisto, encontramos diferencias dadas por el número de captura de óvulos entre los grupos siendo en grupo 1.1 menor ($M 2.54$, ± 1.28 Blastocistos, $P=0.009$), y una tasa de fertilización ($M 5.49 \pm 2.43$, $P=0.017$) con diferencias dadas de igual forma por el numero inicial ovocitos obtenidos. El grupo al que no se le realizó Eclosión Asistida muestra una mayor fertilización y

mayor posibilidad de lograr su desarrollo a blastocisto en comparación con aquellos a los que se les realizó Eclosión Asistida (M 47.9 % \pm 24.24, P=0.021) en día 3 de evolución con transferencia en etapa de Blastocisto. El factor masculino no muestra ninguna influencia, ya que todas las variables analizadas (Cuenta Total Motil, Formas Normales y Motilidad Espermática) no muestran significancia estadística.

Al realizar las comparaciones entre Eclosión asistida en día 3 y transferencia en el día 5 necesario para lograr un PIE positivo, solo el 14.54% (RR 0.3, P=<0.001) de los embriones tratados resultaron con una Prueba sérica de embarazo positiva en relación a los embriones sin esta técnica, los cuales tuvieron una incidencia de PIE positivo de 43.61%. Para los embriones tratados con Eclosión asistida en el día 3 y transferencia en el día 3, se obtuvo una incidencia de éxito relativamente similar con un 19.38% (RR 0.8627, P=0.4889) en comparación con el grupo control.

Al dividir la muestra según la edad óptima de éxito del árbol de decisión (P=<0.001) por edad mayor o menor de 37 años, encontramos una pérdida de significancia estadística en la comparación de pacientes con eclosión asistida en el día 3 y transferencia en el día 5 teniendo una incidencia de PIE positivo de 60.75% (RR 1.18, P=0.4922) en las pacientes mayores de 37 años, lo cual pudiera hacernos pensar que el proceso de eclosión asistida en día 3 con transferencia en día 5 elimina a la edad de la paciente como factor.

Transferencia	Grupo	PIE Positivo	PIE Negativo	χ^2	p. val	RR
		N, %	N, %			
	D3TD5	33 (14.54%)	39 (9.51%)	3.1961	0.0738	1.5283
	D3TD3	44 (19.38%)	106 (25.85%)	3.0478	0.0808	0.7497
	NoAHTD3	51 (22.47%)	156 (38.05%)	15.4688	<0.001	0.5905
	NoAHTD5	99 (43.61%)	109 (26.59%)	18.4956	<0.001	1.6405
		N, %	N, %	χ^2	p. val	RR
LASER	D5-D3	33 (42.86%)	194 (51.46%)	1.564	0.2111	0.8328
No AH	D5-D3	99 (66%)	128 (42.11%)	21.9931	<0.001	1.5675
		N, %	N, %	χ^2	p. val	RR
	D5-noD5	33 (25%)	194 (60.25%)	45.1287	<0.001	0.4149
	D3-noD3	44 (46.32%)	183 (50.97%)	0.4792	0.4888	0.9086
		N, %	N, %	χ^2	p. val	RR
	>37 años	81 (35.68%)	229 (55.85%)	22.9945	<0.001	0.6389
	>37 años D3TD5	31 (60.78%)	20 (51.28%)	0.4717	0.4922	1.1853
	>37 años D3TD3	15 (34.09%)	64 (60.38%)	7.5962	0.0058	0.5646
	>37 años	21 (41.18%)	91 (58.33%)	3.8914	0.0485	0.7059
	NoAHTD3					
	>37 años	32 (32.32%)	54 (49.54%)	5.652	0.0174	0.6525
	NoAHTD5					

Comparando el Subgrupo 1.2 con el Subgrupo 2.1 en los cuales la transferencia fue realizada en día 3 de desarrollo embrionario, encontramos lo siguiente: obtuvimos una edad promedio de (M 35.65 \pm 4.57, P=0.772), cantidad de folículos observados en el ultrasonido (M 7.95 \pm 4.14, P=0.246), una recuperación de blastocisto no valorable debido a que la transferencia se realizó en el día 3 de desarrollo embrionario y una fertilización de (M 5.85 \pm 3.52, P=<0.001). Por lo tanto el grupo al que no se le realizó Eclosión Asistida muestra una mayor fertilización en comparación con aquellos a los que se les realizó Eclosión Asistida en día 3 de evolución con transferencia el mismo día. El factor masculino no muestra ninguna influencia como en el grupo comparativo anterior, ya que todas las variables analizadas (Cuenta Total Motil, Formas Normales y Motilidad Espermática) no muestran significancia estadística.

Al realizar un estudio del patrón necesario para lograr un PIE positivo, encontramos diferencia estadísticamente significativa (P=<0.001), mostrando que el 19.38% (44 pacientes) resultaron con una Prueba sérica de embarazo positiva a las que no se les realizó el procedimiento de EA, comparando con el

22.47% (51 pacientes) con Prueba sérica de embarazo positiva de las pacientes a las que se les realizó el procedimiento de EA.

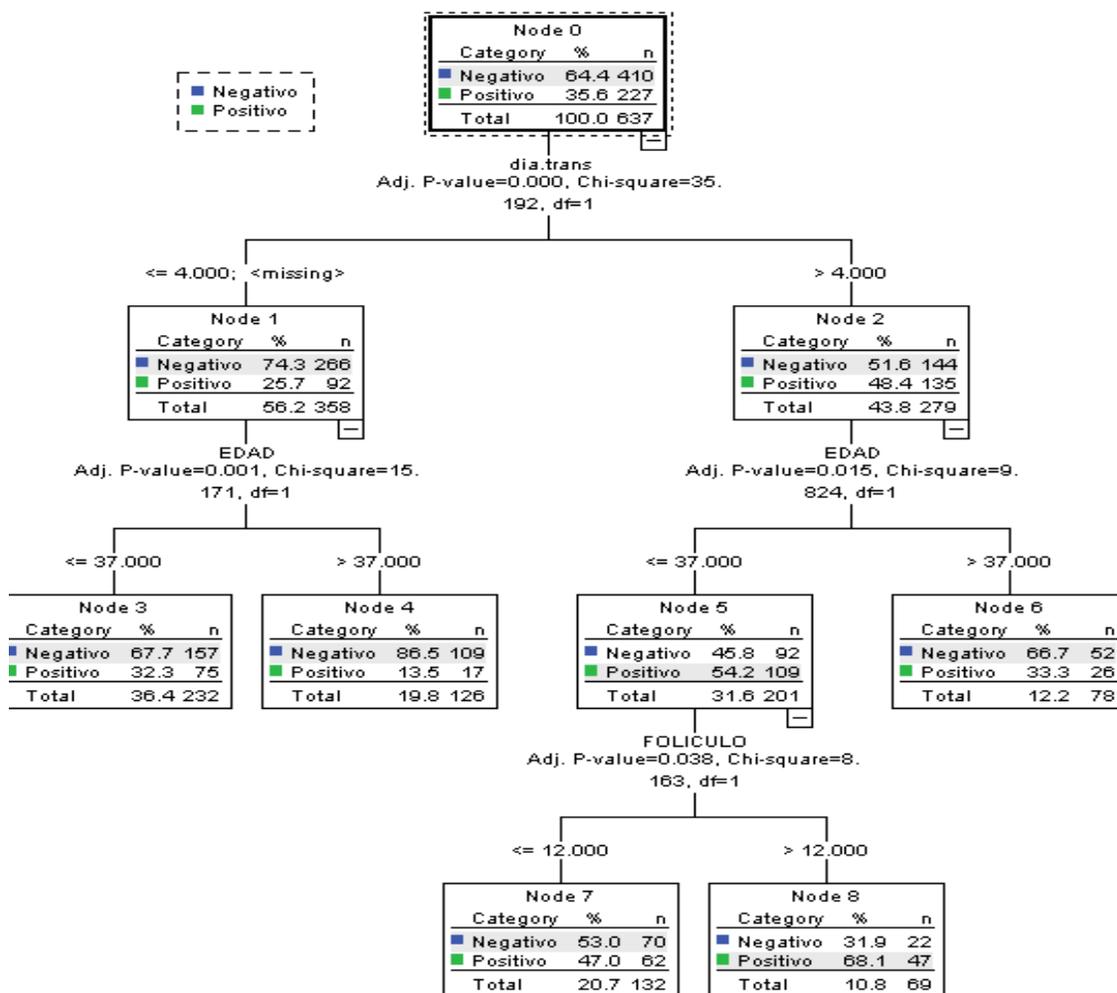
Con relación a los resultados de prueba de embarazo positivo y negativo, en el grupo 1.1, el resultado positivo presentó un mayor porcentaje de pruebas positivas (14.54%, RR 1.52, P=0.0669), en el grupo 1.2, fueron mayores los resultados negativos que los positivos (19.38%, RR 0.749, P=0.079). Al comparar los grupos de No Eclosión Asistida, el subgrupo 2.1 tiene mayor porcentaje de pruebas negativas que positivas (22.47% RR 0.59, P=<0.001) y el subgrupo 2.2 tiene mayor cantidad de pruebas positivas que negativas (26.59%, RR 1.64, P=<0.001) mostrando significancia estadística en ambas comparaciones.

Transferencia	Estimulación y Asistencia	Asisted Hatching	NoAH	p. val	t - test
		Media, DE	Media, DE		
D5	Folículo	35 ±4	34.07 ±4.85	0.143	1.468
D5	Óvulos Aspirados	9.9 ±4.59	11.04 ±5.1	0.095	-1.677
D5	Óvulos Inseminados	9.93 ±4.38	11.16 ±5.11	0.069	-1.827
D5	Fertilización	3.69 ±3.16	4.88 ±4.5	0.041	-2.055
D5	ICSI	2.47 ±2.56	3.6 ±3.46	0.012	-2.534
D3	Folículo	7.95 ±4.14	7.41 ±4.56	0.246	1.163
D3	Óvulos Aspirados	7.15 ±4.09	6.7 ±4.49	0.337	0.961
D3	Óvulos Inseminados	2 ±2.77	2.3 ±3.09	0.34	-0.956
D3	Fertilización	1.09 ±1.72	1.46 ±1.94	0.065	-1.854
D3	ICSI	3.86 ±3.04	3.27 ±2.88	0.065	1.852
		Pos	Neg		
PIE	Folículo	8.33 ±4.59	10.22 ±5.24	<0.001	-4.708
PIE	Óvulos Aspirados	7.99 ±4.78	9.78 ±5.22	<0.001	-4.359
PIE	Óvulos Inseminados	2.83 ±3.49	3.95 ±4.13	<0.001	-3.608
PIE	Fertilización	1.89 ±2.55	2.72 ±3.06	<0.001	-3.664
PIE	ICSI	3.89 ±3.31	4.28 ±3.6	0.165	-1.39

Con respecto a la edad de las pacientes, en las comparaciones no hay una diferencia los Grupos 1.1, con 2.2, ni valor al comparar el grupo 1.2 con el 2.1 (tabla 1). Al realizar la comparativa con respecto a un resultado positivo, si se muestra una diferencia, mostrando que los grupos a los que no se les realizó el proceso de Eclosión Asistida, tuvieron una edad de 33.77 ±4.55 años.

Transferencia				Asisted Hatching	NoAH	p. val	t - test
				Media, DE	Media, DE		
D5	Edad	Años		10.61 (±1.78)	9.93 (±2.37)	-1.693	0.091
D3	Edad	Años		35.65 ±4.57	35.51 ±4.43	0.772	0.29
				Pos	Neg		
PIE	Edad	Años		33.77 ±4.55	35.7 ±4.48	<0.001	5.19

Al hacer el análisis relacionado con la búsqueda del patrón de aquellas pacientes con resultado de embarazo positivo, se encuentran datos con alta relevancia, ya que observamos que con respecto a la edad, el tener menos de 37 años de edad, aumenta la posibilidad de una prueba positiva, que la transferencia se realice después del día 4 de desarrollo embrionario (transferencia en blastocisto) y lograr que las pacientes desarrollen más de 12 folículos durante su protocolo de estimulación, aumentará de forma significativa la posibilidad de lograr el embarazo. Según el análisis de Clasificación tipo Arbol de decisión (χ^2 AID) teniendo como meta la prueba sérica de embarazo positiva, la variable de realizar o no la EA durante el manejo de los embriones, no representa ninguna significancia estadística, observando preferencia por otras características en la muestra, lo que nos confirma que la posibilidad de lograr un embarazo positivo va más relacionada con el día de realización de la transferencia, que con la realización de la Eclosión Asistida.



Al realizar el análisis de eventos entre los PIEs positivos de las pacientes, se determinaron la relación de proporción de evento, de modo que observamos los índices de presentación de éxito. Para el grupo el grupo de D3TD5 encontramos una incidencia de éxito de 1: 0.91 (IC 0.67 - 1.03), sin embargo, el mejor perfil de éxito es el de No EA y transferir en día 5 1: 1.01 (IC 0.65 - 0.87), siguiendo lo encontrado en el árbol de decisión encontramos para las pacientes mayores a 37 años y EA en día 3 con transferencia en el día 5 como el mejor perfil de éxito con 1: 1.65 (IC 0.51 - 1.3) con un PP de 60.78%.

Grupo	PIE Positivo				
	N, %	LK	PP %	PN %	
D3TD5	33 (14.54%)	0.91 (IC 0.67 -1.03)	14.54	90.49	
D3TD3	44 (19.38%)	1.51 (IC 1 - 1.28)	19.38	74.15	
NoAHTD3	51 (22.47%)	2.05 (IC 1.15 -1.43)	22.47	61.95	
NoAHTD5	99 (43.61%)	1.01 (IC 0.65 -0.87)	43.61	73.41	
>37 años	81 (35.68%)	3 (IC 1.18 - 1.5)	35.68	44.15	
>37 años D3TD5	31 (60.78%)	1.65 (IC 0.51 - 1.3)	60.78	48.72	
>37 años D3TD3	15 (34.09%)	3.44 (IC 1.1 - 1.71)	34.09	39.62	
>37 años NoAHTD3	21 (41.18%)	2.84 (IC 1.01 - 1.4)	41.18	41.67	
>37 años NoAHTD5	32 (32.32%)	2.74 (IC 1.08 -1.79)	32.32	50.46	

10.1 TABLAS

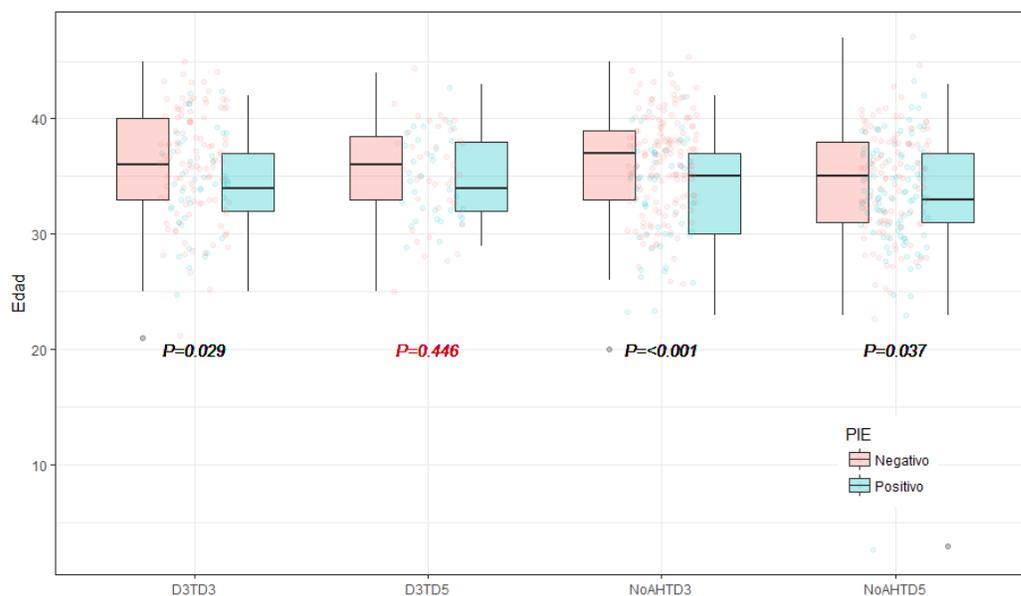


Figura 1. BOXPLOT. Se observa como el grupo D3TD5 en relación a edad no es factor para PIE en comparación con el resto de los grupos.

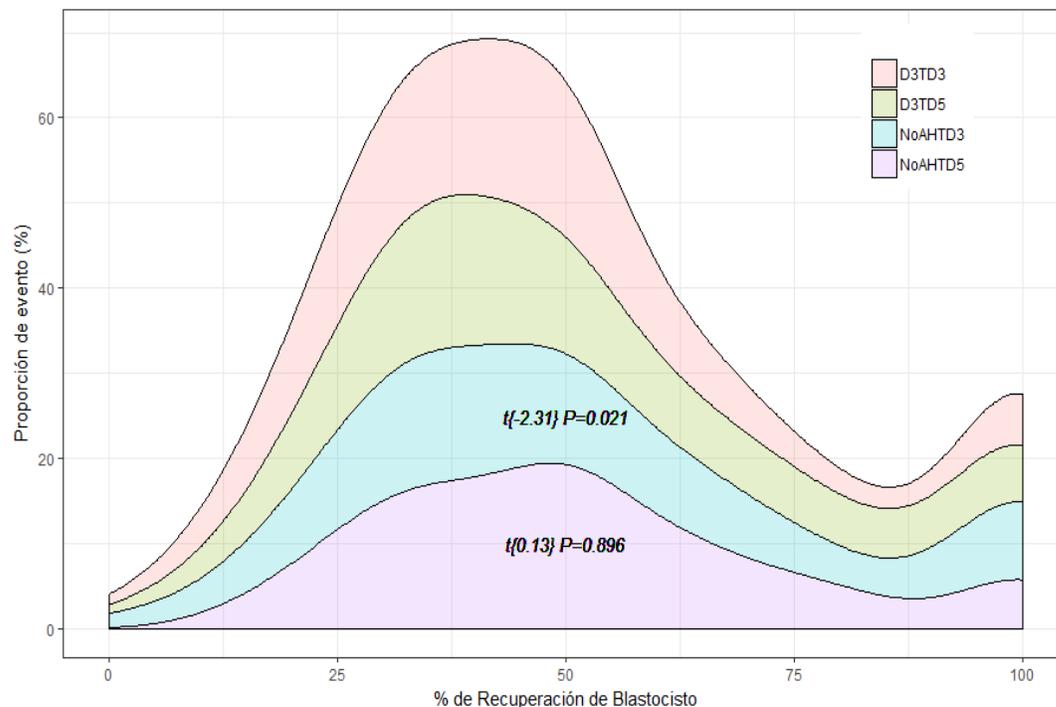


Figura 2. Densidad de Eventos. Se observa como la proporción de recuperación de Blastocisto es mas consistente en el grupo de No EA con transferencia en el dia 3.

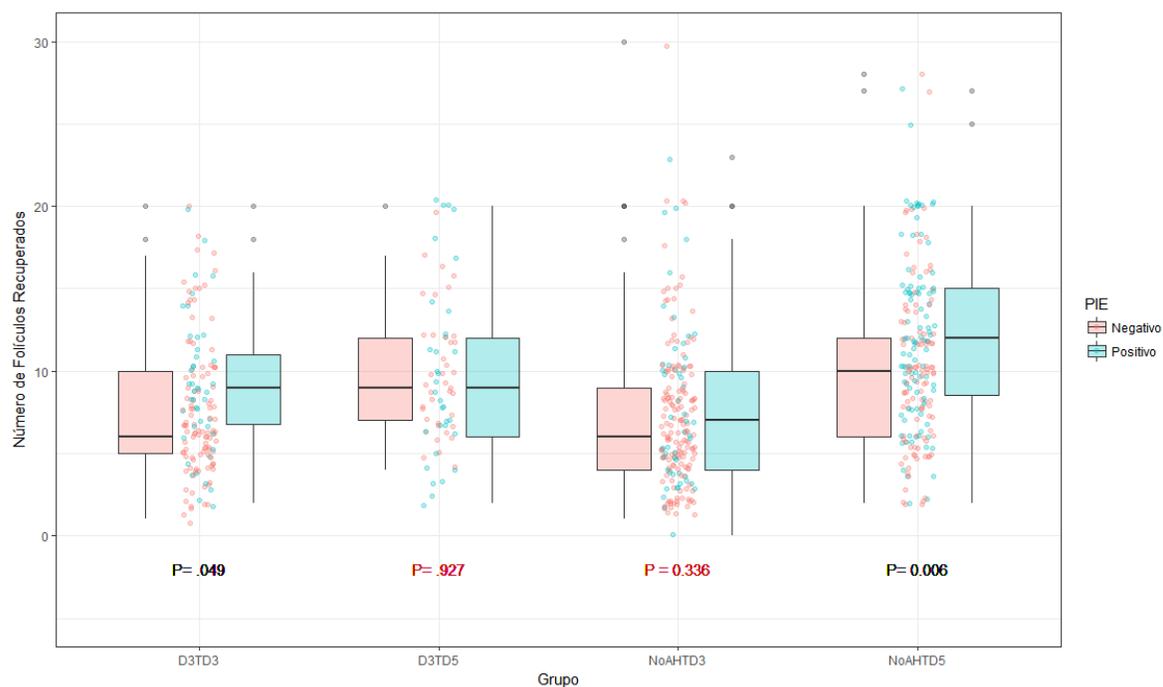
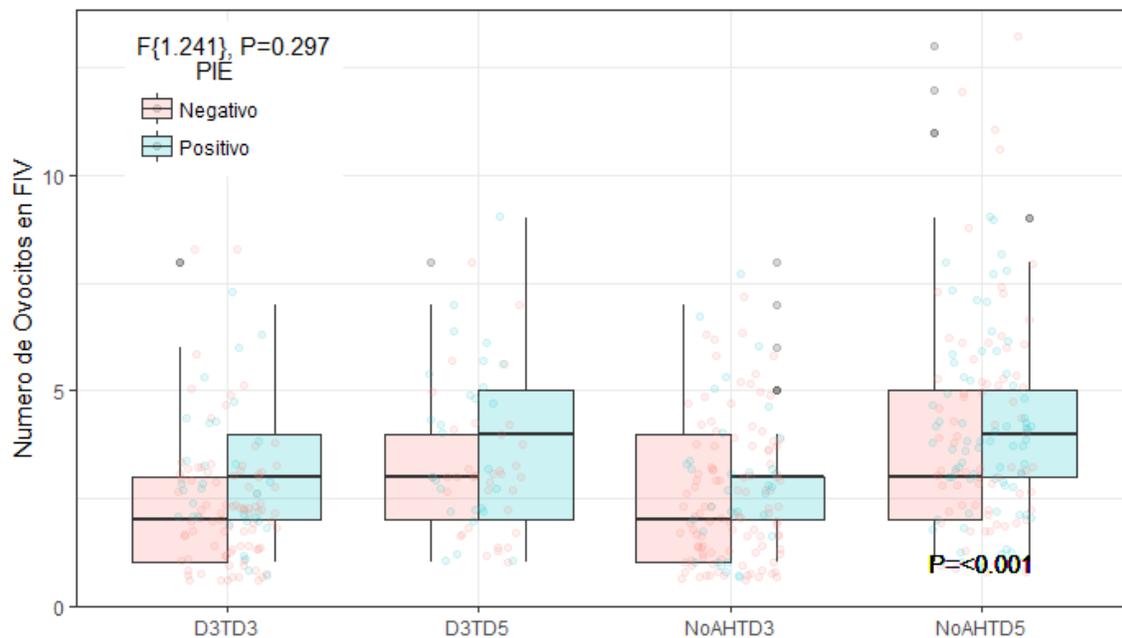
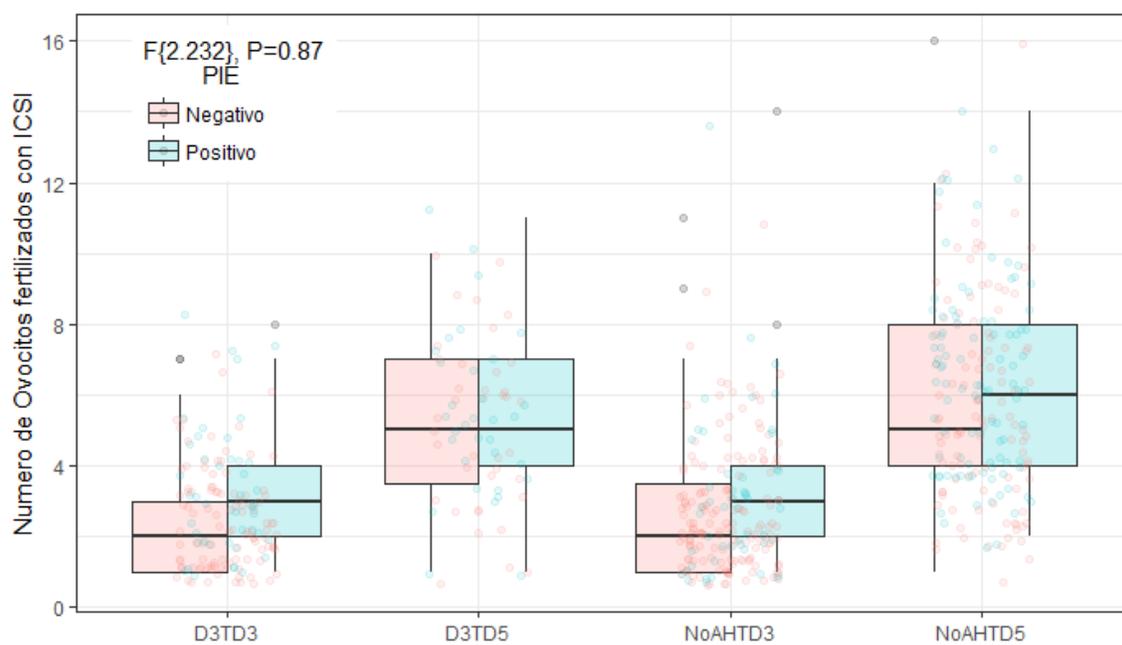


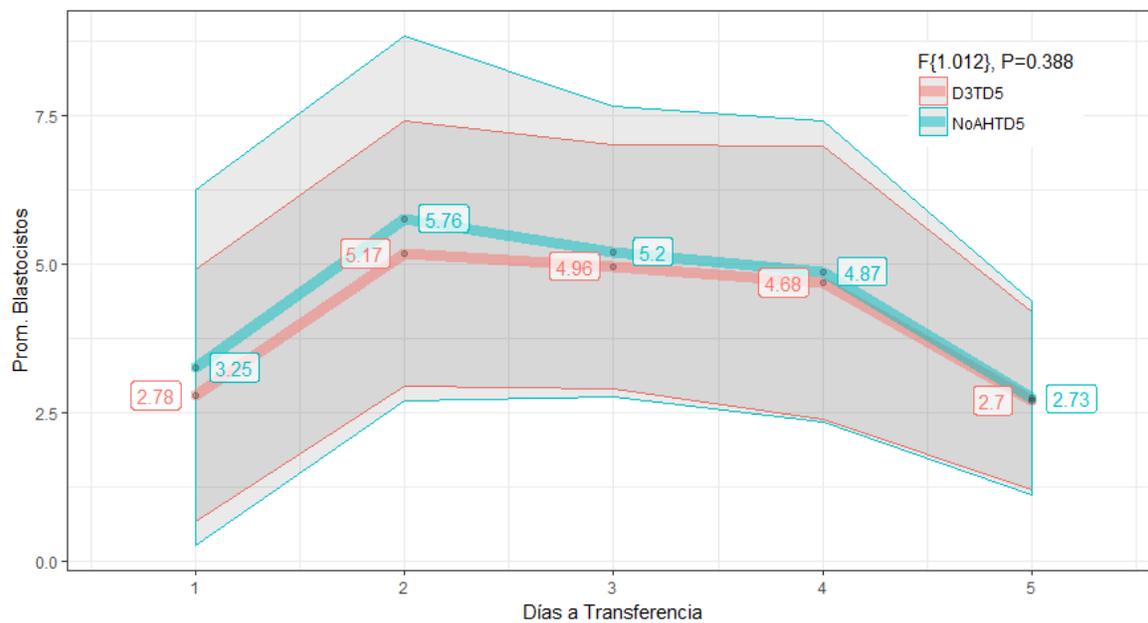
Figura 3. BOXPLOT. Se observa en relación a PIE positivo y numero de foliculos aspirados es similar en los grupos con transferencia en EA asistida en dia 5, y el grupo de transferencia en dia 3



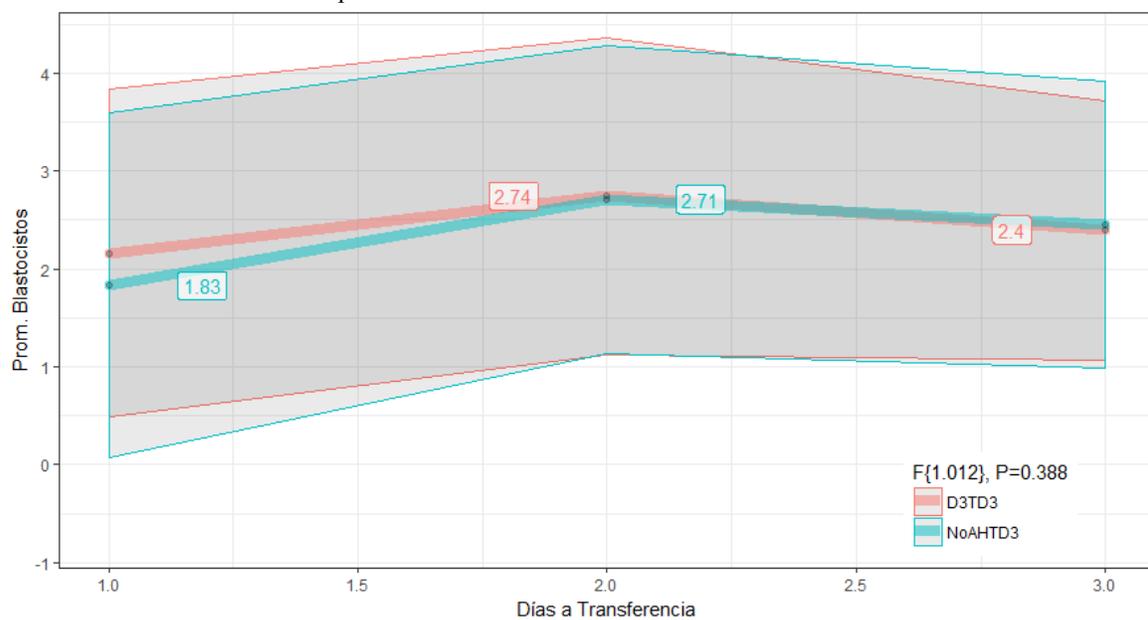
Existieron diferencias leves en los grupos en relación a FIV, siendo el grupo de NoAHTD5 el de mayor discrepancia con respecto a los demás.



La selección de técnica fue homogénea al considerar incidencias de PIE positivo en todos los grupos.



Nosotros no observamos pérdida de viabilidad embrionaria por el procedimiento de eclosión asistida y transferencia en el día 5 en comparación de los controles



Nosotros no observamos pérdida de viabilidad embrionaria por el procedimiento de eclosión asistida y transferencia en el día 3 en comparación de los controles

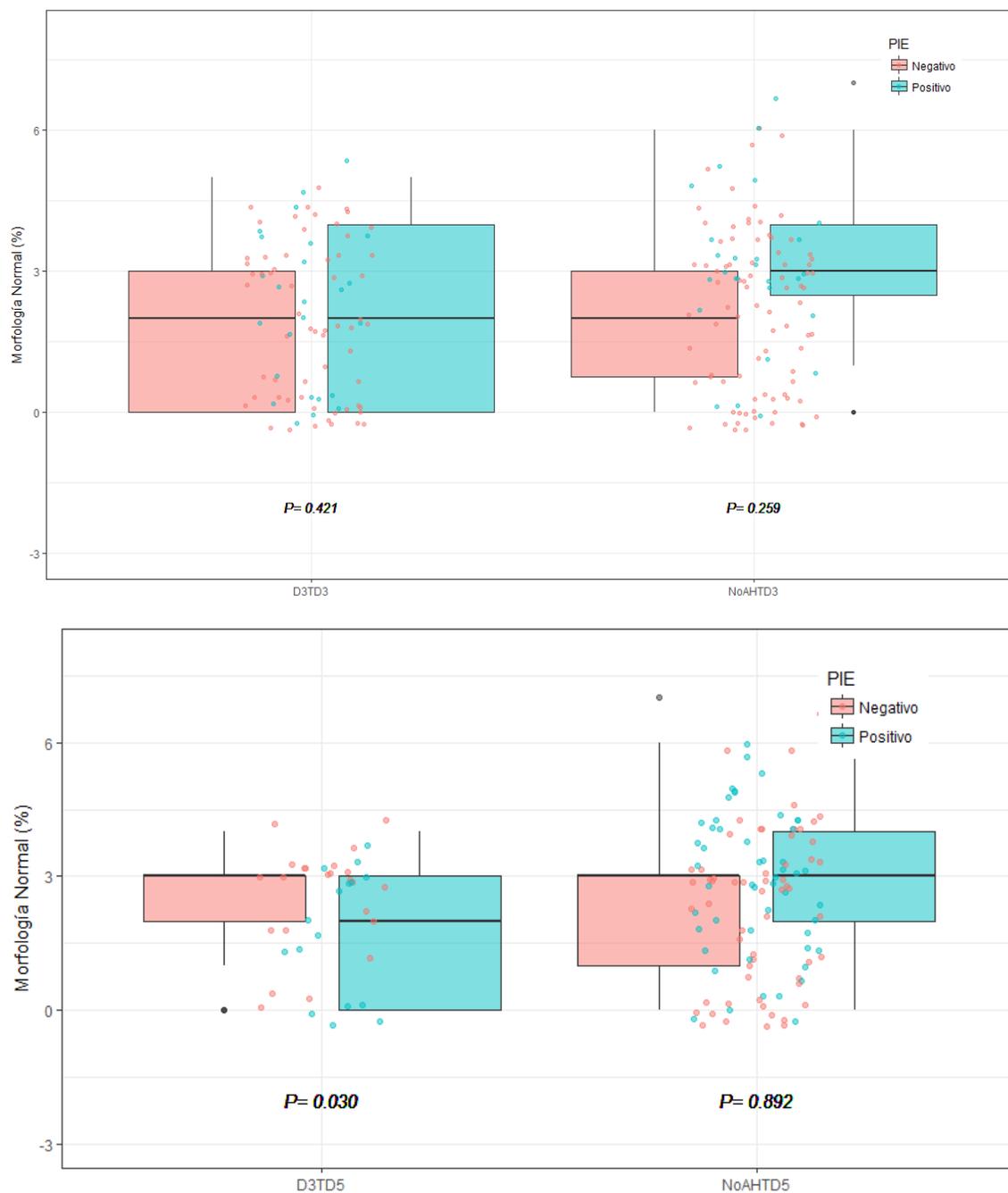


Figura BOXPLOT: En cuanto a la Morfología Espermática se refiere, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos analizados, por lo cual se deduce que no interviene la morfología espermática como factor que altere la posibilidad de éxito o fracaso de los procedimientos.

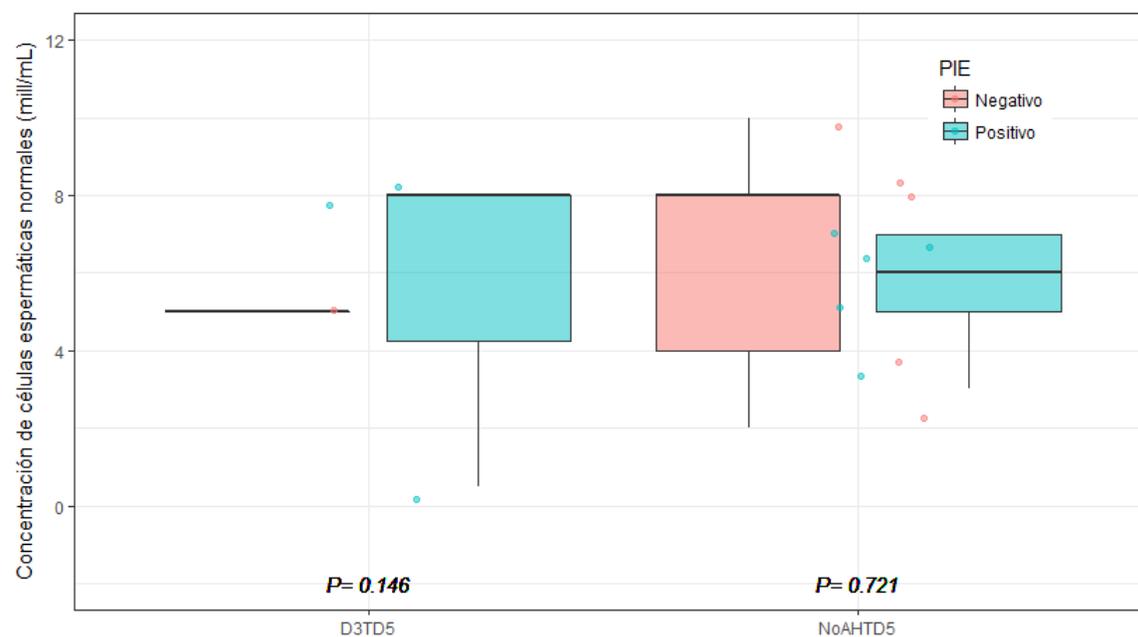
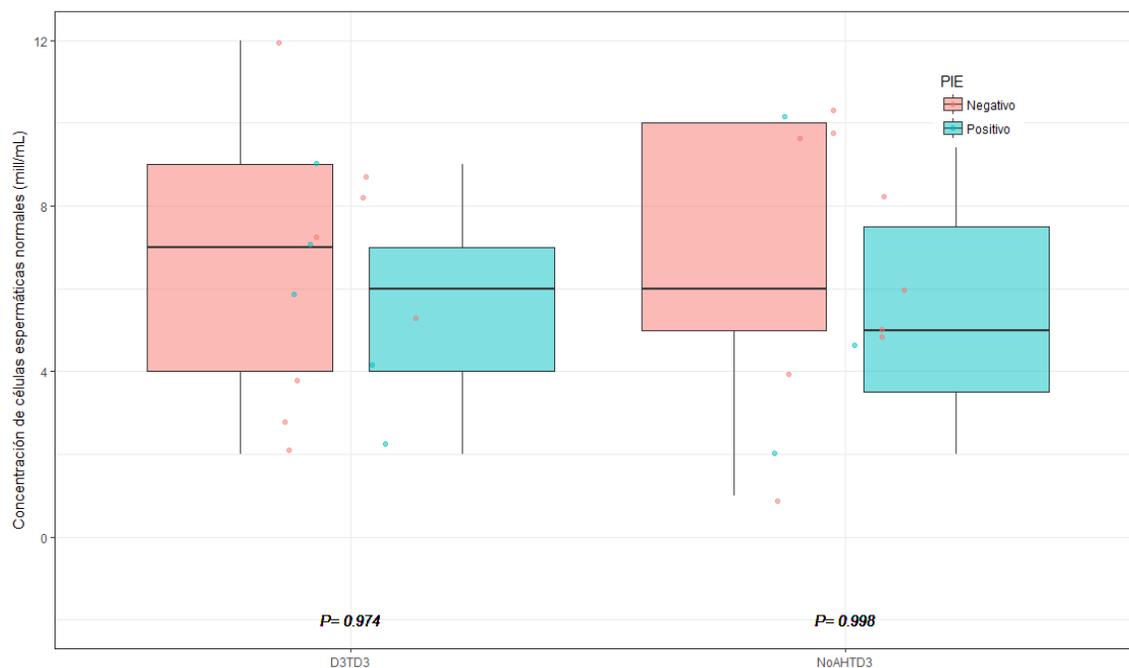


Figura BOXPLOT: En la concentración espermática, no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados, por lo cual la concentración espermática no es un factor que altere el éxito o fracaso del proceso.

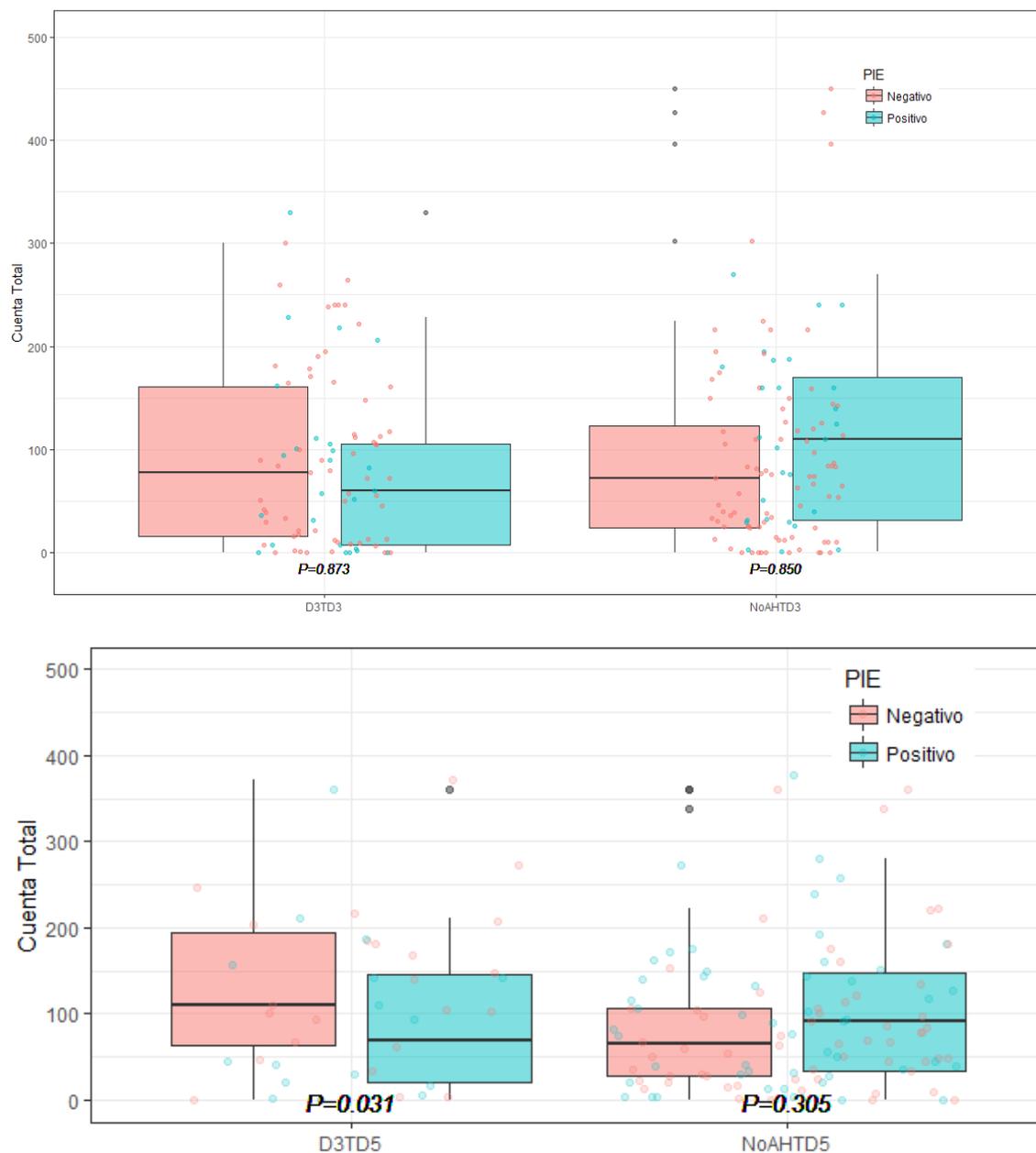


Figura BOXPLOT: En el análisis referente a la Cuenta Total Motil (CTM). Al analizar las muestras espermáticas, no se observa ninguna diferencia entre los grupos, por lo cual no es un factor influyente en el éxito o fracaso del tratamiento.

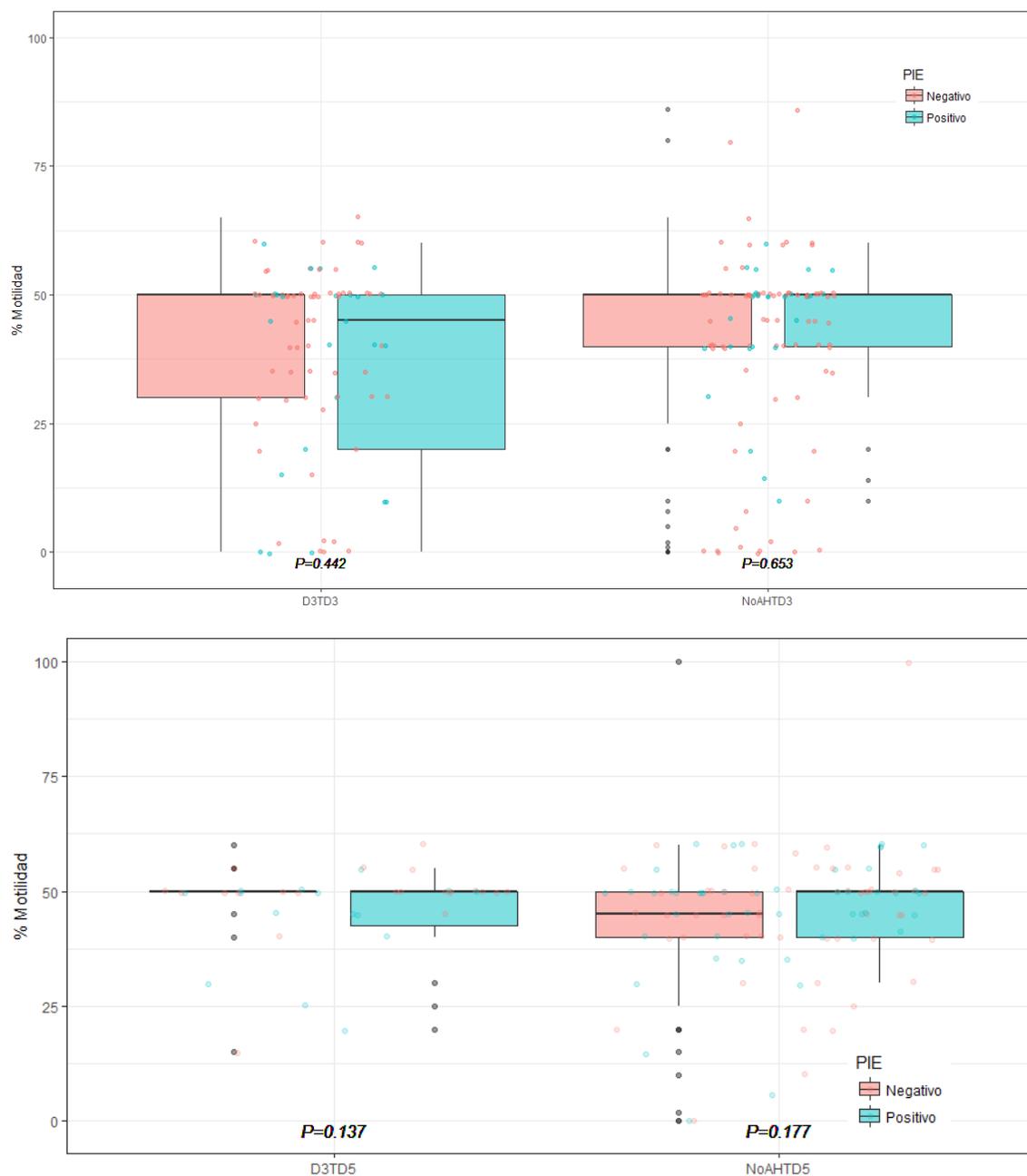
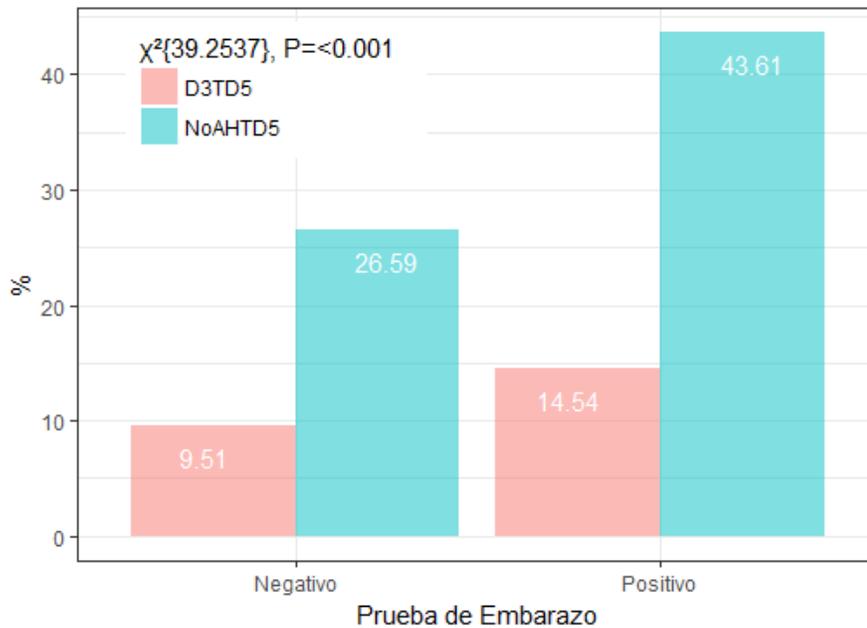


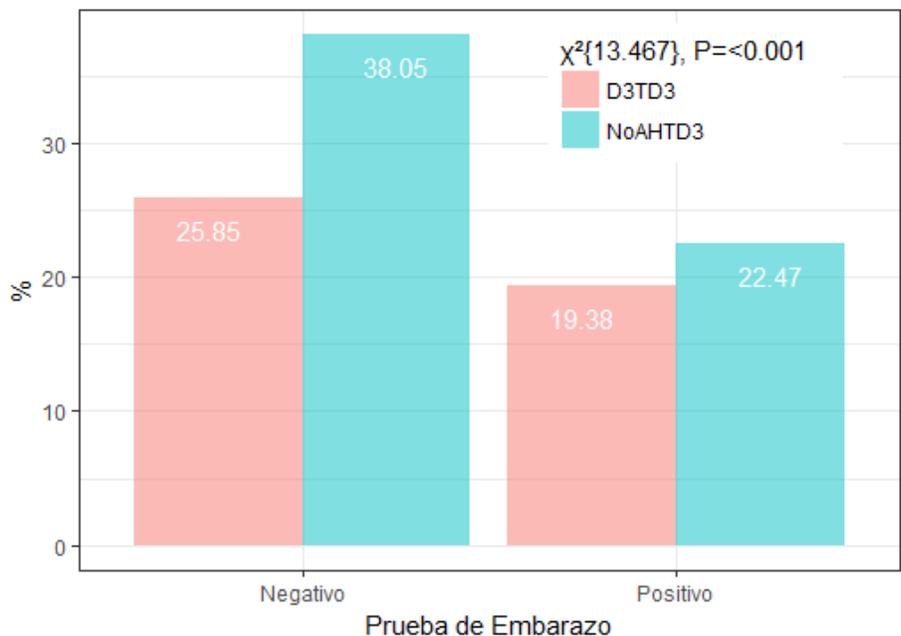
Figura BOXPLOT: Al realizar el análisis del % Motilidad espermática., no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, por lo cual se descarta la el % de Motilidad espermática como factor que altere el resultado de éxito en este estudio.

En todas las comparaciones realizadas mediante BOXPLOT de los grupos utilizando indicadores de la Espermato-bioscopía Directa con la cual se realizó el procedimiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Este hallazgo es de gran trascendencia clínica, ya que nos

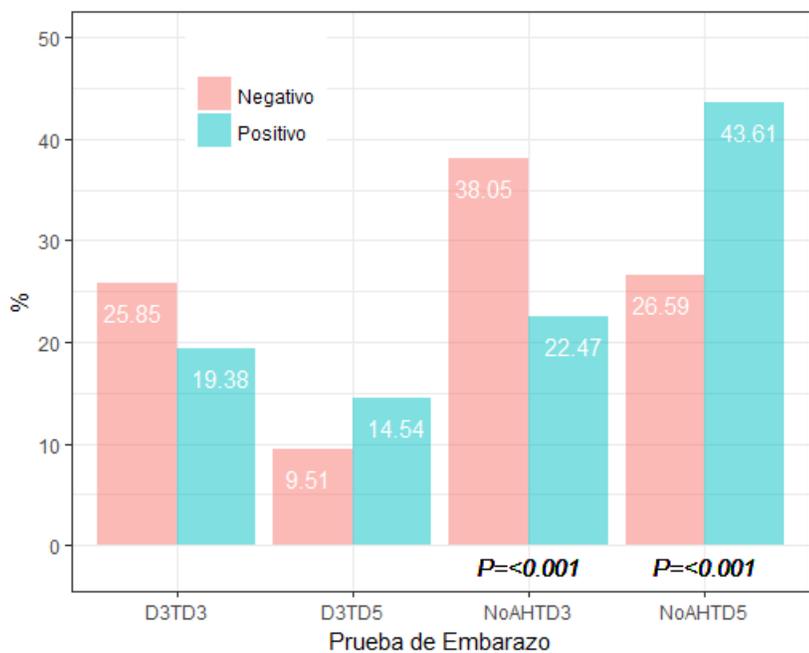
demuestra, que el trabajo realizado por el departamento de Andrología de nuestro Centro de Fertilidad, esta realizando de manera correcta su labor, al punto que la muestra espermática se elimine como factor que pueda influir en el resultado de éxito o fracaso en los grupos analizados en este estudio.



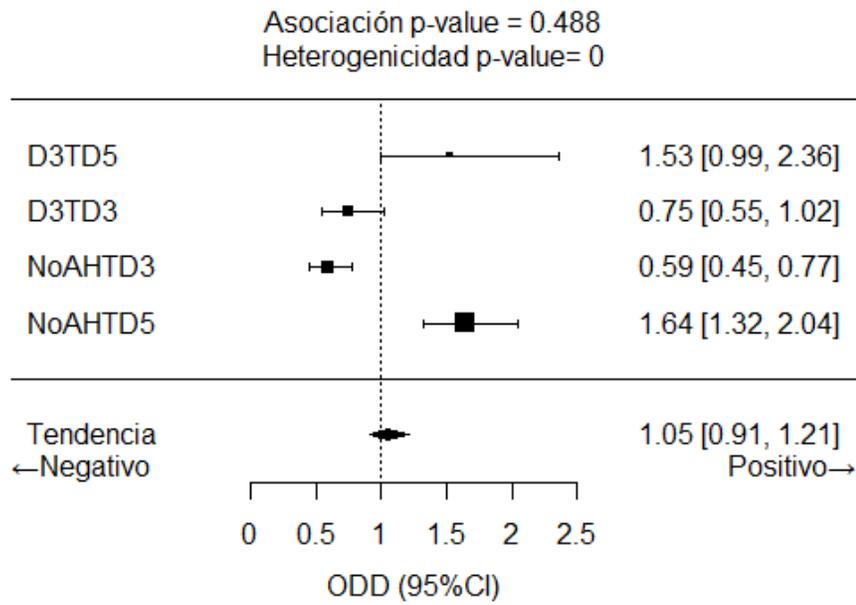
Se observa la Tabla de los resultados con respecto a los balances en relación al éxito en la Prueba de Embarazo en los Grupos con transferencia en etapa de Blastocisto, con EA en día 3 y sin EA, utilizando la X^2 , se observa una franca diferencia a favor aquellos grupos a los que No se les realizó el Proceso de Eclosión Asistida.



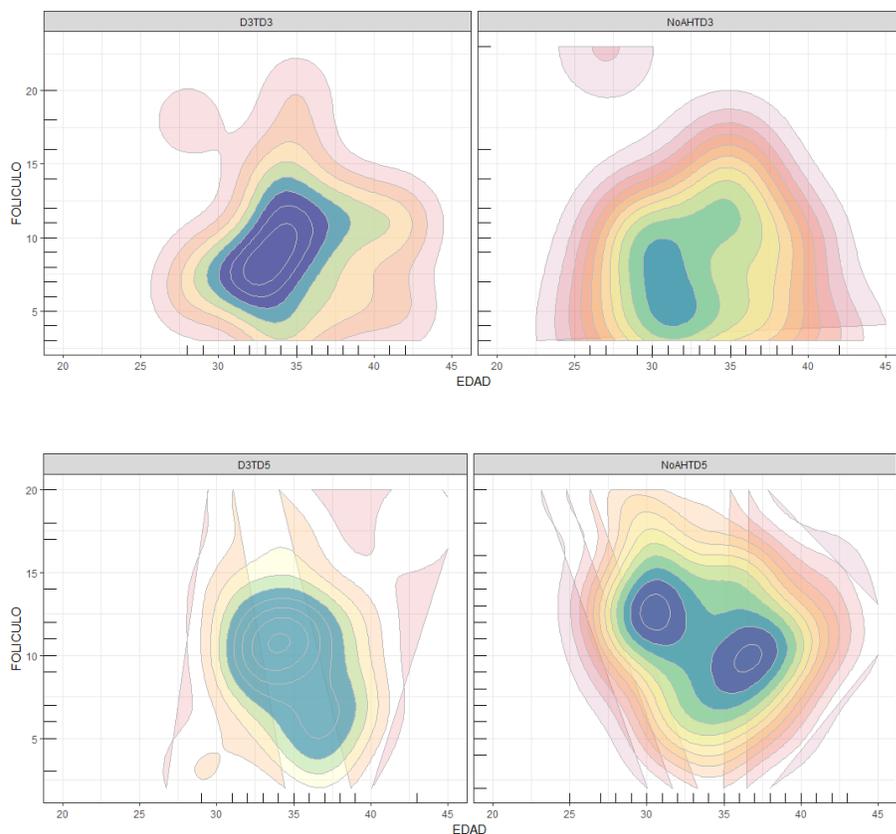
Se observa la Tabla de los resultados con respecto a los balances en relación al éxito en la Prueba de Embarazo en los Grupos con transferencia en día 3 de evolución del embrión, con EA en día 3 y sin EA, utilizando la X^2 , se observa una franca diferencia a favor aquellos grupos a los que No se les realizó el Proceso de Eclosión Asistida.



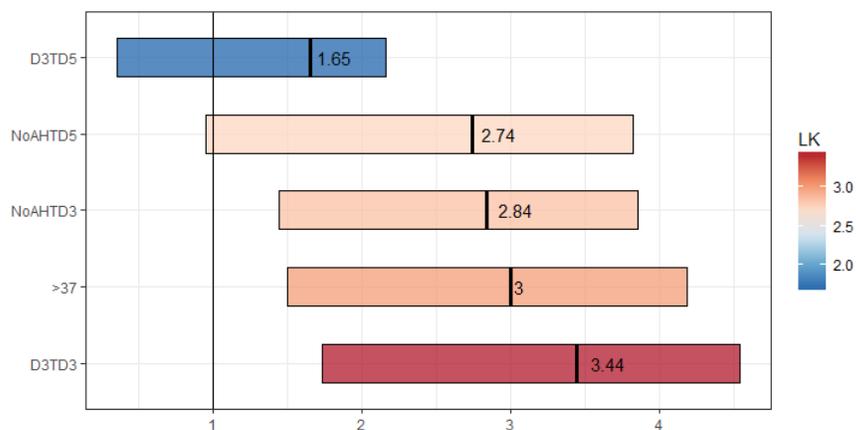
Se observa la Tabla de los resultados con respecto a los balances en relación al éxito en la Prueba de Embarazo en los grupos generales, observando mayor éxito, en pacientes a las que la transferencia embrionaria se les realiza en etapa de blastocisto, y al observar al grupo de transferencia en etapa de blastocisto, se obtiene mayor porcentaje de éxito a los que no se les realizó Eclosión Asistida.



Al evaluar la tendencia de eventos en la muestra en cuanto a los procesos realizados a los embriones, y la probabilidad de tener embarazo, se observa en el ForestPlot que transferir en el día 5 tiene mejor perfil que las transferencias en el día 3, y la eclosión asistida en el día 3 otorga un beneficio leve



Exploración de densidad de evento y relación de folículos en la paciente y edad, modelado que se realiza por la sugerencia del árbol de decisiones, para el caso de este gráfico se marcan la distribución de eventos para PIE positivo. Se observa como en el caso de D3TD3 el área de mayor efectividad es si la paciente produce 10 folículos y ella tiene entre 31 y 34 años, para NoAHTD3 patron de éxito involucra una paciente más joven. En el caso de D3TD5 se observa una inflexión de la zona mayor éxito (azul) por encima de los 35 años y baja respuesta folicular, de modo que eclosión asistida pudiera beneficiar a las pacientes mayores de 35, y baja respuesta folicular. Para NoAHTD5 se observa áreas de buen éxito, pero dependientes de producción folicular de la paciente.



Forest Plot del Likelihood para tener PIE positivo en pacientes mayores de 37 años. Se observa como la mejor técnica D3TD5, seguido de NoAHTD5. De forma aislada se observa la muestra dividida en mayores de 37 años (<37).

11.0 DISCUSION

La Eclosión Asistida es un tema controversial, ya que existen resultados contradictorios acerca de sus resultados en las tasas de implantación y embarazo. Algunos autores apoyan sus ventajas relacionadas con pacientes con pobre pronóstico reproductivo como la edad avanzada y con falla repetida de la implantación.³⁰ En nuestro centro de fertilidad no existió diferencia de edad entre los grupos de estudio. Siendo por lo tanto un parametro no indispensable para considerar realizar la EA.

En términos generales, el realizar el proceso de Eclosión Asistida en día 3 con transferencia en día 5, comparándolo con el grupo control, parece tener un efecto deletereo en el éxito de la tasa de embarazo, a menos que la paciente presente una edad > 37 años, en este caso, el efecto de la Eclosión Asistida hace que las tasas de embarazo se comporten de manera similar con las que no se les realiza Eclosión Asistida y se transfiere en etapa de blastocisto, eliminando en este grupo de pacientes la edad como un factor de mal pronóstico.

Analizando el efecto que puede ejercer el Laser sobre los embriones al realizar el proceso de Eclosión Asistida descritos en la literatura como daño a las blastómeras o al ADN, otros artículos refieren que el uso del láser es seguro en cuanto al daño térmico que puede ejercer a blastómeras.³¹ En nuestro centro observamos que el procedimiento no altera la recuperación a blastocisto, ni tampoco una disminución del desarrollo de embriones a estadio de clivaje.

En cuanto a la espermatobioscopía directa utilizada para realizar el proceso de In Vitro de las pacientes, de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio, no representa factor pronóstico en los resultados de embarazo ya que no hubo diferencia entre los dos grupos en cuanto a calidad espermática.

La creación de técnicas de ICSI para el tratamiento del factor masculino severo mejora de manera considerable las tasas de éxito independientemente de sus parámetros seminales.³² Con esto podemos deducir que los procesos realizados por el departamento de Andrología, hacen que el factor masculino no sea un factor pronóstico para el resultado de éxito o fracaso en la tasa de embarazo.

Las pacientes con pobre pronóstico reproductivo, como las mencionadas en la literatura como son Edad > 35 años, antecedente de fallas en la implantación por dos o más ocasiones, fragmentación excesiva, elevados niveles de FSH basal o zona pelúcida engrosada³³, se benefician con el proceso de eclosión asistida con láser, pues encontramos tasas de embarazo equiparables con aquellas pacientes que no se les realiza el proceso de Eclosión Asistida y se transfiere en etapa de blastocisto.

En el grupo de pacientes que no tiene indicación para realizar Eclosión Asistida, los resultados no muestran ofrecer un beneficio, por lo cual no nos da evidencia suficiente, para recomendar la eclosión asistida de manera rutinaria a todas las pacientes a quienes se efectúan técnicas de reproducción asistida, contrario a lo indicado en otras publicaciones que apoyan esta el realizar esta técnica de forma rutinaria en las pacientes en tratamientos de in vitro.³⁴

Todos los programas de reproducción deben de evaluar a sus pacientes de manera individual y utilizar esta técnica de acorde a la experiencia que se tiene con el procedimiento, ya que es operador dependiente. No está justificado realizar el procedimiento de eclosión asistida a todas las pacientes, y nuestros resultados apoyan lo anteriormente descrito por la literatura, hay que seleccionar a la paciente ideal para este procedimiento.

12.0 CONCLUSIÓN

Las características demográficas de la población fueron similares en todos los grupos, sin embargo, la cantidad de óvulos obtenidos fueron mayores en los grupos de no eclosión asistida. Por su parte, el factor masculino no fue diferente entre los grupos, ni al comparar su relación en cuanto a prueba positiva de embarazo. En relación a la prueba de embarazo positivo, se observa a la transferencia en día 5 como la que genera mejores resultados, y no realizar eclosión asistida mejora el perfil, sin embargo, es importante recalcar que posterior al modelado y compensación por la discrepancia de muestra entre los grupos, reluce en los modelos el beneficio de Eclosión Asistida en el día 3 y transferencia en el día 5 si la paciente tiene más 37 años, este beneficio permanece aunque la paciente experimente una baja respuesta folicular. Los resultados explorados son compatibles con los descritos en la literatura, lo cual nos describe que el proceso de tratamiento de fertilidad asistida en la clínica mantiene estándares de calidad altos, adecuados y teniendo solo como factor determinante las características clínicas la paciente.

13.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.- *A randomized, prospective study comparing laser-assisted hatching and assisted hatching using acidified médium.* Susan Lanzendorf Ph.D et. al *Fertility and Sterility*. Vol. 87, No 6. June 2007.
- 2.- *Handbook of In vitro Fertilization. Second Ed. Chapter Twelve. Micromanipulation as a clinical tool.* Alan Trounson and David Gardner.
- 3.- *Assisted hatching: trends and pregnancy outcomes, United States, 2000-2010.* Dimitry M. Kissin MD et. al. *Fertility and Sterility* Vol. 102. No 3 September 2014.
- 4.- *Eclósión asistida: para mejorar la implantación del embrión.* Hernández-Nieto, C. A., Soto-Cossío, L. E., & Basurto-Díaz, D. (2015). *Revisión de la bibliografía. Ginecología y Obstetricia de México*, 83(04), 232-239.
- 5.- *Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment.* Ricardo Loret de Mola, J., Garside, W. T., Bucci, J., Tureck, R. W., & Heyner, S. (1997). *Journal of assisted reproduction and genetics*, 14(6), 332-336.
- 6.- *Análisis de la composición, estructura y función de las glicoproteínas de la zona pelúcida con especial referencia a la especie humana. Proyecto de investigación;* JIMÉNEZ MOVILLA, María 2012.
- 7.- *Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. Microscopy research and technique,* Familiari, G., Relucenti, M., Heyn, R., Micara, G., & Correr, S. (2006). 69(6), 415-426.
- 8.- *Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (Callithrix jacchus) ovary.* Bogner, K., Hinsch, K. D., Nayudu, P., Konrad, L., Cassara, C., & Hinsch, E. (2004). *Molecular Human Reproduction*, 10(7), 481-488.
- 9.- *Shen, Y., Stalf, T., Mehnert, C., Eichenlaub-Ritter, U., & Tinneberg, H. R. (2005). High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles.* *Human Reproduction*, 20(6), 1596-1606.
- 10.- *Autoantibodies to zona pellucida: a possible cause for infertility in women.* Science, Shivers, C. A., & Dunbar, B. S. (1977). 197(4308), 1082-1084.
- 11.- *Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos.* Pelletier, C., Keefe, D. L., & Trimarchi, J. R. (2004). *Fertility and sterility*, 81, 850-856.

12.- *A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- β type III receptor.* Bork, P., & Sander, C. (1992). *FEBS letters*, 300(3), 237-240.

13.- *Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity.* Zygote, Yanagimachi, R. (1994). 2(04), 371-372.

14.- *No adverse effects were identified on the perinatal outcomes after laser-assisted hatching treatment.* Hanying Zhou et. al. *Assisted Reproduction Center, Hospital of Shaanxi Province China. Reproductive BioMedicine Online* (2014) 29, Pp 692-698.

15.- *Implantation failures: success of assisted hatching with quarter laser zona thinning.* Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RL, Oliveira JB, et al *Reprod Biomed Online* 2005;10:224-9.

16.- *Evaluación de la técnica de eclosión asistida.* Juan Manuel Moreno y cols. *Revista Internacional de Andrología* 2008, 6(1).

17.- *Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains.* Antczak M, Van Blerkom J. *Hum Reprod* 1999;14:429-47.

18.- *A comparison of four different techniques of assisted hatching.* Human Reproduction, Balaban, B., Urman, B., Alatas, C., Mercan, R., Mumcu, A., & Isiklar, A. (2002). 17(5), 1239-1243.

19.- *Assisted Hatching.* Jacqueline Selva. *Human Reproduction. Vol 15, (Suppl. 4), pp 65-67, 2000.*

20.- *Mechanically expanding the zona pellucida of human frozen thawed embryos: a new method of assisted hatching.* Cong Fang PhD. Et. al *Fertility and Sterility. Vol. 94, No.4. September 2010.*

21.- *A randomized, prospective study comparing laser-assisted hatching and assisted hatching using acidified médium.* Susan E. Lanzendorf Ph.D et. al. *Fertility and Sterility. Vol. 87, No. 6, June 2007.*

22.- *Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo micromanipulator for morphologically low-quality embryos in por-prognosis infertile patients.* Takahiro Nakayama M.D. *Fertility and Sterility. Vol. 71, No 6 June 1999.*

23.- *A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator.* Tahakiro Nakayama. *Fertility and Sterility. Vol. 69, No 4. April 1998.*

24.- *A comparison of different power levels used by laser systems in IVF laboratory.* Research Instruments Saturn 5TM Laser Systems. June 2012.

- 25.- *Comparison of laser-assisted hatching and acidified Tyrode's hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomized trial.* Amy E. Jones et. al *Fertility and Sterility*. Vol. 85 No 2 Feb 2006
- 26.- *Comparison of laser-assisted hatching and acidified Tyrodes hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomized trial.* Amy E. Jones M.S et al. *Fertility and Sterility*.
- 27.- *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and cinical management.* 3th ed. Yen SS, Jaffe RB, Strauss JF, Barbieri RL. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012.
- 28.- *Handbook of In vitro Fertilization. Second Ed. Chapter Twelve. Micromanipulation as a clinical tool.* Alan Trounson and David Gardner.
- 29.- *Risk of major congenital anomalies after assisted hatching: analysis of three-year data from the national assisted reproduction registry in Japan.* Junna Jwa MD, et. al. *Fertility and Sterility*. Vol. 104, No. 1, July 2915.
- 30.- *Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos inpatients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization.* Stein A, Rufas O, Amit S, Avrech O, Pinkas H, Ovadia J, et al. *Fertil Steril* 1995;63:838-841.
- 31.- *Impacto de la eclosión asistida con láser (técnica en cuartos) en pacientes con pobre pronóstico reproductivo.* Dra. González Ortega Claudia et. al. *Ginecol Obstet Mex* 2015; 83:670-679.
- 32.-Palermo, G. D., Cohen, J., Alikani, M., Adler, A., & Rosenwaks, Z. (1995). *Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility.* *Fertility and sterility*, 63(6), 1231-1240.
- 33.- *A European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations.* Primi, M. P., Senn, A., Montag, M., Van der Ven, H., Mandelbaum, J., Veiga, A., ... & Germond, M. (2004). *Human Reproduction*, 19(10), 2325-2333.
- 34.- *Routine laser assisted hatching results in significantly increased clinical pregnancies.* *Journal of assisted reproduction and genetics*, Ali, J., Rahbar, S., Burjaq, H., Sultan, A. M., Al Flamerzi, M., & Shahata, M. A. M. (2003). 20(5), 177-181.

