

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
Instituto para el Estudio de la Concepción Humana



**“ Tiempo óptimo de ICSI en relación a la aplicación
de HGC e incubación ovocitaria en los resultados
de Reproducción Asistida ”**

Tesis

**Que para obtener el título en la Subespecialidad en Biología de la
Reproducción Humana**

Presenta:

Dr. José Iram Obeso Montoya

Asesor:

Dr. Julio Cesar Rosales De León



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.

INDICE

	Página
1. Índice	1
2. Resumen	2
3. Justificación	3
4. Marco Teórico	6
5. Planteamiento del Problema	13
6. Hipótesis	16
7. Objetivo General	17
8. Objetivos Específicos	17
9. Objetivos Secundarios	17
10. Material y métodos	18
- Población y Muestra	25
- Criterios de Inclusión	26
- Criterios de Exclusión	26
- Criterios de Eliminación	27
- Instrumentos y Procedimientos	28
11. Resultados	29
12. Discusión	39
13. Conclusiones	42
14. Bibliografía	44

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar el impacto del intervalo de tiempo entre la aplicación de la hGC y la realización de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide en un programa de reproducción asistida en el Centro de Fertilidad IECH.

MATERIALES Y METODOS: Estudio observacional comparativo, ambispectivo. Se analizaron 106 ciclos de estimulación que ingresaron para ICSI de Septiembre 2008 a Diciembre 2009, en los cuales el intervalo de tiempo entre la aplicación de hGC y aspiración folicular fue de 33hrs, se agruparon en 2 grupos, Grupo I: 35 - 37 hrs de la aplicación de hGC e ICSI ó 2 – 4 hrs de incubación ovocitaria, Grupo II: 38 – 40 hrs de hGC ó 5 - 7 hrs de incubación ovocitaria.

RESULTADOS: El promedio de edad de las pacientes fue de 35.5 ± 4.4 años, sin diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. Se aspiraron 921 óvulos, obteniendo un 73% de madurez ovocitaria. Se realizó inyección intracitoplasmática a 173 óvulos (52%) y a 162 (68%) en el grupo I y II respectivamente ($p < 0.90$). Sin diferencia significativa en la tasa de fertilización, embarazo, implantación y aborto entre los grupos. Se encontró una tasa más alta de embarazo e implantación en el grupo II donde el ICSI se realizó entre 38 a 40 hrs después de la aplicación de hGC con menor tasa de aborto en ese mismo grupo ($p < 0.29$).

CONCLUSIONES: Se obtuvieron un buen porcentaje de óvulos maduros (MII) en el intervalo de tiempo de 33hrs posterior a la aplicación de hGC. En el Centro de Fertilidad IECH, el tiempo óptimo de ICSI en relación a la aplicación de hGC es entre 38 a 40 hrs ó incubación ovocitaria entre 5 a 7 hrs, obteniendo mayor número de embriones calidad A, mayor tasa de embarazo e implantación.

PALABRAS CLAVE: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, periodo de incubación ovocitaria, tasa de fertilización, implantación y embarazo.

JUSTIFICACION

Desde el nacimiento de Louise Brown en julio de 1978, la fertilización in vitro (FIV) ha demostrado ser un tratamiento eficaz para la infertilidad, especialmente en pacientes con alteración del factor tubario, en los años subsecuentes se empezó a utilizar con éxito en las parejas con infertilidad inexplicable, factor masculino y endometriosis. (1)

Posteriormente los resultados en FIV empezaron a disminuir principalmente cuando las características del semen se encontraban alteradas en concentración, morfología y motilidad resultando en óvulos con fertilización disminuida y embriones no disponibles para transferirse. A finales de 1980 se desarrollaron múltiples procedimientos de reproducción asistida aplicados en aquellas parejas en las que no respondían a fertilización convencional, en 1988 la técnica de ICSI (Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide) se empezó a utilizar en gametos humanos. En 1992 Palermo y cols en Bélgica publicaron el primer embarazo y nacimiento obtenido después de ICSI el cual cambio dramáticamente el manejo de la infertilidad masculina, donde un espermatozoide es microinyectado en el interior del ovulo después de sobrepasar la zona pelucida y la membrana del ovulo, los resultados iniciales demostraron que el ICSI presentó tasas de fertilización y de implantación mayores, con mayor número de embriones disponibles con características óptimas para transferencia.

El uso de ICSI en los estados unidos ha aumentado dramáticamente desde 1995, con un aumento proporcional en el diagnostico de la infertilidad del factor masculino, esto sugiere que el procedimiento se utiliza para otras indicaciones con resultados favorables.

El ICSI debe realizarse en cualquier momento entre las 35 a 45 horas posteriores a la administración de hGC, ya que la capacidad de desarrollo de los óvulos disminuye significativamente después de 55hrs de la aplicación de hCG, lo cual sugiere que la ventana optima de inseminación es al menos 10 horas. ⁽⁸⁾

Dentro de los reportes más recientes sobre el efecto del tiempo de inseminación/inyección han demostrado que la inyección del espermatozoides inmediatamente después de la aspiración (36hrs aproximadamente después de la administración de hCG) resulta en una baja tasa de implantación con una pre incubación de al menos 2 hrs. Sin embargo la cuestión practica más importante sobre la ventana optima de la inseminación / inyección, sigue sin respuesta. ^(8,13).

Actualmente existen diferentes opiniones respecto al tiempo de mantener en incubación a los óvulos aspirados antes del ICSI, reportándose discrepancia en los resultados reportados en múltiples revisiones.

Dada la importancia que actualmente está presentando el ICSI en nuestro medio, decidimos analizar una de las pocas variables que pueden ser controladas en cuestión de la ventana optima de inseminación / inyección espermática de acuerdo al tiempo de aplicación de hCG y los resultados obtenidos considerando que el momento de la inseminación ó inyección espermática es uno de los factores más importantes que determinan la fertilización, implantación y viabilidad embrionaria.

MARCO TEORICO

Antes del advenimiento de las técnicas de micromanipulación, el manejo del factor masculino con alteraciones en los parámetros seminales con baja o nula fertilización tenían pocas alternativas de tratamiento, con la introducción de la técnica de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) aumentaron considerablemente las tasas de fertilización.

La inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) ha permitido resolver problemas masculinos severos con excelentes resultados. Sin embargo, la difusión de su técnica llevó a la aplicación en casos donde no existe una indicación clara, desplazando muchas veces a la fertilización in vitro (FIV) sin suficientes argumentos.

(14,19)

La difusión y el dominio del ICSI y la idea de disminuir al máximo las fallas de fecundación por medio de la fertilización in vitro (FIV), muchos centros de fertilidad han optado por considerar a la ICSI como la técnica de elección, incluso cuando no existen indicaciones claras para su uso. Es importante considerar que, a pesar de una década desde la introducción de la técnica, todavía no existe información suficiente que respalde su utilización en forma indiscriminada. (14,15)

Varios grupos de investigación continúan estudiando los efectos y las alteraciones en ICSI, en relación con los mecanismos fisiológicos de fecundación humana y sus posibles implicaciones.

El proceso de fecundación en ICSI implica una serie de cambios en los mecanismos fisiológicos descritos in vivo e in vitro, que comienzan desde implicaciones técnicas hasta la abreviación de los pasos descritos en la interacción de gametos y su consecuencia en los eventos conducentes a la formación de pronúcleos.⁽¹⁶⁾

La selección del espermatozoide es arbitraria y al azar, se basa fundamentalmente en la observación del movimiento y morfología espermática y no en su competencia natural, el proceso de selección y captura del espermatozoide que será inyectado supone la exposición a estímulos físicos y químicos no fisiológicos, como el trauma sobre el flagelo para su inmovilización, la luz del microscopio y medios de cultivo especiales que frenan su movimiento.⁽¹⁶⁾

El ovocito antes de ser inyectado se somete a una manipulación enzimática y mecánica para ser desprovisto de las células del cúmulo e identificar su estado de madurez y la ubicación del primer cuerpo polar.

Sin embargo, en ocasiones la manipulación ovocitaria previa puede desplazar la ubicación original del cuerpo polar y alterar su relación con el huso, haciendo que esta precaución no sea suficiente para evitar esta eventualidad.

Una vez que se selecciona el espermatozoide en la pipeta de microinyección es colocado directamente en el interior del ovocito, atravesando en un solo paso las capas celulares e introduciendo el espermatozoide íntegro, con el acrosoma y su contenido intacto, esta maniobra de inyección sustituye los pasos descritos de interacción entre gametos, como reacción acrosómica, unión del espermatozoide a la zona pelúcida, penetración e interacción de membranas ovocitaria y espermática.⁽¹⁶⁾

La activación ovocitaria que se observa en ICSI, sugiere que ciertos componentes espermáticos pueden desencadenarla, aun en ausencia de interacciones de membrana. Sin embargo, existen diferencias en los eventos de activación cuando se comparan con los descritos en FIV. Una de ellas es el inicio de las oscilaciones de calcio, retrasado de 30 minutos a varias horas. Este hallazgo es consistente con la observación de otros eventos como la emisión del segundo cuerpo polar y formación pronuclear, variables entre óvulos que son inyectados en momentos similares.⁽¹⁴⁾

La mayoría de las publicaciones hacen referencia al ICSI como un procedimiento seguro, dicha afirmación es apoyada por las altas tasas de fecundación y embarazo y en la incidencia de malformaciones congénitas mayores y menores comparables a las obtenidas en FIV.

La principal indicación del ICSI es la infertilidad masculina severa, debido a un número limitado de espermatozoides o de una gran proporción de espermatozoides disfuncionales, actualmente se utiliza en múltiples centros de fertilidad con mayor número de indicaciones. (15)

Las principales indicaciones del ICSI son: < de 2 millones de espermatozoides móviles por eyaculación, anticuerpos antiespermatozoides, procedimientos previos sin fertilización o falla en fertilización convencional, espermatozoides congelados o limitados en el número o calidad, recuperación espermática por diferentes técnicas (PESA, TESE, etc) en obstrucción del aparato reproductor masculino no susceptible de reparación, morfología anormal > 95% y defectos específicos de los espermatozoides. (6,15,19)

En la mayoría de los programas de FIV / ICSI en ciclos de hiperestimulación ovárica los óvulos son aspirados 36 hrs después de la aplicación de hGC, ya que en un ciclo estimulado la ovulación se produce 37 hrs después del aumento de hGC. (Edwards and Steptoe 1975).

Considerando que el momento de activación de los óvulos después del ICSI está relativamente bien definido y se ha demostrado que inicia dentro de los 30 minutos siguientes a la inyección del esperma, dicha activación después de la fertilización convencional no se puede estimar con precisión, debido a la variación en las propiedades de la muestra de esperma, las células de la corona, zona pelúcida y otros factores asociados. (11,12)

J.Q. Huang y cols determinaron si la aspiración de óvulos ≤ 34 hrs ó ≥ 35 hrs después de la administración de hGC reportaba diferencias en los resultados de FIV, resultando con mayor porcentaje de óvulos inmaduros si se aspiraban antes de 34hrs, e interesantemente encontraron mayor tasa de implantación en ese mismo grupo, concluyendo que una recuperación temprana puede resultar en ovocitos de mejor calidad. ⁽¹⁸⁾

Existe un reporte donde los autores evaluaron el proceso de maduración de los ovocitos in vivo en el periodo que se extiende entre administración de hGC y la recuperación y en maduración in vitro donde se los ovocitos se incuban hasta el momento de la inseminación/inyección , donde analizaron 227 ciclos agrupados de acuerdo al tiempo de administración de hGC e ICSI, no encontraron diferencias entre los grupos de edad, FSH basal, protocolo de estimulación (agonista vs antagonista), niveles de estradiol, reportando que el tamaño de los folículos fue significativamente más grande en el grupo con > 43 hrs de incubación, no encontraron diferencias en tasa de fertilización y embarazo clínico entre los grupos de estudio, con menor fertilización en el grupo de > 43 hrs, sin reportarse ningún embarazo clínico en este grupo de incubación, concluyendo que los resultados de fertilización y embarazo no mostraron una correlación importante entre el tiempo de administración de hGC e ICSI.⁽¹⁷⁾

Dmitri D. y cols en Brasil realizaron un análisis de 651 ciclos de ICSI, donde demostraron que la capacidad de los óvulos humanos para el desarrollo de embriones viables aumentaba cuando se realizaba ICSI entre 37 a 39 horas después de la aplicación de hGC y concluyeron que la tasa de fertilización se incrementaba significativamente con el tiempo transcurrido después de la aplicación de hGC, con una tasa baja de fertilización si se realiza antes de 37 horas , la tasa de embarazo y embarazo clínico es mayor cuando se realiza entre 37 a 41 horas y disminuye considerablemente cuando la inyección se realiza mas tarde. El porcentaje de implantación fue más alto cuando se realizaba entre 37 a 39 horas. La tasa de aborto fue similar entre los grupos, con mayor porcentaje cuando se realizaba antes de 37 horas de la hGC. ⁽⁵⁾

D. Telles Schneider y cols, reportaron que los óvulos inyectados antes de las 38hrs o > de 43hrs después de la administración de hCG reportaron disminución significativa de las tasas de fertilización y desarrollo de los embriones en pacientes con factor masculino severo, sin embargo los óvulos inyectados entre 38 y 42hrs fertilizaban y desarrollaban embriones de buena calidad con tasas significativamente mayores de fertilización. ⁽⁷⁾

Yanagida y cols. reportaron una disminución significativa de las tasas de embarazo cuando la inyección de espermatozoides se realizaba 44 horas después de la administración de hCG, sin embargo los datos de supervivencia, de fertilización y de embarazo fueron difíciles de interpretar. ⁽⁹⁾

Otros estudios como el de Marleen Jacobs y cols, investigaron si el tiempo de incubación tiene algún efecto en la tasa de éxito de FIV e ICSI, analizaron 881 ciclos de FIV y 432 de ICSI, con un rango de tiempo de incubación de 1 – 7 hrs en FIV y 0.5 – 8hrs en ICSI, sin encontrar diferencia significativa entre los intervalos de tiempo y los resultados de los ciclos de FIV, ni en los ciclos de ICSI en lo que respecta a fertilización, implantación, embarazo en curso y aborto, concluyendo que los resultados de FIV e ICSI son independientes del tiempo de incubación con un intervalo de tiempo optimo de 30 minutos a 6 horas.⁽¹⁰⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe en la actualidad muy poca información sobre el tiempo óptimo de realización de ICSI y los resultados en la tasa de embarazo e implantación, esto conlleva a que se realice en algunos casos en cualquier intervalo de tiempo, generalmente dependiente de la logística y necesidades del laboratorio de gametos. Por lo cual los resultados en los programas de reproducción asistida señalan que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los intervalos de tiempo de realización de ICSI.

Es por ello que nos planteamos la siguiente premisa ¿ Tiene impacto el intervalo de tiempo entre la aplicación de hGC y la realización de ICSI en los resultados de Reproducción Asistida ?

HIPOTESIS

El tiempo óptimo de ICSI después de la aplicación de hCG es de 38 a 49 hrs con un periodo de incubación ovocitaria mayor a 5hrs en un programa de Reproducción Asistida.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el impacto del intervalo de tiempo entre la aplicación de la hGC y la realización de la inyección intracitoplasmática del espermatozoide en un programa de reproducción asistida en el Centro de Fertilidad IECH.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar si los resultados de ICSI en los diferentes intervalos de tiempo de aplicación de hGC e incubación ovocitaria se afectan en los ciclos con factor masculino como factor principal de esterilidad.
- Determinar si los resultados de ICSI en los diferentes intervalos de tiempo de aplicación de hGC e incubación ovocitaria se afectan en los ciclos sin factor masculino de esterilidad.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Comparar la tasa de fertilización, división celular, calidad embrionaria, embarazo e implantación entre los diferentes grupos de estudio.
- Analizar la tasa de embarazo bioquímico, clínico, curso y aborto entre los grupos de estudio.

MATERIALES Y METODOS

Diseño del estudio

Estudio observacional comparativo, ambispectivo, fue evaluado y autorizado por el comité de ética del Instituto para el estudio de la concepción humana.

Protocolo de Estimulación Ovárica

Las pacientes ingresaron a un programa de reproducción asistida con un diagnóstico de infertilidad cumpliendo todos los requisitos establecidos por el Centro de Fertilidad, de acuerdo a su diagnóstico y valoración médica se establece su protocolo de tratamiento para estimulación.

Se utilizaron análogos de GnRH en protocolo de desensibilización con agonistas de GnRH en fase lútea tardía (Acetato de Leuprolide 1mg/día con reducción de la dosis a 0.5mg al inicio de la menstruación) ó Antagonistas (Cetrotide ó Cetrorelix 0.25mgs) en esquema flexible. La estimulación ovárica se realizó con diferentes esquemas a base de gonadotropinas recombinantes (FSHr, Gonal F® ó Puregon®) y menotropinas (HMG, Merapur o Merional®) a diferentes dosis (no mayores a 375 UI/día), se realizó ultrasonido transvaginal basal en día 2 del ciclo para valorar inicio de estimulación, posteriormente se realizaron monitoreos foliculares para valorar inicio de antagonista, crecimiento folicular y valorar ajuste de medicamento de acuerdo a evolución y niveles de estradiol.

Se tomaron niveles séricos de estradiol basales y durante el ciclo de estimulación generalmente entre día 9 u 11 del ciclo de acuerdo a crecimiento y desarrollo folicular (Método ELFA por MiniVIDAS® bioMÉRIEUX). Cuando se encontraron al menos 3 folículos ≥ 17 mm se indicó la aplicación intramuscular de la 10,000 UI de HCG (Choragon® Ferring o Pregnyl® Organon), posteriormente se realizó aspiración folicular a las 33hrs posteriores a la aplicación de la HCG por medio de ultrasonido transvaginal (Hitachi® EUB-405 plus ó Digiprince DP-7700 con transductor vaginal de 5 mHz).

Intervalo de tiempo (Timing)

Este intervalo se refiere al tiempo transcurrido entre la administración de hCG, la aspiración folicular y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Se dividieron en 2 grupos, Grupo I: 35 - 37 hrs de hGC ó 2 – 4 hrs de incubación ovocitaria y Grupo II: 38 – 40 hrs ó 5 – 7 hrs. El procedimiento de ICSI se realizó por 2 embriólogos así como el manejo, valoración de óvulos, análisis de fertilización y calidad embrionaria. El tiempo promedio de inyección fue de 2 minutos por óvulo aproximadamente.

Laboratorio de Gametos

Lo óvulos obtenidos fueron valorados, clasificados y desnudados en el laboratorio de gametos de reproducción asistida bajo un microscopio de fase invertida (Nikon®). Se clasificaron en vesículas, Metafase I (MI), Metafase II (MII) y postmaduros, posteriormente se mantuvieron en una incubadora al 6% de CO₂ en aire a 37° (Forma Scientific) por 4 horas.

Muestra Espermática

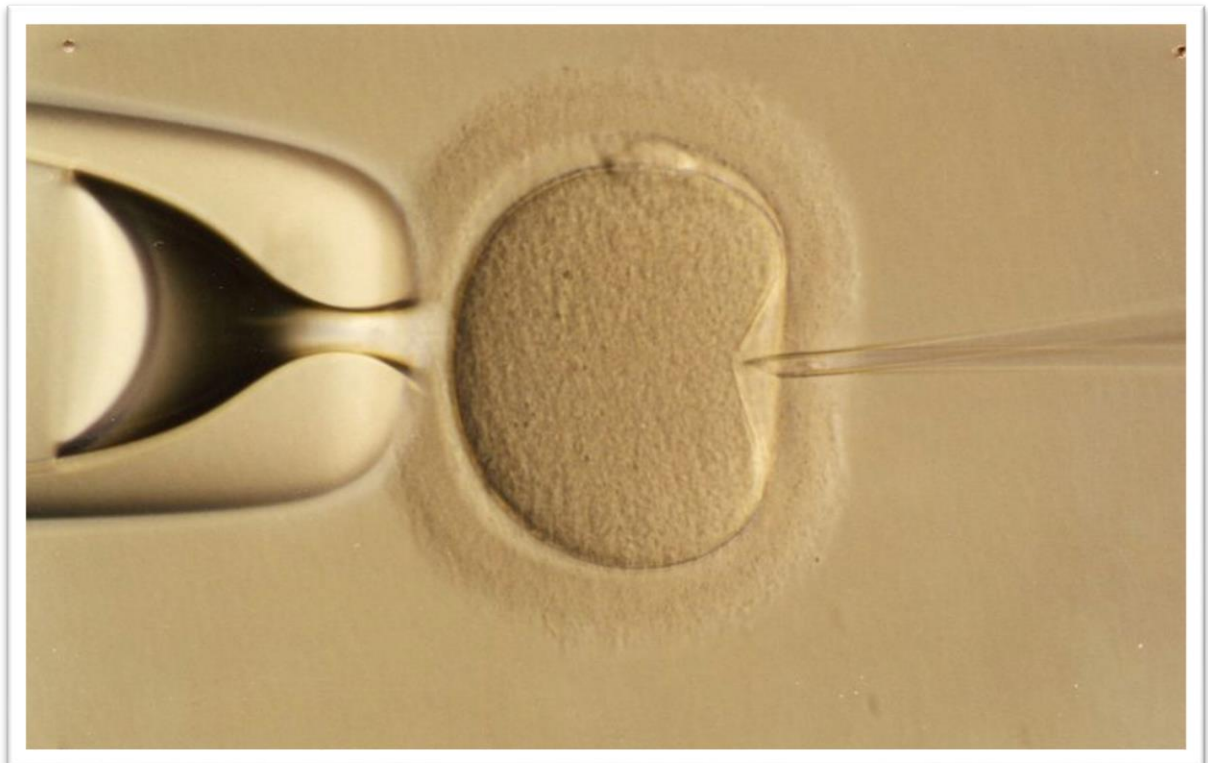
Se obtuvo la muestra de esperma mediante masturbación en las instalaciones del centro de fertilidad la cual fue identificada de acuerdo a los estándares y requisitos ya establecidos por el Centro de Fertilidad.

Una vez obtenida la muestra espermática 2 horas posteriores a la aspiración ovular, se procedió a realizar la capacitación espermática, por el método de gradientes de densidad, el cual se describe a continuación: En la valoración inicial se observa: volumen, viscosidad, y la presencia de gel.

Posteriormente se colocan en el portaobjetos 10 microlitros. Y se observa: motilidad, existencia de bacterias, leucocitos o eritrocitos. Se realiza el conteo de concentración de espermias utilizando la cámara de Neubauer, para esto se tiñe con azul de metileno. La dilución depende de la concentración de espermias. En un tubo cónico se deslizan 3 mililitros de medio de gradiente al 95% (G-mops 0.5ml + 9.5 ml Pure sperm) bañando las paredes hasta el fondo. A continuación se deposita 3 mililitros del gradiente al 50% (5ml G-mops + 5ml Pure sperm). El cual se deposita de la misma manera que el anterior para evitar que se mezclen y se rompa la interfase entre ellos (el volumen de los gradientes y del semen depende de la concentración y motilidad de la muestra, y puede variar de 0.5 a 1ml). Posteriormente se deposita el mismo volumen de semen deslizándolo de igual forma sobre la pared del tubo.

Se centrifuga a 1900 rpm por 20 minutos y posteriormente, con una pipeta Pasteur se recupera el sedimento, que será lavado en otro tubo con medio de cultivo (2 ml de G-mops suplementado 5% de suero sintético sustituto) entre 550 a 600 g por 5 a 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento con un volumen de 1.0 ml de medio (G-mops suplementado al 5%). Se evalúa de nuevo la muestra y se realizó el informe final correspondiente. Se realiza un frotis de la muestra capacitada y se tiñe con la tinción dift-quick para posteriormente valorar la morfología estricta de kruger, en el objetivo de aceite de inmersión a 100 x, para dar el reporte del porcentaje de formas normales con criterios estrictos.

Inyección Intracitoplasmática de Esperma (ICSI)



Los óvulos se colocan en gotas de N-2-hidroxietilpiperazina-N2-etanosulfónico (HEPES) buffer fluido tubárico humano (HTF) medios de comunicación.

Una alícuota de lavado de espermatozoides fue colocado en una gota central que contiene tampón HEPES HTF medios de comunicación con polivinilpirrolidona 5%.

Para la realización del ICSI con micromanipulador (Naris Hige®), los espermatozoides se inmovilizan al tocar la cola con una pipeta de inyección y se introducen en las gotas que contienen los óvulos, posteriormente el esperma se inyecta en el horario de las 3 en relación al cuerpo polar. Después de la inyección, los óvulos son incubados en 1,0 ml de medio IVF (Vitrolife) con aceite en una atmósfera de 6% de CO2 de aire a 37 °.

Fertilización





Se verifica la fertilización entre 18 a 24 horas posteriores al ICSI, definiendo fertilización por la presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares.

Se revisa el número y tamaño de blastómeras así como el porcentaje de fragmentación clasificando los embriones de acuerdo a la clasificación modificada de Lucinda Veeck. Se agruparon de acuerdo a calidad embrionaria, Grupo A: Embriones grado I y II, Grupo B: Embriones grado III y IV.

Se llevó a cabo la transferencia embrionaria de acuerdo a desarrollo y evolución guiada por ultrasonido (Hitachi® EUB-405 plus con transductor abdominal 3.5 mHz) en el día 2, 3, 5 ó 6 post aspiración, se utilizan diferentes tipos de catéteres como son: soft pass, fet set para realizar el procedimiento.

A todas las pacientes se les administró suplementación de fase lútea a base de progesterona en diferentes presentaciones (oral y/o vaginal, intramuscular) 400 mg diarios que se inician el día de la aspiración folicular. A los 14 días post-transferencia se toma una determinación cuantitativa de la sub-unidad beta de gonadotropina coriónica (Método ELFA por MiniVIDAS®) en caso de resultar positiva, se continúa con la suplementación de progesterona; si resulta negativa, se suspende toda medicación.

Se tomó como embarazo bioquímico como una determinación positiva de HCG a las 2 semanas pos-transferencia embrionaria, y embarazo clínico la presencia de saco gestacional con frecuencia cardíaca fetal a las 6 semanas de gestación y embarazo normoevolutivo o en curso como saco gestacional con frecuencia cardíaca a las 12 semanas de gestación.

POBLACIÓN Y MUESTRA

Se realizó en los ciclos de ICSI realizados entre Septiembre del 2008 a Diciembre del 2009 en el Centro de Fertilidad IECH.

GRUPOS DE ESTUDIO

De acuerdo al tiempo de aplicación de hGC, incubación de los óvulos y la realización de ICSI:

Grupo I: 35 - 37 hrs de hGC ó 2 – 4 hrs de incubación ovocitaria.

Grupo II: 38 – 40 hrs de hGC ó 5 - 7 hrs de incubación ovocitaria.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Pacientes entre 18 a 40 años de edad
- Dosis de estimulación no mayores a 375 UI/día
- Obtención de 3 ó más óvulos en la aspiración.
- Obtención de la muestra por masturbación
- Ciclos con espermatozoides homólogos.
- Ciclos en fresco (no óvulos o espermatozoides congelados).
- Que cumplan criterios de ICSI
- Que cuenten con un espermograma o capacitación espermática previa.
- 1 o 2 ciclos previos de reproducción asistida.

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Pacientes mayores de 40 años
- Obtención de 2 o 3 óvulos.
- Dosis mayor de estimulación de 375 UI/día
- Factor masculino severo y endometriosis severa
- Obtención de espermatozoides por PESA o TESE.
- Ciclos con donación de espermatozoides.
- Fertilización convencional
- Muestra espermática congelada
- Más de 2 procedimientos previos de reproducción asistida.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Que no se obtengan óvulos en la aspiración.
- No posible seguimiento para resultado final del ciclo de reproducción asistida.

INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS

1. Se elaboró un formato para recolección de datos que correspondieron a las variables de estudio obteniéndolas del expediente clínico, base de datos y expediente de laboratorio los cuales fueron organizados en Microsoft office Excel 2007.
2. El análisis estadístico se realizó por SPSS versión 15.0, utilizando el análisis estadístico requerido (Chi cuadrada, T de student y ANOVA).

RESULTADOS

Se analizaron un total de 106 pacientes que ingresaron a ICSI en el Centro de Fertilidad IECH entre Septiembre del 2008 a Diciembre del 2009, la edad de las pacientes fue de 27 a 41 años con una media de 35.5 ± 4.4 sin diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio (GI: 36.1 ± 4.5 , GII: 34.9 ± 4.3 , $p < 0.19$). Del total de los ciclos el 55% (n=58) correspondió al Grupo I y el 45% (n=48) al Grupo II.

Se aspiraron 921 óvulos, de los cuales 497 correspondieron al grupo I obteniéndose un 75% de madurez ovocitaria y 424 al grupo II con 69% de madurez, se realizó inyección intracitoplasmática a 173 óvulos (52%) y a 162 (68%) en el grupo I y II respectivamente ($p < 0.90$).

Respecto a las características de las variables de estudio, se encontró que el factor de esterilidad más frecuente fue el masculino en el 53% (n=56) de los casos, siendo una combinación de diversos grados de oligoastenoteratozoospermia el diagnóstico más común, endometriosis en el 12% (n=13) y factores mixtos (masculino / endometriosis) en el 19% (n=20), sin encontrarse diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p < 0.33$). (Tabla 1)

Tabla .1 Características de los ciclos de ICSI en los grupos de estudio.

Grupos de Inyección	Total (n=106)	I (n=58)	II (n=48)	p
Edad		36.1 ± 4.5	34.9 ± 4.3	< 0.19
Óvulos aspirados	921	8.5 ± 4.8	8.8 ± 4.7	< 0.77
Óvulos maduros (%)	671 (73)	6.4 ± 3.7	6.1 ± 3.3	< 0.62
Óvulos Inyectados (%)	649 (97)	6.1 ± 3.1	6.0 ± 3.0	< 0.90
Factor masculino (%)	56 (53)	29 (50)	27 (56)	< 0.56
Endometriosis (%)	13 (12)	8 (14)	5 (10)	< 0.76
Mixto (FM/ Endom)	20 (19)	13 (22)	7 (16)	< 0.33
Otros factores	17 (16)	10 (17)	7 (14)	< 0.79
media ± DS, p < 0.05.				

Se realizó ICSI a 357 óvulos maduros entre las 35 a 37 hrs después de la aplicación de hGC y a 292 óvulos 38 a 40 horas después (Grupo I y II respectivamente) (Fig.1)

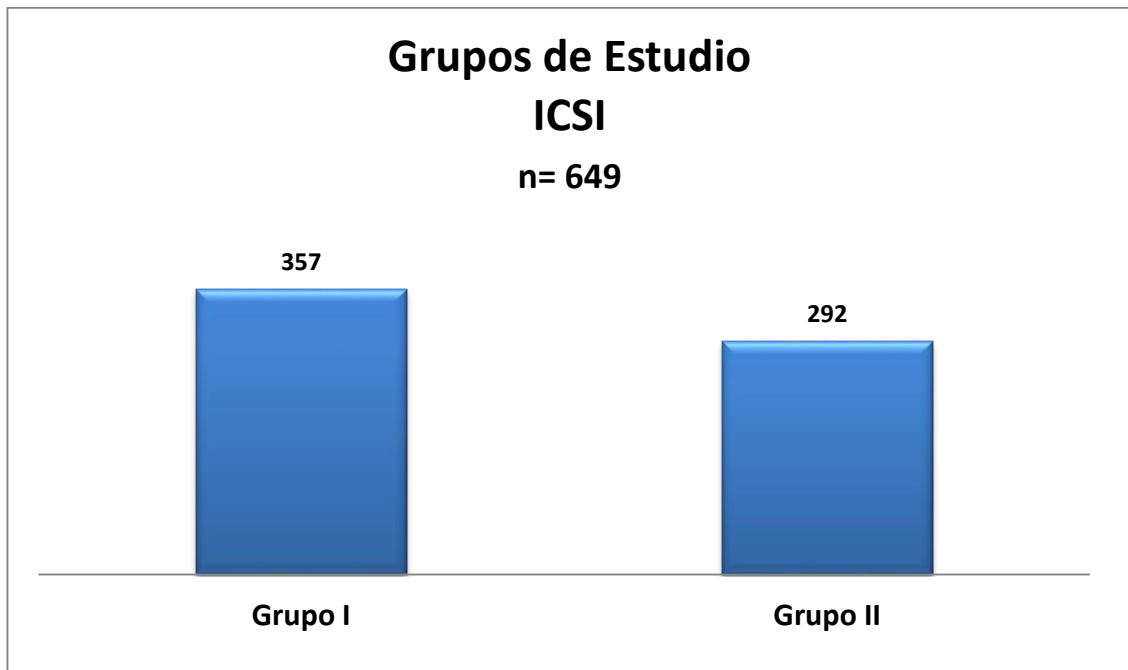


Fig.1 Número de óvulos a los que se les realizó ICSI por grupo de estudio.

Fertilización y División Celular

No hay diferencia en la tasa de fertilización entre los intervalos de tiempo entre aplicación de hGC y la realización de ICSI, se obtuvo un 48 y 49 % en el grupo I y II respectivamente, se reportó una división celular del 94% de los cuales se transfirieron 205 embriones que corresponde al 69% de la división (GI: 106, GII: 99)

(Fig.2)

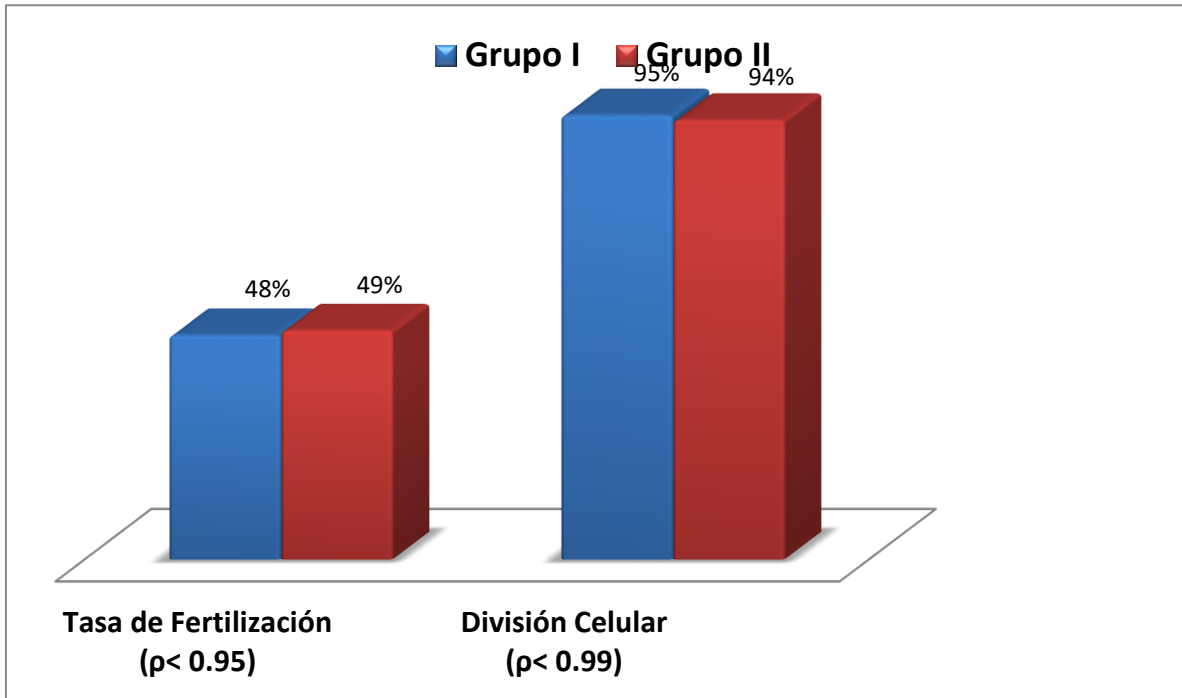


Fig.2 Resultados de tasa de fertilización y división celular en los grupos de estudio.

Se incrementa la calidad embrionaria al realizar ICSI de 38 a 40 hrs posteriores a la aplicación de hGC ó 5 – 7 hrs después de la incubación ovocitaria obteniéndose un 77% de embriones calidad A (Grado I - II) y reportándose como dato relevante en este mismo grupo un menor porcentaje de embriones calidad “B” (Grado III -IV) (Fig.3)

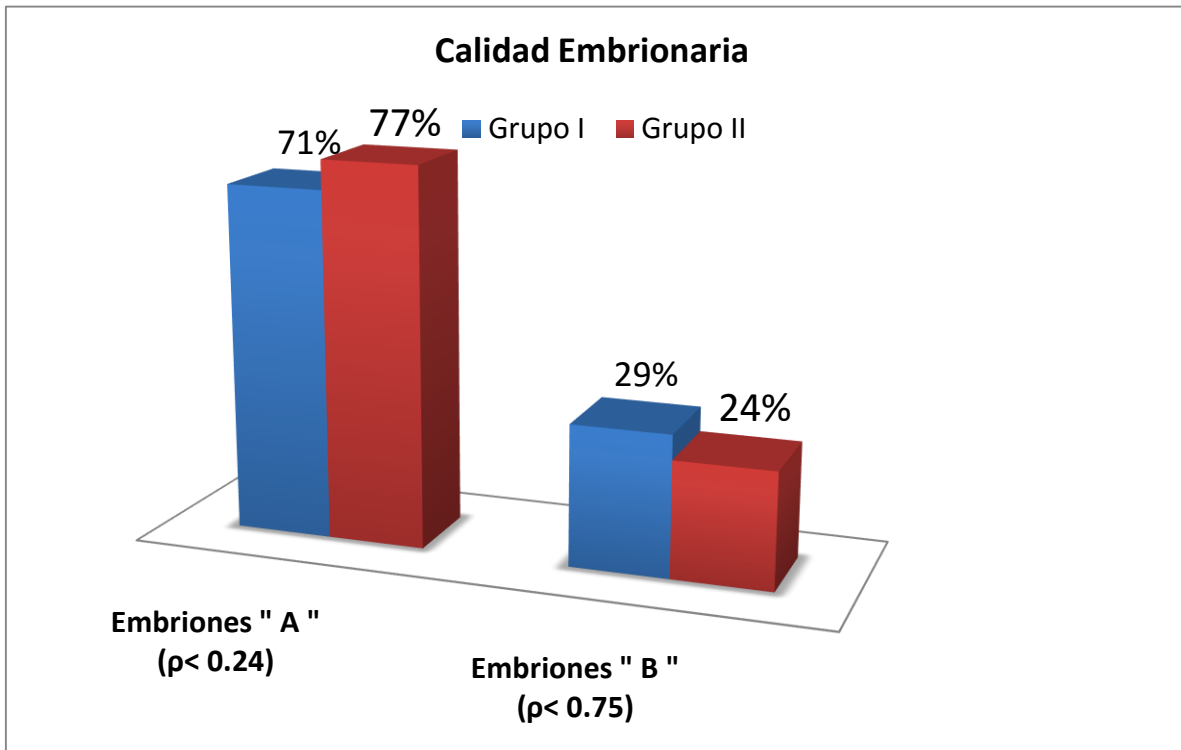


Fig. 3 Resultados de calidad embrionaria, "A" (Grado I-II) "B" (Grado III-IV).

Tasa de Embarazo e Implantación

Uno de los principales objetivos del estudio es la tasa de embarazo, lográndose una diferencia importante entre los grupos, con una tasa del 35 % si el ICSI se realiza 38 – 40hrs después de la aplicación de hGC ó después de 5 – 7hrs de incubación ovocitaria (Grupo II), disminuyendo a 26% si el ICSI se realiza antes de este tiempo ($p < 0.29$), de igual forma se presenta en el embarazo clínico y en curso obteniendo mayores resultados si se realiza ICSI después de las 38 hrs de la aplicación de hGC ($p < 0.51, p < 0.45$). (Fig.4)

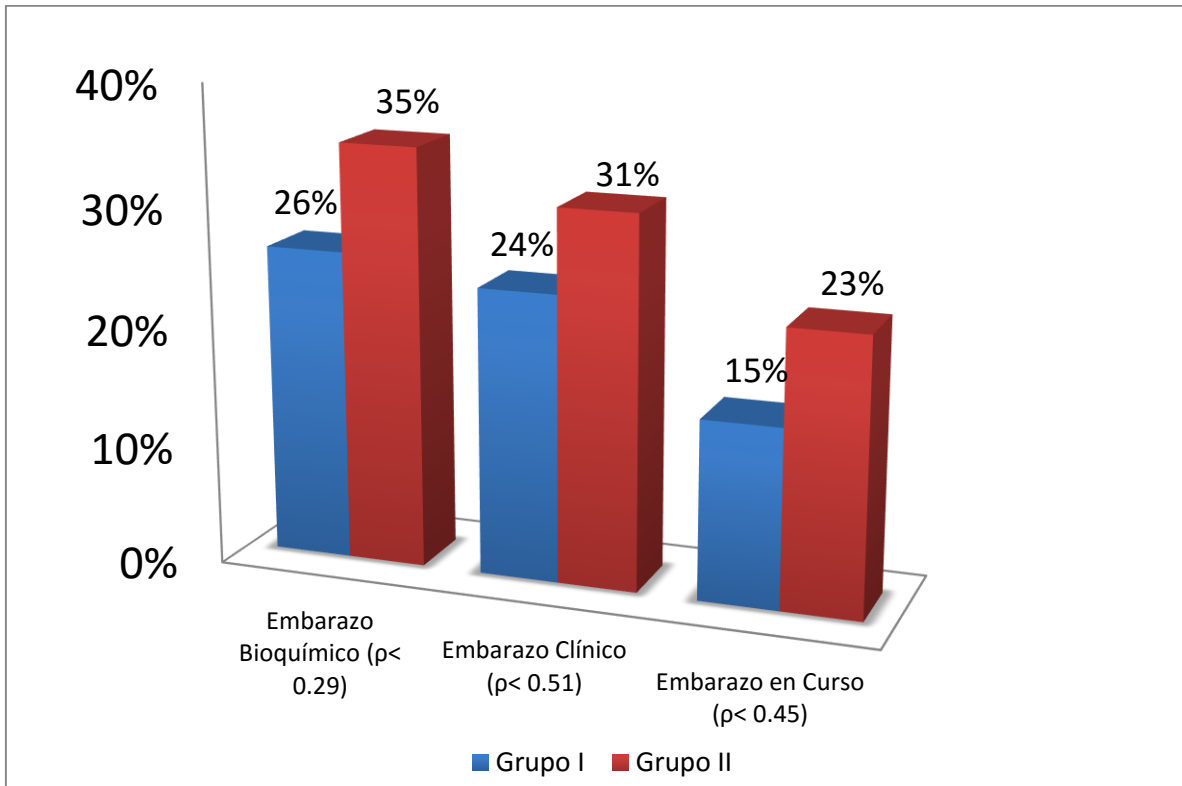


Fig. 4 Porcentaje de embarazo bioquímico, clínico y en curso entre los grupos de estudio.

Se encontraron datos relevantes del estudio en la tasa de implantación, reportándose una notable diferencia entre los grupos, con un 20% cuando la ICSI se realizó 5 - 7 hrs después de la incubación ovocitaria ó 38 a 40 hrs de la aplicación de hGC y del 14 % cuando la ICSI se realiza de 2 – 4 hrs después ($p < 0.36$), encontrándose un menor porcentaje de aborto en el grupo II, sin diferencia en el análisis estadístico ($p < 0.69$). (Fig.5)

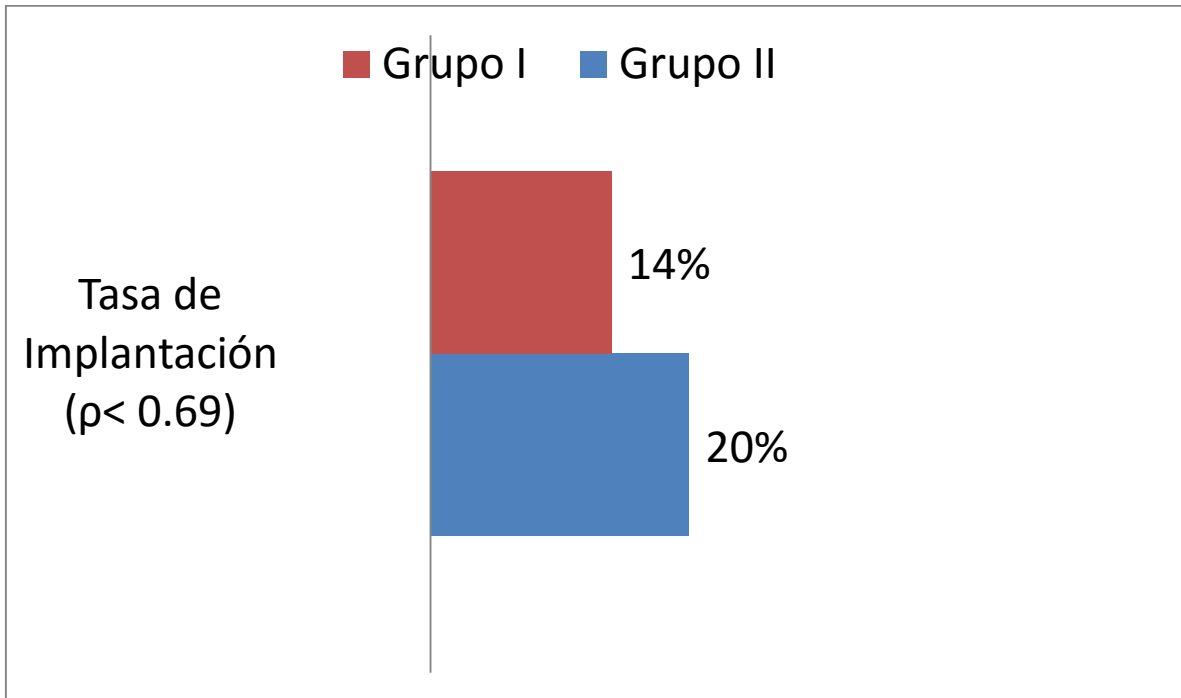


Fig.5 Resultados del análisis de tasa de implantación entre los diferentes grupos.

Se analizaron las variables en los ciclos con factor masculino y endometriosis entre los grupos de estudio, se obtuvieron menor porcentaje de embriones calidad "A" en el grupo II de los ciclos con factor masculino sin embargo la tasa de embarazo en este grupo fue más alta en relación con el grupo I, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de realización de ICSI y alteraciones en estos factores, los resultados son similares a los analizados en forma general sin considerar factores de esterilidad, encontrándose mejores resultados si la ICSI se realiza de 38 a 40 hrs de la aplicación de hGC ó 5 a 7 hrs de incubación ovocitaria en todas las variables estudiadas entre los dos grupos (Tabla 2,3,4).

Tabla. 2 Resultados de ICSI de acuerdo al tiempo de aplicación de hGC/incubación ovocitaria en pacientes con factor masculino.

Grupos de Inyección	Total (n=56)	I (n=29)	II (n= 27)	ρ
Óvulos Inyectados (%)	335	173 (52)	162 (48)	<0.96
Fertilización (%)	161 (48)	76 (44)	85 (52)	<0.12
División Celular (%)	154 (95)	73 (96)	81 (95)	< 0.99
Embriones Transferidos (%)	109 (70)	52 (71)	57 (70)	< 0.99
Embriones " A " (%)	76 (70)	38 (73)	38 (67)	< 0.53
Embriones " B " (%)	33 (30)	14 (27)	19 (33)	< 0.53
Tasa de Embarazo (%)	15 (27)	7 (24)	8 (30)	< 0.76
Tasa de Implantación (%)	13 (12)	4 (8)	9 (16)	< 0.24
Tasa de Aborto (%)	3 (20)	2 (28)	1 (12)	< 0.98

Tabla. 3 Resultados de ICSI de acuerdo al tiempo de aplicación de hGC/incubación ovocitaria en pacientes con endometriosis.

Grupos de Inyección	Total (n=13)	I (n=8)	II (n= 5)	ρ
Óvulos Inyectados (%)	74	43 (58)	31 (42)	< 0.63
Fertilización (%)	56 (76)	32 (74)	24 (77)	< 0.96
División Celular (%)	51 (91)	29 (90)	22 (92)	< 0.98
Embriones Transferidos (%)	28 (55)	15 (52)	13 (60)	< 0.77
Embriones " A " (%)	19 (68)	9 (60)	10 (77)	< 0.43
Embriones " B " (%)	8 (28)	5 (33)	3 (23)	< 0.68
Tasa de Embarazo (%)	4 (31)	2 (25)	2 (40)	< 1.0
Tasa de Implantación (%)	5 (18)	2 (13)	3 (23)	< 0.63
Tasa de Aborto (%)	1 (25)	1 (50)	0	< 1.0

Tabla 4 . Resultados de ICSI de acuerdo al tiempo de aplicación de hGC/incubación ovocitaria por grupos de estudio.

Grupos de Estudio	Total (n=106)	I (n=58)	II (n=48)	ρ
Óvulos inyectados (%)	649 (97)	357 (55)	292 (45)	< 0.90
Fertilización (%)	314 (48)	171 (48)	143 (49)	< 0.95
División Celular (%)	296 (94)	162 (95)	134 (94)	< 0.99
Embriones transferidos	205 (69)	106 (65)	99 (74)	< 0.31
Embriones " A " (%)	151 (74)	75 (71)	76 (77)	< 0.24
Embriones " B " (%)	54 (26)	31 (29)	23 (24)	< 0.75
Tasa de Embarazo (%)	32 (30)	15 (26)	17 (35)	< 0.29
Tasa de Implantación (%)	35 (17)	15 (14)	20 (20)	< 0.36
Tasa de Aborto (%)	9 (31)	5 (33)	4 (23)	< 0.69
$\rho < 0.05$				

Considerando que la aspiración folicular se realiza a las 33 hrs después de la aplicación de hGC, podemos observar un buen porcentaje de óvulos maduros (73 %), y buenos resultados en fertilización, embarazo e implantación, se enlistan los resultados generales en la siguiente tabla.

Tabla 5. Resultado Generales de ICSI en Ciclos de Septiembre 2008 a Diciembre 2009 en el Centro de Fertilidad IECH.	
Total procedimientos	Nº
Total de Pacientes	106
Óvulos aspirados	921
Óvulos maduros (%)	671 (73)
Óvulos inmaduros MI, VG (%)	250 (27)
Óvulos Inyectados (%)	649 (97)
Fertilización (%)	314 (48)
División Celular (%)	296 (94)
Embriones Transferidos (%)	205 (69)
Embriones " A " (%)	151 (74)
Embriones " B " (%)	54 (26)
Tasa de Embarazo (%)	32 (30)
Tasa de Implantación (%)	35 (17)
Tasa de Aborto (%)	9 (28)

DISCUSION

En la mayoría de los programas de reproducción asistida tienen establecido un intervalo de tiempo entre la aplicación de hGC y la aspiración ovocitaria generalmente no mayor a 36 hrs, sin embargo en estos programas no existe un tiempo (Timing) establecido de incubación ovocitaria antes de realizar ICSI, existen pocas publicaciones al respecto ya que las primeras investigaciones que se realizaron fueron hace varios años, concluían que no había diferencia significativa en los intervalos de tiempo entre la aplicación de hGC e ICSI.

En el centro de fertilidad IECH el intervalo de tiempo entre la aplicación de hGC y la aspiración folicular anteriormente era de 35 ó 36 hrs obteniendo mayor numero de óvulos postmaduros o con potencial de división y desarrollo disminuido, por lo cual se decidió en septiembre del 2008 modificar este intervalo de tiempo a 33 hrs lo cual dio la pauta para realizar este estudio.

Existe discrepancia en los resultados obtenidos en los diferentes estudios reportados respecto al tiempo óptimo de realizar ICSI después de la aplicación de hGC y el tiempo ideal de incubación ovocitaria.

En relación a la madurez ovocitaria J.Q. Huang¹⁸ y colaboradores reportan que si la aspiración ovocitaria se realiza antes de las 34hrs de la aplicación de hGC se obtiene un mayor porcentaje de óvulos inmaduros (22 %), pero con mayor tasa general de implantación comparado si se aspiran después de 35 hrs, de acuerdo a nuestros resultados obtuvimos un 27% (n= 349) de óvulos inmaduros con una tasa de implantación general del 16% considerando que los óvulos son aspirados a las 33 horas después de la aplicación de hGC lo cual nos indica que obtenemos mayor porcentaje de óvulos inmaduros con buen porcentaje general de implantación.

Uno de los reportes más relacionados a nuestro estudio es el de Dmitri⁽⁵⁾ y colaboradores realizado en São Paulo Brasil donde analizan la capacidad de los óvulos para el desarrollo de embriones viables de acuerdo al tiempo entre la aplicación de hGC e ICSI obteniendo la tasa más alta de fertilización si se realiza después de 41 hrs, sin embargo en este grupo obtuvieron una menor tasa de embarazo, embarazo clínico e implantación, concluyendo que el intervalo de tiempo de hGC e ICSI con mayor tasa de embarazo e implantación así como menor porcentaje de aborto fue de 37 a 39hrs, en nuestros resultados obtuvimos datos similares ya que los mejores resultados con mayor porcentaje de embriones “A”, tasa de embarazo clínico y en curso se obtuvo en el grupo II donde el ICSI se realizó entre 38 – 40 hrs de aplicación de hGC ó 5 - 7 hrs de incubación ovocitaria, encontrando una diferencia importante en la tasa de implantación en este mismo grupo de estudio.

Al analizar los ciclos con factor masculino alterado y el impacto del tiempo al realizar ICSI, encontramos mejores resultados en la tasa de embarazo e implantación si se realiza entre las 38 a 40 hrs después de la aplicación de hGC al similar a los reportes de D. Telles y cols⁽⁷⁾ donde analiza las variables de estudio en pacientes con factor masculino severo obteniendo una disminución significativa de las tasas de fertilización y desarrollo de embriones si se realiza ICSI antes de las 38 hrs de la aplicación de hGC.

Marleen Jacobs y cols⁽¹⁰⁾, reportan como conclusión de su análisis respecto al tiempo de incubación ovocitaria e ICSI, que no hay diferencia estadísticamente significativa en fertilización, implantación y embarazo, de la misma forma obtenemos resultados similares en nuestro estudio sin diferencia significativa pero con mayor tendencia en los resultados obtenidos en el grupo II donde el ICSI se realiza entre 5 a 7 hrs después del periodo de incubación ovocitaria ó 38 a 40 hrs después de la aplicación de hGC por lo cual es recomendable realizar ICSI entre este intervalo de tiempo obteniendo mejores resultados sobre todo en el número de embriones de mejor calidad, tasa de embarazo e implantación.

CONCLUSIONES

El principal objetivo de este estudio fue el evaluar los resultados y el impacto del tiempo entre la aplicación de hGC y la realización de ICSI en ciclos con gametos homólogos un programa de reproducción asistida.

Considerando que no hubo diferencia significativa en la edad entre los grupos de estudio, se agruparon de acuerdo a los diferentes intervalos de tiempo entre la aplicación de hGC e ICSI, después de realizar el análisis podemos concluir que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a tasa de fertilización, calidad embrionaria, tasa de embarazo, implantación y aborto entre los dos grupos de estudio, sin embargo es importante mencionar que se reportó una diferencia importante en el grupo II principalmente en la calidad embrionaria, tasa de embarazo e implantación, con un menor porcentaje de aborto en este mismo grupo.

Al analizar por separado solamente los ciclos con factor masculino y endometriosis los resultados fueron similares a los reportados de forma general.

De acuerdo a los resultados y análisis de este estudio concluimos que el tiempo óptimo para realizar ICSI es entre 38 a 40 hrs después de la aplicación de hGC y un tiempo de incubación ovocitaria entre 5 a 7 hrs, por lo cual es recomendable establecer este intervalo de tiempo en el programa de reproducción asistida del centro de fertilidad IECH ya que de esta forma se obtienen los mejores resultados en el número de embriones de buena calidad, tasa de embarazo, embarazo clínico, en curso e implantación, tomando en cuenta que esta tendencia de mejores resultados también se obtuvo en los ciclos con factor masculino alterado que es la principal indicación para realizar ICSI.

Además del interés científico de este hallazgo, existirán consecuencias en la logística del laboratorio de gametos ya que la significancia en el tiempo de inyección intracitoplasmática dentro de estos límites, puede llevar a un mayor grado de eficacia y calidad en los resultados del laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edwards RG, Steptoe PC and Purdy 1980, Br J Obstet Gynecol 87;737-756.
2. Ng SC, Bongso A and Ratnam, Microinjection of human oocytes: a technique for severe oligoasthenoteratozoospermia. Fertil Steril 1991;56:1117-1123.
3. Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem, Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340:17-18.
4. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. Hum Reprod 2002;17:2600 – 2614.
5. Dmitri Dozortsev, M.D., Ph.D. Peter Nagy, M.D., Soraya Abdelmassih, The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropina. Fertil Steril 2004;82:1492– 6.
6. Tournaye H; Verheyen G; Albano C; Camus M, Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. Fertil Steril 2002 Nov;78(5):1030-7.
7. D. Telles Schneider, A. Prado Gomes, S. Verza Jr., S. C. Esteves. Optimal time interval for intracytoplasmic sperm injection after administration of human chorionic gonadotrophin in severe male factor infertility. Fertil Steril 2006;86(3):S155-156.
8. Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Impact of oocyte preincubation time on fertilization, embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. Reprod Biomed Online 2004;8:682– 6.
9. Yanagida K, Yazawa H, Katayose H, Suzuki K, Hoshi K, Sato A. Influence of oocyte preincubation time on fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998;13:2223– 6.

10. Marleen Jacobs, Stolwijk AM, Wetzels AM. The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2001;16:1708–13.
11. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 1997;12:2792–6.
12. Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10:3012–7.
13. Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Impact of oocyte pre-incubation time on fertilization, embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online* 2004;8:682–6.
14. The ESHRE Capri Workshop Group. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: Evidence and Evolution, *Human Reproduction Update*, Vol.13, No.6 pp. 515–526, 2007.
15. Kathleen Miller, Robert L Barbieri, MD, Vanessa A Barss, MD. Intracytoplasmic sperm injection; UpToDate 2009.
16. Cecilia Hernández Leal, M.D. Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Una técnica de Reproducción Asistida con Indicaciones. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, Vol.54, N°3, 2003.
17. H. Kang A, Reh, Q. V. Neri, T. Takeuchi Z, Rosenwaks. Is There an Ideal Oocyte Maturation time for Optimal ICSI Outcome? *Fertil Steril* 2005;84;Suppl1,S48.
18. J. Q. Huang, E. Barbieri, S. Shastri, S. D. Spandorfer, Z. Rosenwaks. hCG administration to oocyte retrieval interval ≤ 34 or ≥ 35 hours: is timing everything. *Fertil Steril* Vol. 88, Suppl 1, September 2007.S272.
19. P. Devroey and A. Van Steirteghem, A review of ten years experience of ICSI. *Human Reproduction Update* 2004; 10(1):19-28.