



Universidad de Oviedo

***MASTER EN BIOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LA
REPRODUCCION***

*Ecografía endometrial y fallo
de implantación*

*Trabajo Fin de Master por Dña. Patricia Menéndez Martínez bajo la
tutela de Dr. D. Placido Llana Coto*

Junio de 2013

Índice

I.	Introducción	Págs. 3-8
II.	Hipótesis y objetivos	Pág. 9
III.	Material y metodología	Pág. 10
	IIIa. Medición por ultrasonidos	Pág. 11
	IIIb. Análisis estadístico	Pág. 12
IV.	Resultados	Págs. 13-15
V.	Discusión	Págs. 16-18
VI.	Conclusiones	Pág. 19
VII.	Bibliografía	Págs. 20-23
VIII.	Agradecimientos	Pág. 24
IX.	Adendum: Memoria Practicum	Págs. 25-45

I. Introducción [2-4]

En algunos ámbitos ambos términos (infertilidad y esterilidad) se utilizan como sinónimos para definir a aquellas parejas con algún problema para tener un hijo, pero médicamente la distinción es clara:

La esterilidad se define como la dificultad para conseguir un embarazo tras un año de relaciones sexuales frecuentes, próximas del día de ovulación y sin protección. Esta definición se basa en la estimación de una probabilidad del 85% de quedar embarazada a lo largo de un año en condiciones normales. Es importante saber que la especie humana no tiene un alto poder reproductivo, se habla de un 25% de posibilidad de embarazo en la relación sexual mantenida en el momento de ovulación de una mujer. Aproximadamente 1 de cada 6 parejas en edad fértil se verá afectada de esterilidad (15% -17%). La esterilidad primaria es cuando la pareja nunca ha logrado una gestación y la esterilidad secundaria es cuando la pareja ya tiene antecedentes de uno o varios embarazos.

Se habla de causas de la infertilidad primaria cuando la pareja se queda embarazada espontáneamente en dos o más ocasiones, pero existe una imposibilidad de llevar este embarazo a término y conseguir un recién nacido normal. Si una pareja tras un embarazo y parto normal no consigue una nueva gestación a término con recién nacido normal se denomina infertilidad secundaria.

Se ha de tener en cuenta, que lo anteriormente citado son porcentajes de embarazo cuando hablamos de mujeres menores de 35 años. Sabemos que a partir de esa edad el potencial reproductivo disminuye y que después de los 40 años, la posibilidad de embarazo por mes es menor del 10%.

Causas de infertilidad [3-4]

Un 30% sería por causas masculinas: alteraciones en el ámbito testicular, obstrucción de conductos, patologías en la próstata, alteraciones en la eyaculación o erección y alteraciones en el semen.

Otro 30% sería por causas femeninas, como la menopausia precoz, la endometriosis, las obstrucciones o lesiones de las trompas de Falopio, anomalías uterinas y cervicales o los problemas ovulatorios.

El 20% restante corresponde a causas mixtas o combinadas, en las cuales los dos miembros de la pareja son responsables. Nosotros siempre preferimos hablar de las causas o motivos de la pareja porque, sea el problema que sea, la colaboración de los dos miembros es fundamental.

Un 20% llega a ser una causa inexplicable, esto no significa que no hay una razón para explicar la esterilidad, sino que la causa no se ha podido identificar.

Por ello, y debido a que las mujeres de la sociedad actual deciden posponer más su maternidad, son cada vez más parejas someterse a procesos de reproducción asistida, como son los procesos de inseminación artificial, y fecundación in vitro.

Centrandonos más en las causas de infertilidad femenina, un 80% de los casos de esterilidad femenina se debe principalmente a estas causas:

- **Edad avanzada:** Esta documentado que a partir de los 35 años el potencial reproductivo disminuye y que después de los 40 años, la posibilidad de embarazo por mes es menor del 10%.
- **Factor tubo-peritoneal:** Cuando las trompas de Falopio se encuentran con algún tipo de lesión.

- Anovulación: Un ciclo anovular es un ciclo durante el cual los ovarios no pueden lanzar un ovocito. Por lo tanto, la ovulación no ocurre. La principal causa de anovulación (aunque no la única) se debe a un desequilibrio hormonal por parte de las hormonas que regulan los procesos de ovulación
- Endometriosis: Patología en la se que presenta tejido uterino en otras cavidades
- Otros factores de riesgo: Miomas. Enfermedades de transmisión sexual. Enfermedades crónicas, como diabetes, cáncer, enfermedad del tiroides, asma o depresión. Algunos medicamentos como esteroides, derivados de hormonas sexuales, etc. Desajuste en el índice de masa muscular, como en caso de obesidad con Índice de masa corporal > 30 o bajo peso, inferior al 25%.

Concentrándonos más en los fallos de implantación de los ciclos de reproducción asistida que será lo que se valore durante este trabajo nos encontramos que el fallo de implantación es uno de los principales factores limitantes del éxito en los ciclos de fecundación *in vitro* (FIV). La gran mayoría de tratamientos consiguen un número aceptable de embriones de cuatro a ocho células; sin embargo, tan sólo unos pocos consiguen sobrevivir tras ser transferidos dentro de la cavidad uterina.

En términos generales, clásicamente se considera fallo de implantación aquella situación en la que no se ha conseguido gestación tras transferir, en al menos tres ocasiones, tres embriones de buena calidad en un ciclo de FIV o de donación de ovocitos. Sin embargo, habida cuenta de la tendencia a transferir un número cada vez menor de embriones, posiblemente en el futuro deba modificarse dicha definición.

Se trata, por tanto, de un diagnóstico de exclusión: una vez obtenidos los ovocitos tras la estimulación ovárica, conseguida la fecundación mediante FIV

convencional o bien mediante ICSI, comprobada la división embrionaria a las 24 horas y 48 horas y transferidos esos embriones de buena calidad, después de superadas estas dificultades, sólo queda que el endometrio materno y el trofoblasto embrionario se adhieran y ocurra la implantación.

Antes de hablar de implantación es importante recordar que el endometrio, es decir a aquel tejido que ha de implantarse el embrión para llevar a cabo una gestación.

El endometrio es el tejido superficial que recubre las paredes del útero. En humanos, este tejido sufre modificaciones morfológicas y fisiológicas a lo largo del ciclo menstrual y es finalmente desechado al acabar el mes, si no hay gestación, momento en que se inicia un nuevo ciclo y en el que se renueva el endometrio perdido. El objetivo fisiológico primordial de estos cambios es el de preparar el endometrio hacia un estado receptivo en el que la implantación del embrión sea posible. Esta se produce exclusivamente durante un periodo limitado de tiempo denominado ventana de implantación, que ocurre entre los días 19 y 23 del ciclo menstrual (días 5-9 post ovulación), aproximadamente. [2,3]

El endometrio se prepara para la implantación mediante una serie de hormonas como son la progesterona y el estradiol para durante los días 19 y 23 del ciclo se encuentre en las condiciones óptimas para una posible implantación de un embrión.

Fase lútea [2]

En los primeros momentos después de la ovulación, el engrosamiento de las líneas externas hiperecogénicas se hace muy notorio. Este engrosamiento de la capa basal a veces es anterior a la ovulación y es debido al aumento de los niveles plasmáticos de progesterona que la preceden por lo cual podría ser interpretado como signo de ovulación inminente.

En los días de fase lútea media se alcanza el grosor máximo del endometrio, que suele ser 1 a 3 mm mayor que el endometrio en fase folicular preovulatoria, alcanzándose una meseta en el crecimiento unos 5 a 6 días tras el pico de LH.

Las bandas anecoicas que representan el endometrio funcional se comienzan a llenar de zonas ecogénicas irregulares hasta hacerse totalmente hiperecogénicas.

La transformación del endometrio funcional de hipoecogénico a hiperecogénico suele completarse a los 7 a 8 días de fase lútea y así el endometrio triple línea se ha ido transformando poco a poco en un endometrio completo y uniformemente hiperecogénico.

Siete días después de la ovulación en el periodo propicio para la implantación es frecuente ver un halo hipoecogénico que rodea el endometrio y que se corresponde con un edema de la basal. Estas áreas probablemente representan hemorragias y zonas de degeneración del endometrio que son un prelude del inminente inicio menstrual. Estas zonas pueden empezar a apreciarse varios días antes del sangrado menstrual.

El cambio en la ecoestructura del endometrio proliferativo a de la fase lútea depende de la progesterona y para que se produzca requiere valores superiores a los 2 ng/ml.

No están perfectamente claras las causas de la ecogenicidad del endometrio en la fase lútea, aunque lo más probable es que sea el resultado del aumento de las secreciones y de la vascularización que se produce en esta fase.

Es probable que la interfase del líquido del estroma con las glándulas y vasos conjuntamente sea la causa de este aumento de la ecogenicidad en la fase lútea.

La ecogenicidad del endometrio se adquiere al hacerse las glándulas endometriales más tortuosas, llenándose de moco y secreciones, produciéndose cambios en la respuesta acústica de los tejidos que originan los cambios descritos en las imágenes ultrasonográficas.

En los ciclos de reproducción asistida desde un primer momento se intenta asemejar todos los procesos en la mayor medida de lo posible a lo que transcurre en una gestación de forma natural por ello las condiciones del endometrio materno que se estimarían óptimas para correlacionarlas con una mayor tasa de embarazo sería que el endometrio se encontrara con un grosor medio ni muy fino ni excesivamente engrosado.

II. Hipótesis y Objetivos

Muchos estudios han demostrado una correlación entre el grosor endometrial o un cierto tipo de patrón ecogénico con la receptividad uterina. Algunos estudios han sugerido un grosor mínimo el cual sería necesario para producirse un embarazo, mientras que otros han informado de los efectos perjudiciales en cuanto a tasa de implantación al encontrar úteros de mayor grosor. Por lo contrario otros artículos no han podido demostrar una relación entre grosor endometrial, patrón y tasas de implantación. [1]

Por otra parte pocos estudios han combinado el análisis conjunto de patrón endometrial con espesor relacionándolos a ambos con tasas de embarazos.

Por ello el objetivo del estudio ha sido evaluar las características que presenta el endometrio en los dos días anteriores a la administración de hCG. En particular se intento evaluar la correlación entre el grosor endometrial y el patrón individual y el resultado de la FIV.

III. Material y metodología

El reclutamiento de pacientes y asesoramiento del estudio fue supervisado y aprobado por el tutor Dr D. Placido Llaneza Coto, jefe del servicio de Reproducción Asistida del Hospital Universitario de Asturias (H.U.C.A.).

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo de 37 pacientes. Las pacientes se sometieron a procesos de FIV entre febrero y marzo de 2013 en la Unidad de Reproducción Asistida del H.U.A. que cita en calle Celestino Villamil, de la localidad de Oviedo, provincia de Asturias, de España.

Los criterios de exclusión de pacientes para este estudio fueron los siguientes: la presencia de alguna anomalía uterina incompatible con la gestación, inseminación u otro método de reproducción asistida que no sea FIV (FIV clásica-ICSI), ciclos con donante de espermatozoides o ciclos en los que se transferiría embriones criopreservados con anterioridad o ciclos con donación de ovocitos.

Las pacientes fueron sometidas a un examen rutinario sin tener que realizar ningún análisis complementario para la elaboración de dicho estudio.

La elección del protocolo de estimulación era individual y se elegía bajo criterio médico en función de edad de la paciente, el diagnóstico, historial reproductivo, respuesta a medicación y otras condiciones médicas que podían coexistir a la hora del tratamiento.

La recuperación de ovocitos se realizó 36 horas después de la administración de la hCG y a continuación se estudiaron su madurez y sometieron a procesos de ICSI tras los cuales se mantuvieron en cultivo entre 48-72 horas y se transfirieron. Posteriormente se anotó aquellas mujeres que tras 15 días desde la transferencia embrionaria adquirían niveles de HCG en sangre y/o orina compatibles con embarazo bioquímico, confirmándose posteriormente a las

4-5 semanas tras la transferencia con la observación de un saco gestacional mediante ecografía transvaginal.

IIIa Medición por ultrasonidos.

La medición del grosor endometrial y el patrón se realizó 24-48 horas antes de la administración de la inyección hCG mediante una ecografía transvaginal mediada por una sonda vaginal conectada a un ecógrafo digital capaz de analizar las señales por ultrasonografía.

Se examinaba a las mujeres como parte de la rutina de recuento de folículos y preparación para la extracción de ovocitos y por tanto programación de la administración de la hCG. Estas disponían de un descanso de 5 minutos en la camilla antes de realizar la exploración ginecológica y tras haber vaciado por completo la vejiga.

El grosor endometrial fue medido como la distancia máxima de la pared anterior a la pared posterior del útero.

En función del espesor se dividió a las pacientes en dos grupos:

Grupo 1 $\leq 8,5\text{mm}$

Grupo 2 $> 8,5\text{mm}$

El patrón endometrial fue clasificado como

Patrón A: El patrón de la triple línea está compuesto de líneas que marcan la unión entre endometrio y miometrio de cada lado, tejido endometrial falso hipocogénico entre estas líneas y la línea central que demarca el adosamiento de la superficie endometrial al útero. Observándose tres líneas.

Patrón B: Cuando se observa poco definida la línea central ecogénica poco definida o discontinua.

Patrón C: No se observa triple línea, el endometrio se presenta de forma homogénea e hiperecogénico.

IIIb Análisis estadístico

Los datos se expresan como valores promedio, rango de acuerdo a una distribución normal y se analizaron con la *t* Student. Se ha considerado $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los datos que se observan con $p > 0,05$ son considerados como estadísticamente no significativos. Todos los datos fueron analizados con el programa informático IBM SPSS Statistics versión 19.00

IV. Resultados

La tasa de embarazo clínico fue del 40,5 % y la tasa de implantación de 29,9%. Las pacientes tenían edades comprendidas entre los 29 y 40 años, y el grosor endometrial varió desde los 6 mm a los 16,1 mm.

Por patrones las tasas de embarazo se distribuyeron de la siguiente manera

Patrón A (triple línea) tasa de embarazo del 50,0%

Patrón B tasa de embarazo fue de 46,2 %

Patrón C tasa de embarazo fue de 20%

La tasa de embarazo En mujeres con patrones A y B no es estadísticamente significativa $p > 0,05$ sin embargo si que ambas son significativas $p < 0,05$ con respecto a mujeres con patrón C

Las tasas de implantación entre los tres patrones fueron las siguientes:

Patrón A tasa de implantación 28,6 %

Patrón B tasa de implantación: 29,2%

Patrón C tasa de implantación: 15,4 %

Sucedo lo mismo que con las tasas de embarazo las diferencias observadas entre los patrones A y B entre si no son significativas sin embargo en relación con el patrón C son estadísticamente significativas.

En cuanto al estudio del espesor endometrial con respecto a las tasas de embarazo se han dividido a las pacientes en dos grupos:

Grupo 1: (Espesor endometrial ≤ 8.5 mm): 25.0%

Grupo 2: (Espesor endometrial > 8.5 mm): 48.0%

Se observaron las siguientes tasas de implantación dentro de los dos grupos de pacientes:

Grupo 1: 14,2%

Grupo 2: 38,8%

Tanto las tasas de embarazo como de implantación sugieren de forma estadísticamente $p < 0,05$ que a medida que aumenta el grosor endometrial aumentan las tasas de éxito de obtener un embarazo.

Para un análisis más detallado se subdividieron los patrones A,B y C en dos subgrupos de acuerdo a grupo 1 espesor endometrial $\leq 8,5$ mm y grupo 2 a valores superiores a 8,5mm, obteniéndose los siguientes resultados:

Tasas de Embarazo dentro del Patrón A

Grupo 1: 40%

Grupo 2: 44%

Patrón B

Grupo 1: 33,3%

Grupo 2: 66,6%

Patrón C:

Grupo 1: 0%

Grupo 2: 16%

En estas tres subdivisiones se vuelve a observar de forma significativa como las tasas de embarazo aumentan a medida que se aumenta el grosor endometrial.

Tabla1: Características del estudio (n=37)

Característica	Dato
Edad	36,2 ± 2,7
Espesor endometrial	9,97 ± 2,43
Estradiol	1686,66± 373,74
Progesterona	0,8± 0,2
Numero ovocitos extraídos	10,37± 5,51
Numero de ovocitos fertilizados	8,36±3,8
Número de embriones	5,08± 2,3
Número de embriones transferidos	1,9±0,3

Grupo	P ng/ml	Estradiol	Pacientes	Embriones Implantados	Porcentaje embarazo	Porcentaje de implantación
Patrón A	0,93	1439	14	7	50	28,6
Patrón B	0.82	1643	13	6	46,2	29,2
Patrón C	0.76	1511	10	2	20	15,4
Grupo 1			12	3	25	14
Grupo 2			25	15	48	38,8

V. Discusión

Algunos estudios [13-14] han informado de una correlación significativa entre el grosor endometrial y la tasa de embarazo. Sin embargo, algunos no son compatibles con esta visión [4,10]. Los resultados de este estudio y debió a la muestra pequeña de pacientes no son del todo extrapolables ya que no disponemos de muchos pacientes en los grupos con los que según los anteriores estudios es más difícil que se lleve a cabo la implantación. Muchos estudios han demostrado que un menor espesor endometrial esta correlacionado con peores tasas de implantación, pero no hay un límite definido el cual se pueda fijar como punto a partir del cual no es posible la implantación. [12] Aunque en este estudio no se han observado embarazos con grosor inferior a 7,1mm.

La pregunta que se plantea es porqué existe una baja tasa de implantación en endometrios delgados, la respuesta puede ser en parte porque existe una anomalía en los receptores de estrógenos pero también podría estar relacionada con la tensión de oxígeno en el endometrio.

La tensión de oxígeno disminuye durante la ovulación y el momento de la implantación pero en endometrios menores de 7mm, donde la capa funcional no existe o es delgada, la implantación del embrión se haría en la capa basal que presenta mayor vascularización y donde la tensión de oxígeno es mucho mayor. Se sabe que las altas tensiones de oxígeno son perjudiciales para el desarrollo embrionario, lo que podría explicar que en estos casos hubiera fallos de implantación. [16]

Weissman et al. [17] demostraron que la tasa de embarazo fue significativamente más baja por encima de un espesor máximo de 14mm y también sugieren un posible aumento en las tasas de aborto espontaneo para estas mujeres. Rashidi et al. [8] informó de llevar embarazos a término en pacientes que presentaban un espesor endometrial de hasta un máximo de 12mm. Sin

embargo Richter et al.[29] y Ai-Ghamdi [9] et al. demostraron un aumento significativo en las tasas de embarazo a medida que aumentaba el espesor del endometrio. Por tanto este estudio apoyan a los anteriores, en cuanto que el aumento del grosor endometrial no es perjudicial en el resultado clínico.

En el presente estudio se alcanzo el éxito de embarazo con un espesor máximo de 14,2 mm.

En cuanto al patrón endometrial, algunos estudios [20-22] creen que el endometrio se encuentre con aspecto trilaminar se correlaciona positivamente con mayores tasas de implantación y de embarazo. Mientras que otros estudios no encontraron relación significativa entre patrón de endometrio y tasas de embarazo. [8,13, 23, 24]

En este análisis se observo que la tasa de implantación y embarazo se vio disminuida en patrones hipercogénicos (patrón C).

Varios estudios han sugerido que los patrones hipercogénico están relacionados con altos valores de progesterona, haciendo que esta tenga un efecto prematuro sobre el endometrio, y por tanto disminuya las tasas de implantación. En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los valores para p en los tres patrones.

Y aunque el mecanismo no se conoce y sería por tanto materia de partida para otro estudio es porque se produce una asincronía entre la maduración endometrial y la etapa de desarrollo embrionaria, produciéndose así menores tasas de implantación.

Lo recomendado por varios autores[26,27] y con lo que también se está de acuerdo es la recomendación de la criopreservación de los embriones en mujeres que presentan un patrón homogéneo. Postponiendo la transferencia de embriones a cuando el endometrio presente mejores condiciones, y así aumentar las tasas de éxito de la transferencia.

Estoy de acuerdo con lo postulado por Friedler[26] en que el patrón endometrial ofrece información predictiva sobre la tasa de embarazo y de implantación pero que no se puede ni se debe utilizar como un dato exclusivamente predictivo para calcular la tasa de embarazo ya que hay múltiples factores más, que afectan al éxito, como pueden ser edad, sexo, calidad embrionaria, niveles hormonales, etc. Por lo tanto se estima que las pacientes deben ser aconsejadas de forma adecuada.

Al evaluar el efecto combinado de patrón endometrial y grosor, no se observó de forma significativa ($p > 0,05$) que las tasas de implantación y embarazo fuesen diferentes dentro de los patrones A, B y C del grupo 1. Mientras que Chen et al.[13] encontró que un endometrio más fino con un patrón en triple línea estaba asociado a una mayor tasa de embarazo clínico en comparación con los que no se distinguía la presencia trilaminar.

Se han aportado resultados que sugieren que el patrón endometrial tiene un efecto en la tasa de embarazos en mujeres que tienen un espesor endometrial moderado mayor a 9mm e inferior a 14mm. Lo anteriormente expuesto entra en incongruencia con los resultados aportados en los estudios de Entrada et al.[21] y Chen et al[13]. que no encontraron diferencias significativas entre las tasas de embarazo en los dos grupos. Por lo que se puede extraer que la correlación entre el grosor endometrial y el patrón y el embarazo que se muestra en este estudio no implica una relación causal.

La relación puede resultar de otros factores implicados en la receptividad endometrial como pueden ser factores hormonales, flujo sanguíneo, otro mecanismo fisiológico subyacente responsable del endometrio.

Por lo tanto y aunque algunos tratamientos puedan mejorar significativamente el espesor endometrial estas terapias no tienen porque traducirse en un beneficio en la tasa de embarazo.

VI. Conclusiones

Este estudio ha tenido muchas limitaciones, principalmente el número limitado de muestra por lo que lo más apropiado sería realizar un estudio clínico bien diseñado y con mayor rango muestral para confirmar los resultados de este estudio.

Cuando nos encontramos con mujeres que patrón C, los factores que se tienen que tener en consideración son múltiples, entre ellos están calidad embrionaria, edad de la paciente, historial clínico etc, que han de ser tomados en consideración, aun así se ha visto que tener este patrón endometrial se correlaciona directamente con peores resultados.

Independientemente del patrón endometrial un aumento en el grosor endometrial no se ha observado que tenga efectos adversos sobre las tasas de implantación

Se necesitan más estudios para llegar a una conclusión definitiva y sobre todo con respecto a las pacientes que pertenecen al grupo 1 para poder extraer conclusiones y buscar un espesor endometrial partir del cual se tengan nulas posibilidades de albergar un embrión.

VII. Bibliografía

1. *Zhao et al.* **The effect of endometrial thickness and pattern measured by ultrasonography on pregnancy outcomes during IVF-ET cycles.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012 10:100.
2. *Casado-Vela J, Rodriguez-Suarez E, Iloro I, Ametzazurra A, Alkorta N, García-Velasco JA, Matorras R, Prieto B, González S, Nagore D, Simón L, Elortza F.* **J Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate.** 2009 *Proteome Res.* Oct;8(10):4622-32.
3. *Hugh d. Melnick, m.d. f.a.c.o.g et al.* **Informacion sobre infertilidad e Fertilizacion In Vitro (FIV)** Advance Fertility Service. P.C. disponible en <http://www.infertilityny.com>
4. *Bruno-OlmedoS et al.* **Definicion y causas de esterilidad.** 2003. *Revista Colombiana de obstreticia y ginecología* vol 54 n° 4
5. *Barker MA, Boehnlein LM, Kovacs P, Lindheim SR:* **Follicular and luteal phase endometrial thickness and echogenic pattern and pregnancy outcome in oocyte donation cycles.** *J Assist Reprod Genet* 2009, 26:243–249.
6. *Richter KS, Bugge KR, Bromer JG, Levy MJ:* **Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, based on 1,294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embryos.** *Fertil Steril* 2007, 87:53–59.
7. *Gonen Y, Casper RF, Jacobson W, Blankier J:* **Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: A possible predictor of implantation in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 1989, 52:446–450.
8. *Gonen Y, Casper RF:* **Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF).** *J in Vitro Fert Embryo Transfer* 1990, 7:146–152.

9. *Rashidi BH, Sadeghi M, Jafarabadi M, Tehrani Nejad ES: Relationships between pregnancy rates following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection and endometrial thickness and pattern.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2005, 120:179–184.
10. *Laasch C, Puscheck E: Cumulative embryo score, not endometrial thickness, is best for pregnancy prediction in IVF.* J Assist Reprod Genet 2004, 21:47–50.
11. *Garcia-Velasco JA, Isaza V, Caligara C, Pellicer A, Remohi J, Simon C: Factors that determine discordant outcome from shared oocytes.* Fertil Steril 2003, 80:54–60.
12. *Sundstrom P: Establishment of a successful pregnancy following in-vitro fertilization with an endometrial thickness of on more than 4 mm.* Hum Reprod 1998, 13:1550–1552.
13. *Chen SL, Wu FR, Luo C, Chen X, Shi XY, Zheng HY: Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a retrospective cohort study.* Reprod Biol Endocrinol 2010, 8:30.
14. *Traub ML, Arsdale AV, Pal L, Jindal S, Santoro N: Endometrial thickness, Caucasian ethnicity, and age predict clinical pregnancy following fresh blastocyst embryo transfer: a retrospective cohort.* Reprod Biol Endocrinol 2009, 7:33–40.
15. *Detti L, Yelian FD, Kruger ML, Diamond MP, Rode A, Mitwally MFM: Endometrial thickness is related to miscarriage rate, but not the estradiol concentration, in cycles down-regulated with gonadotropin-releasing hormone antagonist.* Fertil Steril 2008, 89:998–1001.
16. *Casper RF: It's time to pay attention to the endometrium.* Fertil Steril 2011, 96:519–521.
17. *Weissman A, Gotlieb L, Casper RF: The detrimental effect of increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and*

- outcome in an in vitro fertilization program.** *Fertil Steril* 1999, 71:147–149.
18. *Ai-Ghamdi A, Coskun S, AL-Rejjal R, Awartani K: The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome.* *Reprod Biol Endocrinol* 2008, 6:37.
19. *Quintero RB, Sharara FI, Milki AA: Successful pregnancies in the setting of exaggerated endometrial thickness.* *Fertil Steril* 2004, 82:215–217.
20. *Jarvela IY, Sladkevicius P, Kelly S, Ojha K, Campbell S, Narqund G: Evaluation of endometrial receptivity during in-vitro fertilization using three-dimensional power Doppler ultrasound.* *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005, 26:765–769.
21. *Check JH, Lurie D, Dietterich C, Callan C, Baker A: Adverse effect of a homogeneous hyperechogenic endometrial sonographic pattern, despite adequate endometrial thickness on pregnancy rates following in-vitro fertilization.* *Hum Reprod* 1993, 8:1293–1296.
22. *Gonen Y, Calderon I, Dirnfeld M, Abramovici H: The impact of sonographic assessment of the endometrium and meticulous hormonal monitoring during natural cycles in patients with failed donor artificial insemination.* *Ultrasound Obstet Gynecol* 1991, 1:122–126.
23. *Merce LT, Barco MJ, Bau S, Troyano J: Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to in vitro fertilization/embryo transfer outcome?* *Fertil Steril* 2008, 89:111–117.
24. *Nahari CP, Catherno WH, Mckeeby JL, Wesley R, Segars JH: A suboptimal endometrial pattern is associated with a reduced likelihood of pregnancy after a day 5 embryo transfer.* *Fertil Steril* 2005, 83:235–237.

25. *Detti L, Saed GM, Fletcher NM, Kruger M, Brossoit M, Diamond MP: Endometrial morphology and modulation of hormone receptors during ovarian stimulation for assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril 2011, 95:1073–1081.*
26. *Friedler S, Schenker JG, Herman A, Lewin A: The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: A critical review. Hum Reprod Update 1996, 2:323–325.*
27. *Puerto B, Creus M, Carmona F, Civico S, Vanrell JA, Balasch J: Ultrasonography as a predictor of embryo implantation after in vitro fertilization: a controlled study. Fertil Steril 2003, 79:1015–1022.*
28. *Child TJ, Gulekli B, Sylvestre C, Tan SL: Ultrasonographic assessment of endometrial receptivity at embryo transfer in an vitro maturation of oocyte program. Fertil Steril 2003, 79:656–658.*
29. *RichterKS Bugge Kr, Bromer JG, Levy MJ: Relationship between endometrial thickness and embryo implantation, basade on1294 cycles of in vitro fertilization with transfer of two blastocyst-stage embros. Fertil steril 2007 87: 53-59*

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todo el equipo de la unidad de reproducción del HUCA por ayudarme en la recolección de datos, y avisarme cuando estaban las pacientes disponibles.

Así mismo quiero hacer una mención especial al Dr. Placido Llana Coto, por ayudarme a entender el mundo de las ecografías, de la ginecología en general y del endometrio en particular.

A mis compañeras de máster, Paloma Lequerica, María Barrios y Estefanía Cabello por ayudarme en la recolección de datos para la elaboración de este trabajo cuando yo por motivos laborales no podía hacerlo y a Yaiza Martínez y Jimena González por soportar mis interminables quejas.

Adendum

Practicum: Memoria de prácticas externas.



Universidad de Oviedo

PRACTICUM

*MASTER EN BIOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LA
REPRODUCCION*

Patricia Menéndez Martínez

4 de Febrero de 2013 a 15 de Febrero de 2013

INDICE

<i>I. Introducción</i>	<i>pág. 28</i>
<i>II. Procesos de una pareja infértil</i>	<i>pág. 28</i>
<i>IIa. Esterilidad e infertilidad</i>	<i>págs.29-33</i>
<i>III. Inseminación artificial</i>	<i>pág. 33</i>
<i>IIIa. Preparación de semen</i>	<i>págs.34-35</i>
<i>IV. Procesos FIV-ICSI</i>	<i>pág. 36</i>
<i>IVa. Obtención de ovocitos</i>	<i>pág. 37</i>
<i>IVb. Preparación espermatozoides</i>	<i>pág. 38</i>
<i>IVc. Inseminación ovocitos</i>	<i>pág. 39</i>
<i>V. ICSI</i>	<i>págs.39-41</i>
<i>VI. FIV-clásica</i>	<i>pág. 41</i>
<i>VII. Valoración de fertilización</i>	<i>págs.41-43</i>
<i>VIII. Transferencia embrionaria</i>	<i>págs.43-44</i>
<i>IX. Congelación y descongelación</i>	<i>pág.44</i>
<i>X. Valoración personal</i>	<i>pág. 45</i>

I. Introducción

He realizado este practicum entre los días 4 y 15 de Febrero de 2013 en la sección de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Central de Asturias (H.U.C.A).

Dicha sección está compuesta por un equipo multidisciplinar, ginecólogos, enfermeras auxiliares de enfermería, de administración y biólogos, todos tienen funciones diferenciadas y establecidas que realizan con una maestría digna de admirar, desde este aquí quiero dar las gracias a todos ellos, por tratarme de la forma tan excepcional que lo hicieron durante mi estancia allí, me hicieron sentirme como una más, y me explicaron todo lo que no entendía las veces que hacía falta sin que en ningún momento se les borrara la sonrisa de la cara, gracias a todos por su profesionalidad y su trato tan acogedor.

La unidad está enclavada en la planta segunda del edificio de maternidad, y compuesta por un quirófano y dos laboratorios (andrología y embriología), salas de espera de pacientes y de recuperación, salas de consulta, despachos, salas de reunión, así como zonas de aseo y limpieza.

II. Procesos de una pareja infértil

Cuando una pareja sufre de un proceso de infertilidad o esterilidad y tras un tratamiento previo con su ginecólogo no han conseguido un embarazo a término, las parejas son derivadas al servicio de reproducción asistida de Asturias, desde los demás servicios de medicina de las áreas sanitarias asturianas.

Tras gestionarse su primera cita pasan consulta con el ginecólogo, que mediante una correcta anamnesis, le expone todos los procesos a seguir para intentar llevar a cabo una gestación, los beneficios y riesgos de someterse a un proceso de reproducción asistida, y además se les apunta que al tratarse de un servicio público de salud y no poder dar cabida a todos los pacientes a un tiempo, se crea una lista de espera para ir recogiendo todas las demandas. Actualmente esta lista de espera cuenta con un tiempo

de aproximadamente 18 meses. Tras este periodo acuden de nuevo la sección de reproducción asistida para iniciar el proceso, pero antes de explicar en qué consiste este proceso es importante aclarar algunos términos.

II.a Esterilidad y la infertilidad:

Esterilidad Primaria: cuando la pareja, tras un año de relaciones sin tomar medidas de protección, no ha conseguido un embarazo.

Esterilidad Secundaria: la de la pareja que, tras la consecución del primer hijo, no logra una nueva gestación tras 2 o más años de intentarlo.

Infertilidad Primaria: la que padece una pareja que consigue una gestación que no llega a término con un recién nacido sano.

Infertilidad Secundaria: cuando, tras un embarazo y parto normales, no se consigue.

Un 30% sería por causas masculinas: alteraciones en el ámbito testicular, obstrucción de conductos, patologías en la próstata, alteraciones en la eyaculación o erección y alteraciones en el semen.

Otro 30% sería por causas femeninas, como la menopausia precoz, la endometriosis, las obstrucciones o lesiones de las trompas de Falopio, anomalías uterinas y cervicales o los problemas ovulatorio.

El 20% restante corresponde a causas mixtas o combinadas, en las cuales los dos miembros de la pareja son responsables. Nosotros siempre preferimos hablar de las causas o motivos de la pareja porque, sea el problema que sea, la colaboración de los dos miembros es fundamental.

Un 20% llega a denominarse sin causa aparente, esto no significa que no haya una razón para explicar la esterilidad, sino que la causa no se ha podido identificar una nueva gestación a término con un recién nacido sano.

Las principales causas de infertilidad masculina serían:

Alteraciones del tracto genital que imposibilita depositar el semen en el fondo de la vagina durante el coito (impotencia eréctil, ausencia de eyaculación)

Cabe destacar la situación anómala del meato urinario, ya sea por debajo de su ubicación normal (hipospadias) o por encima (epispadias), las curvaturas muy pronunciadas del pene o una gran disminución del mismo y la obesidad extrema.

Los problemas graves de la erección, la eyaculación muy rápida o muy retrasada y otros problemas en la eyaculación (eyaculación hacia la vejiga urinaria “eyaculación retrógrada” más frecuente en diabéticos o ausencia de eyaculación) también pueden impedir el depósito adecuado de los espermatozoides en la vagina.

Alteraciones de la producción del semen (disminución de la cantidad y/o calidad de los espermatozoides)

El semen puede contener pocos espermatozoides (oligozoospermia) o ninguno (azoospermia) debido a problemas en la producción de los mismos a nivel de los testículos. Sus causas fundamentales pueden hallarse a nivel de las glándulas del cerebro (hipófisis e hipotálamo) que producen las hormonas que regulan la formación de espermatozoides, a alteraciones genéticas (síndrome de Klinefelter, alteraciones de los genes contenidos en el cromosoma Y que regulan la formación de espermatozoides, etc.) o por una gran cantidad de problemas de los testículos: falta de desarrollo, desarrollo anómalo, falta de descenso a la bolsa (criptorquidia, testículo en ascensor) traumatismos, inflamaciones de transmisión sexual o no, tumores, exposición a productos tóxicos, quimioterapia y radioterapia, varicocele, etc.).

Los espermatozoides también pueden estar ausentes o muy disminuidos en el semen por obstrucciones en la vía por donde transcurren en su trayecto desde los testículos hasta la uretra por diferentes causas: ausencia de parte de los conductos (asociado frecuentemente al gen de la fibrosis quística), inflamaciones, tumores, traumatismos, lesiones quirúrgicas involuntarias, vasectomía, etc.

Los espermatozoides también pueden presentar anomalías en su movimiento (astenozoospermia), en su forma (teratozoospermia) o en su vitalidad (necrozoospermia)

por diferentes problemas: infecciones, presencia de anticuerpos (elementos que actúan en contra de los espermatozoides), alteraciones en el número de cromosomas, fragmentación del DNA (material genético contenido en la cabeza del espermatozoide), fenómenos de oxidación, varicocele (dilatación anómala de las venas que salen fundamentalmente del testículo izquierdo), etc.

Hay muchas otras causas que pueden afectar al número y a la calidad de los espermatozoides. Entre ellas cabe citar enfermedades importantes como la diabetes, las alteraciones del tiroides, la insuficiencia renal y hepática, así como la toma de determinados fármacos (efectos negativos sobre las hormonas, sobre la esfera sexual, sobre el testículo, etc.), drogas, tabaco y situaciones de estrés.

Hay que tener en cuenta que los espermatozoides y las células precursoras de los mismos son altamente sensibles y se afectan muy fácilmente por muchos factores difíciles de determinar y que son causa de infertilidad masculina en un gran número de ocasiones.

Infertilidad femenina:

Un 80% de los casos de esterilidad femenina se debe principalmente a estas causas:

- Edad avanzada: sabemos que a partir de los 35 años el potencial reproductivo disminuye y que después de los 40 años, la posibilidad de embarazo por mes es menor del 10%.
- Factor tubo-peritoneal: Cuando las Trompas de Falopio se encuentran con algún tipo de lesión.
- Anovulación: Cuando el óvulo no llega a ser expulsado por el ovario, ya sea por no haberse formado o por no alcanzar la madurez necesaria. En este grupo se encuentran englobadas las pacientes con Ovarios Poliquísticos.
- Endometriosis: Cuando el tejido uterino se encuentra fuera del útero.
- Otros factores de riesgo: Miomas. Enfermedades de transmisión sexual. Enfermedades crónicas, como diabetes, cáncer, enfermedad del tiroides, asma o depresión. Toma de medicación como antidepresivos o esteroides. Obesidad con Índice de masa corporal > 30 o bajo peso superior al 25%.

Para llevar a cabo un análisis de las posibles causas de infertilidad se realizan una serie de pruebas y exploraciones a ambos miembros de la pareja.

Para valorar la calidad seminal dentro del laboratorio de andrología se realiza un seminograma, que consiste en el análisis del semen mediante estudios macroscópicos (de viscosidad, capacidad de licuefacción, color y olor), y análisis microscópico, que consiste en el estudio de la concentración de los espermatozoides así como la movilidad, vitalidad y morfología de éstos. De todas estas pruebas, las más importantes e informativas son las medidas de concentración y movilidad.

Los parámetros que se suelen estudiar son los siguientes:

- **Licuefacción:** Para evaluar una muestra de semen esta debe estar licuada. Esto ocurre aproximadamente a los 20 minutos de la eyaculación si la muestra está a temperatura ambiente. Si la licuefacción no se produce en este tiempo, puede indicar algún tipo de disfunción a nivel de la próstata.
- **Viscosidad:** El semen licuado debe ser ligeramente más viscoso que el agua. Si la muestra es altamente viscosa, puede deberse a una disfunción prostática, eyaculación frecuente o al estado psicológico del paciente. Este aumento de la viscosidad no supone una causa directa de infertilidad, únicamente debe tenerse el cuenta a la hora de determinar el resto de parámetros de un seminograma.
- **Volumen:** El volumen normal de un eyaculado tras un periodo de 3 a 5 días de abstinencia es de 2-6 ml. Un volumen inferior, hipoespermia, puede deberse a una obstrucción causada por una infección, una alteración congénita de los vasos deferentes, o por eyaculación retrógrada. La producción de un volumen superior a 6 ml se denomina hiperespermia y ésta puede ser debida a procesos inflamatorios de próstata y/o vesículas seminales. La no producción de eyaculado se denomina aspermia.
- **Color:** el color habitual del semen es blanco opalescente, ligeramente amarillento.
- **pH:** Normalmente varía entre 7,2-8,2.

- **Concentración de espermatozoides:** El valor normal es de 20 millones/ml o 40 millones/eyaculado. Para medir la concentración se) cámaras específicas cámara de Makler
- **Movilidad:** Es indispensable para que los espermatozoides puedan llegar a las trompas de Falopio y fertilizar el óvulo. Se valora el porcentaje de espermatozoides móviles, el de progresivos y el grado de movilidad. Existen 4 tipos de movimientos, como se verá más adelante.
- **Vitalidad:** Se realiza una tinción supravital para distinguir entre los espermatozoides vivos y muertos, pues el hecho de que estén inmóviles no significa que estén muertos.
- **Morfología:** El espermatozoide debe tener la cabeza oval, sin defectos en el cuello, pieza media y cola.

Un resultado compatible con facilidad para concebir sería un conteo de espermatozoides mayor de 39 millones de espermatozoides en el eyaculado total con al menos 32% de espermatozoides con movimiento progresivo y al menos un 4% de formas normales. Cuando se tienen cantidades menores la probabilidad de embarazo desciende considerablemente.

Si los valores seminales del hombre están dentro de los parámetros asociados a normalidad y las condiciones de la mujer no lo impiden se inicia un máximo de cuatro ciclos de procesos de inseminación artificial.

III La inseminación artificial

La inseminación artificial es una técnica que consiste en el depósito de una muestra adecuada de espermatozoides en el tracto reproductor femenino, lo más frecuente es realizarlo en el interior de la cavidad uterina. De esta manera se acorta la distancia que separa óvulo y espermatozoide y se facilita el encuentro entre ambos.

Para que la inseminación artificial tenga éxito es imprescindible que al menos una de las trompas de Falopio sea permeable. Además, el semen del varón debe cumplir

unos parámetros mínimos (en el H.U.C.A), la concentración de espermatozoides móviles -tras su preparación en el laboratorio- y lograr los mejores resultados debe superar los 3 millones

El tratamiento de inseminación artificial consta de tres fases:

1. La estimulación del ovario con hormonas unido a la inducción de la ovulación. Para conseguir el desarrollo de varios folículos que tras la inducción farmacológica de la ovulación permite disponer consecuentemente de más de un óvulo para ser fecundado de forma natural, y por tanto aumenta la tasa de embarazo.
2. La inseminación se realiza en las consultas: no es preciso aplicar ningún tipo de anestesia ni resulta dolorosa. La inseminación se suele realizar tras haber inducido la ovulación. Para ello habrá que proveer al laboratorio de una muestra seminal. Una vez preparada la muestra, se deposita con una cánula especial dentro del útero. Tras ser depositado el semen, la mujer podrá permanecer unos minutos en reposo.

Illa. Preparación de semen

La preparación del semen consiste en seleccionar y concentrar los espermatozoides móviles. Para ello se pide a las parejas que acudan al laboratorio de andrología con las muestras seminales, estas se procesan mediante técnicas de capacitación o preparación seminal. Que consiste en técnicas de lavado y capacitación, que eliminan del eyaculado, restos celulares o espermatozoides muertos, inmóviles. Mediante swin-up o gradientes.

- **Gradientes de densidad.**

Permite la separación y concentración de espermatozoides por centrifugación. Los espermatozoides con buena movilidad y morfología atraviesan los diferentes gradientes tras la centrifugación, separándose del resto, que se descartan. Es una de las técnicas más utilizadas, se suelen utilizar volúmenes de 0,5-1 mL de cada gradiente de

concentración. Se preparan los tubos que sean necesarios por muestra teniendo en cuenta que no se debe depositar más de 1,5 mL de semen por tubo. Se dispensan 0,5 mL del gradiente de 40% en un tubo cónico, a continuación con una jeringa de 1 mL, depositar 0,5 mL del gradiente de 80% en el fondo del tubo (cono), muy despacio para que el gradiente de 40% suba y queden bien definidas las dos capas. Se decanta el semen licuado, resbalando por las paredes de los tubos, con cuidado de no romper la interfase. El semen debe quedar encima del gradiente de 40%. Se centrifuga a 1100 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se aspiran las distintas capas con una pipeta Pasteur en la zona del menisco para evitar alterar las interfases y las posibles contaminaciones, hasta alcanzar claramente el gradiente de 80%, donde se encuentra el sedimento con los espermatozoides maduros. Se repetir el proceso con todos los tubos de la misma muestra.

Cambiamos de pipeta, al aspirar el/los sedimentos. Se transfiere a un único tubo nuevo (para evitar contaminaciones) con 1-2 mL de medio de lavado, se homogeneiza y se centrifuga a 1500 rpm durante 10 min.

Se retira todo el sobrenadante, con cuidado de no aspirar el botón celular y se resuspende en 300-500 μ L de medio de cultivo. El medio utilizado para la realización de gradientes es el PBS.

- **Swim-up.**

Se centrifuga la muestra para concentrarla y se elimina el líquido sobrenadante. Después se añade un medio de cultivo gamete a la muestra concentrada que queda sobre ella, sin lesionar el pellet. Se incuba durante un periodo de 30 a 60 minutos en el que los espermatozoides de buena movilidad subirán al medio añadido, permitiendo su selección y uso para el tratamiento reproductivo indicado.

Se deja a temperatura ambiente formando un ángulo de 45°, para aumentar la interfase, durante un tiempo entre 30-60 minutos. Pasado este tiempo se aspira aproximadamente 300 μ L de medio de cultivo, con cuidado de no aspirar semen (para lo cual durante todo el proceso se debe mantener el ángulo del tubo). Si hay más de un tubo de una misma muestra se unifica todo el aspirado en un único tubo. Si el volumen obtenido es mayor de 500 μ L, se valora el grado de movilidad y la concentración de los

espermatozoides. Se centrifuga y se lleva a un volumen final de 300-500 μL para inseminar.

En caso de que tras tres inseminaciones artificiales no se consiga embarazo, o que la muestra del varón no cumpla los requisitos necesarios para la realización de inseminación artificial, se abren dos posibles vías para continuar, que la pareja acepte la donación de semen para intentar conseguir un embarazo mediante esta técnica, lo cual sería volver a repetir el proceso pero con semen de donante, o pasar a iniciar ciclos de estimulación ovárica para someterse a procesos de FIV-ICSI.

IV Procesos de FIV-ICSI

Son unas técnicas de reproducción asistida que consisten en que la fecundación de los ovocitos de la mujer por parte de los espermatozoides y su posterior desarrollo en embriones tiene lugar en el laboratorio de reproducción embriológica donde se tratan de reproducir al máximo las condiciones naturales.

La FIV es un proceso que se desarrolla por fases. En la primera se estimulan los ovarios, en la segunda se recuperan los ovocitos, en la tercera se realiza la inseminación in vitro de los ovocitos con los espermatozoides en el laboratorio. En la cuarta cultivan los ovocitos fecundados en las condiciones óptimas para conseguir buenos embriones. Finalmente se realiza la transferencia de los mejores embriones al interior del útero de la mujer para que puedan implantar y dar lugar al tan deseado embarazo.

Entrando más en detalle, al igual que ocurre para el proceso de inseminación artificial, la mujer debe ser sometida a una estimulación ovárica, para conseguir el desarrollo de varios folículos en los ovarios. La pauta de medicación más adecuada para la estimulación ovárica es personalizada y es establecida por los ginecólogos basándose principalmente en la edad de la paciente, la morfología de los ovarios, la analítica hormonal, la masa corporal, la respuesta a la estimulación en ciclos previos y en su experiencia. Las pacientes son sometidas a un procedimiento de estimulación ovárica controlada mediante la inyección de gonadotrofinas (FSH) con la finalidad de obtener

un Desarrollo Folicular Múltiple (DFM) adecuado, es decir, un número suficiente de folículos que garanticen la obtención de suficientes embriones de buena calidad que puedan ser transferidos al útero. Se requiere un control cuidadoso de la respuesta ovárica de cada paciente mediante la realización de controles de estimulación que incluyen los niveles de estradiol y ecografías vaginales para observar cuantos folículos se están desarrollando en los ovarios y que tamaño tienen y poder así determinar el momento adecuado para la inducción de la ovulación. Esto se lleva a cabo cuando los folículos ováricos han alcanzado un tamaño superior a los 18 mm y los niveles de estradiol son los adecuados se procede a la inducción artificial de la ovulación mediante una inyección de hormona hCG (Gonadotropina Coriónica humana).

IVa. Obtención de ovocitos:

Este procedimiento suele realizarse los lunes y martes, a primera hora de la mañana, es realizada por el médico acompañado por una de las enfermeras, y se realiza mediante punción-aspiración transvaginal guiada ecográficamente en el quirófano FIV. La duración de esta intervención es de unos 20-30 minutos aproximadamente por cada paciente, se realiza bajo sedación inducida por un médico anestesista, tras someterse a este procedimiento es acompañada por el equipo de enfermería a la sala de recuperación y tras 2 horas después suele regresar a su domicilio.

El líquido folicular aspirado pasa al laboratorio de embriología, anexo al quirófano FIV, dónde los biólogos son los encargados de recuperar, lavar, clasificar y valorar la madurez / calidad de los ovocitos obtenidos.

Para ello, el líquido folicular se pasa a unas placas de petri que bajo la lupa son separados los ovocitos de las granulosa más gruesas y de los coágulos de sangre a los que pudieran ir unidos, este proceso se intenta que sea lo más rápido posible pero sin ello perder eficacia, para ello cada placa antes de desecharla es revisada por un segundo biólogo para comprobar que no ha quedado ningún ovocito, una vez separados e identificadas las placas correctamente, los ovocitos se pasan a placas más pequeñas con medio de fertilización(IVF) son guardados en el interior de las incubadoras en las

condiciones apropiadas (37°C y 6% CO₂) hasta el momento de su inseminación con los espermatozoides que será aproximadamente 4 horas después.

IVb. Preparación de los espermatozoides en el laboratorio

Sobre las 11 de la mañana, la muestra de semen recogida por el varón se lleva al laboratorio de andrología donde se valora su calidad y se procesa de la forma para recuperar los mejores espermatozoides, como se explico anteriormente para el proceso de inseminación.

Si las muestras de semen poseen muy pocos espermatozoides móviles se debe proceder a una concentración de la muestra para poder recuperarlos.

En los casos en los que no haya espermatozoides en el eyaculado y el paciente tenga la espermatogénesis conservada en los tubos seminíferos de sus testículos se pueden recuperar espermatozoides mediante la realización de una biopsia testicular.

Si se trata de una muestra de semen congelada (semen de donante o semen del marido) se procederá a su descongelación una vez finalizada la aspiración folicular y se hayan obtenido ovocitos.

IVc. Inseminación de ovocitos

De nuevo en el laboratorio de embriología se lleva a cabo el proceso de inseminación de ovocitos, para ello hay que preparar previamente al ovocito, que se lleva a cabo en una campana extractora y calefactada a 38 °C. Se procede a la denudación del ovocito que consiste en el pelado de las células de la granulosa que rodean al ovocito. Previamente a este proceso se comprueba la madurez de los ovocitos siendo los únicos que serán pinchados aquellos que sean metafase II en los que ya se haya extruido el corpúsculo, aunque también se recogen los metafase I ya que pueden

sufrir una extrusión tardía del corpúsculo. Este proceso se realiza con un procedimiento químico- mecánico en presencia de enzima hialuronidasa en un espacio corto de tiempo.

El procedimiento consiste en pasar rápidamente la granulosa con el ovocito por tres gotas de 75 µl con el enzima hialuronidasa para lo cual se utiliza 1 flexiplet tras lo cual se pasa por 3 gotas de IVF de unos 50 µl en los que se irá soltando el complejo cumulo ovocito y en las 3 restantes se realiza la denudación mecánica el cual consiste en aspirar y expulsar el ovocito varias veces de manera que se suelten las células de la granulosa.

Para el manejo del cumulo y del ovocito se utilizan stripers (flexiplet) de mayor diámetro y según se van denudando pasando al de menor tamaño. Una vez pelados se valoran los ovocitos de manera que las vesículas germinales (profase I) se desechan, mientras que las metafases I y II se pasan a otra placa en la que primero se lavan en 3 gotas de IVF, pasándolo posteriormente a la placa en el incubador mientras se prepara el microscopio y la placa de ICSI tras lo cual se procederá a realizarla.

La inseminación de los ovocitos puede realizarse por dos procedimientos dependiendo principalmente de la calidad de los espermatozoides recuperados y del número de ovocitos obtenidos:

- Inseminación Clásica para FIV.
- MicroInyección IntraCitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

En caso de un número de ovocitos y/o los espermatozoides procedan de biopsia testicular, el procedimiento a seguir será la ICSI.

V. MicroInyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La ICSI es una técnica especial de inseminación de los ovocitos en los procedimientos de fecundación in vitro que consiste en la introducción de un sólo espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito. Desde su incorporación al laboratorio como técnica de rutina los resultados obtenidos dan nuevas perspectivas de tratamiento a las parejas con infertilidad debida a factor masculino severo que anteriormente veían limitadas sus perspectivas de éxito con la FIV convencional. Con esta técnica se intenta facilitar la fecundación reduciendo o eliminando los obstáculos que se encuentran los

espermatozoides en su intento de llegar al ovocito y fecundarlo. La tasa de fecundación con ICSI es de aproximadamente del 70 %.

Lo primero que hay que realizar es la preparación del instrumental, en primer lugar hay que purgar los micromanipuladores para lo cual con ayuda de un papel en la punta del microinyector se va expulsando aceite hasta librarse de todas las burbujas. Acto seguido se colocan las agujas de ICSI y Holding enfocándolas con el movimiento de los macromanipuladores hasta que estén en el mismo plano.

En la placa de ICSI se preparan diferentes gotas con diferentes medios, las gotas grandes de unos 50 μ l de medio gamete se usaran para purgar las agujas. Mientras que las pequeñas son de PVP (Polivinil pirrolidona), compuesto sintético que se utiliza para enlentecer a los espermatozoides, en ellas se pondrán la muestra de semen y se escogen los espermatozoides, donde una vez seleccionados se paran varias veces cada uno (doblan las colas varias veces) para asegurarse de que inicia la reacción acrosómica. Este espermatozoide una vez parado se aspira por la cola con la aguja de ICSI y nos iremos a una de las gotas de medio gamete de unos 10 μ l, que están numeradas y que pondremos tantas como ovocitos tengamos hasta un máximo de 6. Estas placas están recubiertas de aceite. A la hora de pinchar se sujeta al ovocito con la holding y con ayuda de la aguja de ICSI se rota hasta que el corpúsculo quede a las 12 o las 6 para evitar afectar al huso acromático cuando se inyecta. Una vez posicionado el ovocito hay que asegurarse de que se está en el plano adecuado observando como al acercarse la aguja de ICSI se forma un cono en la membrana plasmática, tras observar el cono se posiciona el espermatozoide aspirado anteriormente a la punta de la aguja y se procede a la microinyección. A la hora de microinyectar se avanza poco a poco intentando que la membrana rompa sin necesidad de aspirar y en caso de necesidad, se intentara aspirar lo menos posible. Se apunta el tipo de ruptura de la membrana:

- SS: Sin salto es la que la aguja no produce rotura sino que penetra sin oposición la membrana plasmática del ovocito. Se produce en ovocitos de mala calidad y tienden a degenerar.

- tipo I: Es la óptima es aquella en la que la rotura de la membrana se produce con la inyección.
- tipo II: Es la que se tiene que realizar una aspiración relativamente normal.
- Tipo III: Requiere una elevada presión de aspiración.

Por último una vez pinchados los ovocitos se pasan a una placa de cultivo, donde se llevaran al incubador hasta su valoración a las 24h.

VI. FIV clásica

Consiste en poner en contacto los espermatozoides con los ovocitos aislados anteriormente de los folículos ováricos de la mujer y esperar que de forma natural puedan conseguir la fecundación.

En la FIV tradicional no se deben de pelar los ovocitos sino que se dejan con las células de la granulosa que rodean al ovocito, ya que los espermatozoides necesitan contactar con ellas para poder iniciar la reacción acrosómica.

Para realizar la FIV se realiza en una placa donde se dejan hasta el día siguiente cuando se pelan las células de la granulosa y se valora la fertilización, que por lo general no fue muy alta.

VII Valoración de fertilización

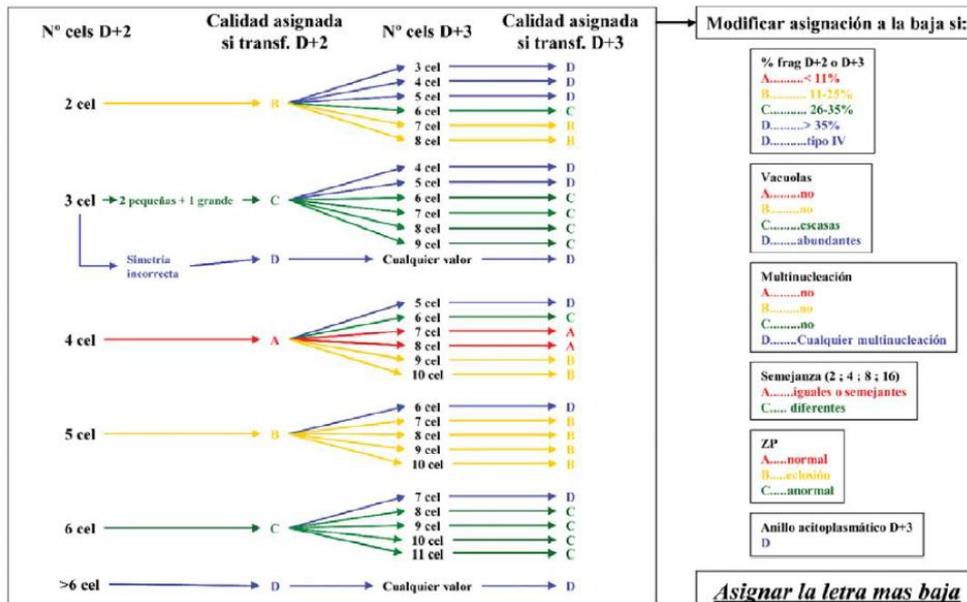
Se realiza a primera hora de la mañana de los días restantes, para observar el desarrollo del embrión y clasificarlo según la clasificación de ASEBIR (Asociación española para la biología de la reproducción).

- Día +1: se valora cuantos de los ovocitos tratados han fertilizado de forma normal excluyendo así a los triploides o los que no han evolucionado. Un ovocito fertilizado adecuadamente tiene que constar de 2 pronúcleos y 2 corpúsculos. Además también se valorara el tamaño de los pronúcleos así como el número, tamaño y posición de los nucléolos dentro de los pronúcleos.

- Día +2: se valora el número de blastómeras, el % de fragmentación y disposición de la misma. También se valora la simetría, pero no solo atendiendo a que tengan el mismo tamaño sino también atendiendo a las futuras divisiones; es decir en día dos un embrión debería de tener 4 blastómeras del mismo tamaño sin embargo un embrión con 3 blastómeras podría tener una buena simetría siempre y cuando tenga 2 blastómeras del mismo tamaño y una más grande, esto se debe a que es posible que aun no se halla dividido en el momento de la observación.

-Día +3: Se valoran los mismos parámetros que en día +2, aunque en este caso el embrión ideal sería de unas 8 blastómeras del mismo tamaño o de 7 pero que aun no se ha dividido.

Los embriones según ASEBIR tienen 4 posibles clasificaciones de calidad según los parámetros morfológicos siendo de mejor a peor: A, B, C y D. Es importante destacar que aunque un embrión mejore en un día posterior siempre se le asigna la letra más baja.



Clasificación de embriones según ASEBIR para embriones de días +2 y +3

Tras una programación de que mujeres iban a transferirse en Día +2 y en Día +3, se les citaba para los días de la transferencia.

VIII. Transferencia embrionaria

Consiste en la introducción de los mejores embriones de la cohorte dentro del útero materno con la ayuda de una cánula especialmente diseñada para ello. El procedimiento lleva a cabo en quirófano donde se realizó la punción anteriormente, aunque en este caso no es preciso realizar una sedación, ya que es un proceso rápido y no suele causar muchas molestias. La ley española permite la transferencia de un máximo de 3 embriones cada vez, si bien ello incrementa sobremanera las posibilidades de una gestación múltiple. Por ello, se recomienda la transferencia de 1 ó 2 embriones en función de la calidad de los mismos, aunque la decisión final la suelen tomar las mujeres bajo consejo de los biólogos, que les informan del número de embriones que se le van a transferir así como de su calidad.

Una vez el equipo de enfermería hace colocarse a la mujer en la camilla, el ginecólogo canaliza el útero para realizar la transferencia, mientras el biólogo en la lupa atemperada carga la cánula de transferencia con los embriones, del siguiente modo: primero un poco de aire luego hasta 1cm de medio, una pequeña capa de aire, medio con los embriones (en la parte central de la columna de medio), otra vez aire y finalmente sella con otro poco de medio. Sin que se produzcan vibraciones para no perder los embriones se llevan al quirófano donde se introduce en el catéter externo. En este punto el ginecólogo con ayuda del ecógrafo le va indicando al embriólogo hasta donde puede avanzar y cuando puede expulsar los embriones. Una vez realizada la transferencia el ginecólogo retira ambos catéteres y se los cede al embriólogo para asegurarse de que la transferencia haya sido un éxito y los embriones no se encuentren retenidos en los catéteres.

En ocasiones antes de realizar la transferencia de los embriones estos requieren que se les realice una técnica conocida como Hatching asistido. Esta técnica consiste en romper la Zona pelúcida de manera que se facilitará la eclosión del embrión. Se suele realizar en determinados casos como son en embriones congelados o en aquellos procedentes de pacientes de edad avanzada (40 años), así como en aquellos que tengan una pelúcida muy gruesa. En cuanto a la forma de realizarlo puede ser por Laser. La elección del lugar en el que realizar la rotura de la membrana es importante dado que se

podrían dañar las blastómeras adyacentes, por lo que se deberá escoger un lugar lo más separado posible de las blastómeras.

IX. Congelación

En caso de que tras la transferencia aun queden disponibles embriones de buena calidad (A o B) se realiza una congelación de ellos, para que en caso de fallo de la primera transferencia puedan usarse en ciclos posteriores. Para ello, se pasan los embriones a congelar a pocillos con medio de congelación Cook, y se siguen las instrucciones marcadas por el fabricante para la congelación con este tipo de medios.

Una vez cargados en las pajuelas se realiza la congelación lenta, y transcurrido el tiempo de congelación se conservan las pajuelas con los embriones correctamente identificadas en los tanques de nitrógeno líquido.

Para la descongelación y posterior transferencia se realiza el proceso inverso con medios de descongelación Cook y se siguen las instrucciones dispuestas para el fabricante, se observa a microscopio el estado de los embriones tras la descongelación y se programa la transferencia de los embriones al día siguiente si se observa que los embriones siguen desarrollándose tras la criopreservación.

Una vez son transferidos los embriones se les solicita a las mujeres que a los quince días de la transferencia se realicen una medición de HCG en sangre o en orina y que comuniquen el resultado a la sección médica, en caso de que se identifique con valores compatibles con embarazo bioquímico se les cita a la pareja para realizar una ecografía y confirmar la presencia de saco embrionario, en el caso contrario tras unos meses de descanso las parejas inician de nuevo el proceso de reproducción asistida si no existen contraindicaciones médicas que lo desaconsejen y las parejas lo aprueban, hasta un máximo de tres ciclos.

x. Valoración personal

Dos semanas intensas, el tiempo pasa rápido, los primeros días de situación, los siguientes de intentar aprender y los últimos cuando ya pareces situada tienes que marcharte, los diez días de practicum han dado para poco y para mucho a la vez, te da tiempo a ver más o menos casi todo lo que acontece en la unidad de reproducción, aunque cuando te quieres dar cuenta se ha acabado, por ello creo que si hubiera otra forma de organizar para que se pudiera pasar más tiempo en las unidades de reproducción asistida sería bien recibida por parte de todos los alumnos del máster.

Otra vez más quiero manifestar mi gratitud para cada uno de los miembros de la unidad de reproducción del HUCA por haber puesto todo el empeño por sacar tiempo para poder enseñarme todos los procesos que se realizaban en la sección y resolverme las dudas que me iban aconteciendo.

