

Endometriosis y medicina basada en la evidencia

Juan A García Velasco

IVI-Madrid, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid.

La endometriosis es una enfermedad con una alta prevalencia de la que sabemos muy poco, por eso se suele empezar diciendo que es una enfermedad muy común y enigmática. Es cierto que tenemos de distinguir dos entidades muy diferentes, ya sean lesiones endometriósicas absolutamente asintomáticas en mujeres fértiles o bien la propia enfermedad endometriósica. Por otro lado, existen dos contextos muy diferentes, que a veces aparecen imbricados, que son sus principales síntomas: dolor pélvico e infertilidad. Y además, las dos modalidades terapéuticas que podemos ofrecer son así mismo muy diferentes y pueden combinarse, la cirugía sólo funcional o más compleja, y los tratamientos médicos en continua evolución. Por tanto, es de gran importancia saber ante qué tipo de paciente nos enfrentamos cuando vamos a proceder a su diagnóstico y tratamiento, ya que la clave del éxito es sin duda la individualización.

La medicina basada en la evidencia es una forma de poder valorar, de forma ponderada y homogénea, los resultados de diferentes estudios metodológicamente muy variables, y extraer de ellos, recomendaciones para la práctica clínica, que deberán ser contrastadas con la experiencia clínica y el sentido común. La experiencia clínica no es sólo, como alguna vez se ha dicho, “cometer el mismo error durante muchos años seguidos, pero cada vez con más seguridad” sino que obviamente permitirá dar el peso oportuno a aquellos hallazgos que, pese a ser estadísticamente significativos, sean clínicamente irrelevantes, y viceversa.

Sobre la endometriosis se han publicado más de 13.000 artículos recogidos en el Medline a partir de 1966, y la calidad de estos trabajos es tremendamente variable. La experiencia de los clínicos con la enfermedad también oscila en función del entorno en el

que trabajan, en quién financia el sistema sanitario en los diferentes países, en el propio interés de los clínicos en investigar esta enfermedad en sus pacientes, y en muchas variables que no podemos controlar. Es, por tanto, necesario recurrir a guías de práctica clínica, recomendaciones de las sociedades científicas, o publicaciones contrastadas para poder consensuar una forma de trabajar común basada en datos que la sustenten. De forma resumida, estas son las recomendaciones de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología.

DIAGNÓSTICO

Al margen de los síntomas de la enfermedad, que tiene un valor predictivo cuestionable al coincidir estos síntomas con otras causas y al existir un gran número de mujeres con endometriosis asintomáticas, y del diagnóstico clínico sugestivo de padecer la enfermedad, el **diagnóstico** definitivo de la enfermedad requiere una inspección **laparoscópica** de la pelvis, salvo que se observen lesiones en la vagina o en alguna otra zona (C, nivel 3). El diagnóstico **anatomopatológico** no es imprescindible si la inspección laparoscópica es adecuada, pero sería lo ideal, así como en los casos de endometriosis y de endometriosis profunda, para descartar los casos excepcionales de cáncer (GPP). La **ecografía vaginal** no sirve para diagnosticar la endometriosis peritoneal, pero sí para diagnosticar los endometriomas, así como la endometriosis vesical o del tabique rectovaginal (A, revisión sistemática). La **RMN** tiene un valor limitado frente a la laparoscopia, aunque es muy útil en el estudio del tabique rectovaginal (A, revisión sistemática). En **sangre**, el CA-125 puede estar elevado, pero no tiene utilidad diagnóstica (A, revisión sistemática).

Durante la **laparoscopia**, habría que documentar en detalle para cada lesión el tipo, su localización y su extensión así como las adherencias encontradas, y grabarlo en video/DVD (GPP). Esta laparoscopia puede realizarse cualquier día del ciclo, pero nunca durante los 3 primeros meses en los que realiza o realizó algún tratamiento hormonal para evitar errores diagnósticos (GPP). Estos datos servirán para clasificar el estadio de la enfermedad, que se correlaciona muy pobremente con el dolor pélvico, pero puede ser útil en cuanto al pronóstico y tratamiento de su infertilidad (C, nivel 3). Durante la laparoscopia, la endometriosis profunda puede pasar desapercibida y subestimar la severidad de la enfermedad (C, nivel 3).

TRATAMIENTO

El tratamiento **empírico** del dolor que se cree que es debido a una endometriosis sin un diagnóstico definitivo –laparoscopia– incluye información sobre la enfermedad, analgesia adecuada, dieta adecuada, y gestágenos solos o combinados como anticonceptivos (ACO). No está claro si los ACO se deben administrar de forma habitual, de forma continua o en ciclos de tres meses. Se puede administrar un análogo de la GnRH pero es más caro y se asocia con efectos secundarios mucho mayores incluyendo una reducción en la densidad ósea (GPP).

En el **tratamiento del dolor** asociado a la endometriosis cuando el diagnóstico ha sido confirmado podemos emplear:

a) antiinflamatorios no esteroideos, que pueden ser eficaces en reducir el dolor asociado a la endometriosis (A, nivel 1b), pero pueden causar efectos secundarios importantes como la úlcera gástrica o la alteración de la ovulación si se toman a mitad de ciclo.

b) tratamientos hormonales, ya que el suprimir la función ovárica durante 6 meses reduce el dolor (A, nivel 1a). Son todos los fármacos igual de eficaces –ACO, danazol, gestrinona, acetato de medroxi-progesterona y agonistas de la GnRH–, dependiendo su elección de los efectos secundarios y el precio. El DIU liberador de levonorgestrel puede ser útil, pero aún no existe evidencia suficiente como para recomendar su utilización. La duración del tratamiento con agonistas de la GnRH es indiferente, ya que el resultado a los 3 y a los 6 meses es igual; si se mantiene durante 2 años combinado con un estroprogestágeno parece ser eficaz y seguro en cuanto a la disminución del dolor y a proteger la densidad ósea (A, nivel 1b). Habrá que usarlo con cautela en aquellas

mujeres que aún no han alcanzado su máxima densidad ósea.

c) tratamientos quirúrgicos, que deberían llevarse a cabo al mismo tiempo que se realiza el diagnóstico, siempre que exista el consentimiento previo del paciente (GPP). No parece que el tratamiento hormonal previo a la cirugía mejore los resultados.

Frente a la laparoscopia únicamente diagnóstica, la resección de las lesiones endometriósicas –mejor que la coagulación o fulguración– junto con la sección de los uterosacos por vía laparoscópica (LUNA) reduce el dolor en casos de enfermedad mínima o moderada. Sin embargo, no parece que la sección de los uterosacos sea necesaria ya que por sí sola no tiene aporta nada en la dismenorrea asociada a endometriosis (A, 1b). En determinados casos, la neurectomía presacra puede ser útil.

En casos de enfermedad severa o profunda, la resección de todas las lesiones de forma completa mejora el dolor. Si se realiza una histerectomía, debería considerarse la salpingo-ooforectomía bilateral (GPP).

Tras la cirugía, el administrar danazol o análogos de la GnRH durante 6 meses reduce el dolor y su recurrencia entre 12 y 24 meses frente al placebo, pero el dar ACO no contribuye a la mejoría (A, 1b).

Si se realiza una ooforectomía en mujeres jóvenes, el tratamiento hormonal sustitutivo es obviamente recomendable, aunque la pauta ideal está aún por ser definida. El añadir un gestágeno tras la histerectomía puede no ser necesario, aunque protegería de las posibles lesiones residuales, pero al mismo tiempo puede incrementar el riesgo de recurrencia y de cáncer de mama (D, 4).

Un enfoque muy diferente tiene el **tratamiento de la infertilidad** asociada a la endometriosis.

a) **tratamiento de las lesiones endometriósicas**: está claro que el suprimir la ovulación no mejora la fertilidad en endometriosis mínima o leve, y no debería ofrecerse (A, 1a). Por otro lado, parece que la resección de las lesiones junto con la adhesiolisis es más eficaz que la laparoscopia diagnóstica (A, 1a), aunque estos datos parten de estudios no excesivamente numerosos y con un diseño mejorable, lo que podría cambiar las recomendaciones. No existen estudios aleatorizados que respondan a si la resección de las lesiones endometriósicas en casos de enfermedad moderada o severa mejoran la probabilidad de embarazarse. De todas formas, parece existir una correlación negativa entre el estadio de la enfermedad y la

probabilidad de gestación espontánea tras la cirugía (B, 3). En el caso concreto de los endometriomas grandes (>4cm), la quistectomía laparoscópica da mejores resultados en cuanto a gestación posterior que el drenaje y coagulación posterior. La recurrencia es mucho mayor si la pseudocápsula se coagula o vaporiza con láser en vez de extraerse (A, 1b). El tratamiento médico postquirúrgico con danazol o análogos de la GnRH no mejora las tasas de gestación (A, 1b).

b) reproducción asistida en la endometriosis - **inseminación artificial**. Parece claro que el tratamiento con inseminación artificial mejora la fertilidad en la endometriosis mínima o leve, es eficaz combinado con la estimulación ovárica, pero la utilidad de la inseminación en estas mujeres sin estimulación ovárica no está tan establecido (A, 1b).

c) reproducción asistida en la endometriosis - **fecundación in vitro**. La FIV se considera adecuada en estas pacientes, especialmente si hay compromiso tubárico, pero también si existe un factor masculino concomitante y/o si los otros tratamientos han fallado (B, 2b). Las tasas de gestación en FIV en mujeres con endometriosis son menores que las que se consiguen en mujeres con patología tubárica (A, 1a), aunque en algunos registros como el americano o el británico esto no es tan evidente.

Si la paciente presenta un **endometrioma** >4cm, se puede recomendar cirugía laparoscópica para confirmar el diagnóstico, reducir el riesgo de infección, mejorar el acceso a los folículos en la punción, pero se debe advertir del riesgo de que su reserva ovárica quede reducida después de la cirugía o incluso que pierda la función de ese ovario (GPP). La decisión debe ser individualizada en función de si la paciente ha tenido cirugía previa y si está asintomática, siendo la tendencia cada vez mayor a no operar endometriomas asintomáticos en mujeres que van a realizar un ciclo de FIV.

El tratamiento con análogos de la GnRH en la endometriosis moderada-severa previo al FIV debe ser discutido con la paciente ya que aparentemente los resultados mejoran (A, 1a).

Al tratarse prácticamente de una enfermedad crónica, las terapias alternativas pueden ser útiles en determinados casos, como por ejemplo la estimulación nerviosa eléctrica transcutánea de alta frecuencia (TENS), la acupuntura, la vitamina B1 y el magnesio, que parece que mejoran la dismenorrea, aunque no se sabe si son útiles en la dismenorrea causada por la endometriosis (D, 4).

Muchas mujeres también describen mejoría de sus síntomas con la medicina tradicional China, la flebotomía, homeopatía, etc. Aunque no existen estudios aleatorizados sobre estos temas concretos, no deberían ser descartados en aquellas mujeres que los demandan y que creen que pueden ayudar a mejorar sus síntomas, su calidad de vida y cooperar al éxito de los tratamientos convencionales.

Tabla 1

Jerarquía de la evidencia

Nivel	Evidencia
1a	Revisiones sistemáticas y metaanálisis de estudios aleatorizados y controlados (RCT)
1b	al menos un RCT
2a	al menos un estudio controlado bien diseñado no aleatorizado
2b	al menos un estudio bien diseñado, no controlado, quasi-experimental
3	estudios descriptivos, bien diseñados, no experimentales, como estudios comparativos, de correlación o series de casos
4	Informes y opiniones de comités de expertos y/o experiencia clínica de autoridades en la materia

Tabla 2

Potencia de la evidencia que se corresponde con cada nivel de recomendación

Grado	Potencia de la evidencia
A	Basada en el nivel 1 de evidencia
B	Basada en el nivel 2 de evidencia o recomendaciones extrapoladas del nivel 1
C	Basada en el nivel 3 de evidencia o recomendaciones extrapoladas del nivel 1 ó 2
D	Basada en el nivel 4 de evidencia o recomendaciones extrapoladas del nivel 1, 2, ó 3
GPP	(Good Practice Point) Buena práctica basada en los puntos de vista del grupo que desarrolla las guías de buena práctica

BIBLIOGRAFÍA

- * ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Hum Reprod 2005; 20: 2698-2704
- * www.clinicalevidence.com
- * www.nice.org.uk
- * www.rcog.org.uk
- * www.eshre.com

Cirugía y/o Reproducción Asistida en la endometriosis

Pedro-N. Barri, Buenaventura Coroleu, Olga Carreras

Departamento de Obstetricia, Ginecología y Reproducción

Institut Universitari Dexeus. Barcelona (España)

INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una enfermedad de etiología plurifactorial que compromete seriamente la fertilidad de las pacientes que la padecen. Numerosos han sido los tratamientos propuestos y aplicados para resolver la esterilidad habitualmente asociada a esta enfermedad. Sin embargo, cualquiera que sea la opción terapéutica aplicada, más de la mitad de las pacientes seguirán siendo estériles tras el tratamiento.

Este colectivo de pacientes estériles con una endometriosis residual fue ya clásicamente considerado como tributario de Técnicas de Reproducción Asistida para solucionar su problema reproductivo. La aplicación de estas técnicas a este tipo de pacientes creó una importante controversia sobre el hecho de un hipotético peor resultado en este grupo de pacientes comparándolo con otras patologías tales como la patología tubárica, el factor masculino etc. Los primeros trabajos sugerían que estas pacientes cuando se sometían a IVF tenían peores tasas de fertilización, de implantación y de embarazo (1, 2, 3). Recientemente, se ha publicado un meta-análisis (4) de varios artículos sobre este tema que evalúa 6.760 ciclos de IVF y viene a reforzar la misma hipótesis.

Sin embargo, desde el inicio de las Técnicas de Reproducción Asistida, otros grupos publicaron simultáneamente estudios que llegaban a la conclusión contraria. Es decir, las pacientes estériles con endometriosis tienen idénticas posibilidades de embarazo cuando se someten a IVF que las que tienen pacientes con otras patologías (5). Asimismo, existen amplios registros nacionales, especialmente francés y británico (6,7), que confirman que la esterilidad asociada a endometriosis es una buena indicación para aplicar Técnicas de Reproducción Asistida.

Recientemente se ha reabierto el debate sobre la eficacia comparada de la moderna cirugía endoscópica y las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) para tratar la esterilidad asociada a una endometriosis. Se plantean varios dilemas sobre la conveniencia de operar los endometriomas antes de ir a un ciclo de FIV (8-9) y sobre la utilidad de operar o reoperar las lesiones endometriósicas de pacientes con repetidos fracasos de FIV (10-13). Si la FIV constituye la última esperanza de estas pacientes es muy importante conocer y transmitirles sus reales expectativas de éxito en base a las circunstancias de cada caso (14-16).

MATERIAL Y MÉTODOS

En el Institut Universitari Dexeus, la endometriosis constituye el cuarto factor etiológico (7,7% de nuestros ciclos de FIV) para tratar a una paciente con FIV. Son más frecuentes otras indicaciones como el factor masculino (30,5%), la patología tubárica (17,5%) y la esterilidad inexplicada (8,3%).

Hemos analizado para este estudio los resultados obtenidos en pacientes de nuestro programa de FIV que fueron tratadas por los siguientes factores de esterilidad, tubárico (n=525 ciclos), masculino (n=334 ciclos), sin diagnóstico (n=450 ciclos) y endometriosis (n=328 ciclos).

El grupo de pacientes estériles con endometriosis ha sido considerado como el grupo de estudio y hemos comparado los resultados obtenidos en él con los obtenidos en las pacientes que se sometían a IVF por las otras indicaciones.

Hemos analizado también los resultados relativos a tasa de embarazo alcanzada en las 1.571 pacientes diagnosticadas de endometriosis a través de ecografía

y/o laparoscopia en nuestro Departamento en el periodo 2001-2005. Estas pacientes fueron seguidas para identificar las que tenían deseo gestacional y su edad estaba entre 25 y 40 años.

RESULTADOS

Por lo que a la edad se refiere, la mayoría de las pacientes estaban en grupos de edad similares excepto en el grupo de factor tubárico cuya edad media era más avanzada. Asimismo encontramos que los niveles basales de FSH (día 3° del ciclo) eran significativamente más elevados en el grupo de pacientes con endometriosis. Las tasas de cancelación tendían a ser más altas en el grupo de endometriosis pero sin llegar a un nivel de significación estadística (Tabla 1).

Tabla 1

Resultados de fecundación in vitro. Características demográficas

	Tubárico	Masculino	Sin diagnóstico	Endometriosis
Ciclos (n)	525	334	450	328
Edad *	36,07 ± 5	34,3 ± 4	35,5 ± 5	34,6 ± 5
FSH (mUI/ml)**	7,9 ± 4	7,5 ± 3	8,6 ± 3	9,3 ± 6
Tasa de cancelación (%)	9,5	8,4	9,1	10,7
Punciones (n)	475	306	409	293
* p<0.001				
** p<0.005				

La respuesta a la estimulación ovárica puso en evidencia notables diferencias entre el grupo de pacientes con endometriosis y los otros grupos. Nuestros datos confirman que con idéntico consumo de gonadotropinas los ciclos del grupo de endometriosis alcanzaron niveles más bajos de estradiol en el día de la administración de la HCG, se reclutaron menos folículos y se recuperaron menos ovocitos maduros (M-II) en la punción folicular (Tabla 2).

Tabla 2

Resultados de fecundación in vitro. Respuesta a la estimulación

	Tubárico	Masculino	Sin diagnóstico	Endometriosis
Dosis de Gonadotropinas	3065 ± 1303	2937 ± 1165	3096 ± 1287	3474 ± 1484
Estradiol (pg/ml) *	1673 ± 986	1889 ± 981	1744 ± 920	1537 ± 1040
Ovocitos M-II**	9,2 ± 6	10,3 ± 6	8,9 ± 5	7,9 ± 5
* p<0.001				
** p<0.02				

Por lo que se refiere a las tasas de fertilización y embarazo, no hemos encontrado ninguna diferencia entre los grupos, habiéndose mantenido todos ellos en los porcentajes habituales en nuestro programa (Tabla 3). Es importante tener en consideración que para valorar la calidad embrionaria hemos incluido no sólo los habituales scores morfológicos sino también parámetros funcionales como la tasa de implantación, la tasa de aborto y la supervivencia a los procesos de congelación y descongelación (Tabla 4).

Tabla 3

Resultados de fecundación in vitro. Respuesta a la estimulación

	Tubárico	Masculino	Sin diagnóstico	Endometriosis
Tasa Fecundación (%)	68,4	68,2	71,9	71,8
Embriones	6,8 ± 1	7,2 ± 0,9	6,5 ± 0,6	6,1 ± 1,1
Score embrionario	8,1 ± 1	8,4 ± 1	8,4 ± 1	8,2 ± 1

Tabla 4

Resultados de fecundación in vitro. Embarazo.

	Tubárico	Masculino	Sin diagnóstico	Endometriosis
Punciones (n)	475	306	409	293
Embarazo (n)	1ç	145	165	125
Tasa embarazo/punción (%)	38,7	47,4	40,3	42,7
Tasa Implantación (%)	23,7	25	24,3	28
Tasa de aborto (%)	16,3	13,8	17,6	14,4

Hemos querido analizar también los resultados de nuestro programa de cultivo prolongado para evaluar si las pacientes con endometriosis tenían peores tasa de blastocyst y tasas de embarazo más bajas con este tipo de transferencias. Nuestros resultados en el grupo de estudio han sido comparables con los obtenidos en los grupos control, evidenciándose así que la calidad embrionaria y la receptividad endometrial de estas pacientes no está alterada por la endometriosis (Tabla 5).

Considerando el abordaje global que debemos ofrecer a estas pacientes hemos analizado los embarazos obtenidos en el colectivo de 1.571 pacientes diagnosticadas de endometriosis en el periodo 2001-2005. A efectos de la validación de los resultados hemos incluido solo las pacientes con edades comprendidas entre 25 y 40 años que tuvieran deseo gestacional.

El tratamiento laparoscópico fue la primera etapa terapéutica en 483 pacientes (30,7%) y de éstas, 260 deseaban una gestación (53,6%). En este grupo se obtuvieron 141 embarazos (54,2% de las pacientes que deseaban gestación). Es interesante tener en cuenta el

Tabla 5
Criiotransferencias

	Tubárico	Masculino	Sin diagnóstico	
Endometriosis				
Ciclos	119	75	95	51
Supervivencia (%)	69	76	80	90
Embarazos (n)	29	20	23	13
Emb/criotransfer (%)	24	26	24	25

tiempo medio transcurrido hasta obtener la gestación que fue de 11,2 meses (1-66 m).

Entre las pacientes que no consiguieron un embarazo, 72 pasaron a FIV y llevaron a cabo 92 punciones foliculares obteniéndose 28 embarazos (30,4% embarazo/punción). También acudieron a FIV 110 pacientes diagnosticadas de endometriosis que rehusaron la cirugía. Estas pacientes se sometieron a 139 punciones foliculares consiguiendo 41 embarazo (29,4% embarazo/punción).

Es interesante conocer el efecto de la edad de la paciente sobre el rendimiento de las dos opciones terapéuticas. Así, vemos que el 62,2% las pacientes de ≤ 34 años que se operaron consiguieron un embarazo y lo hicieron en un tiempo medio de 12,5 meses (1-66). Las pacientes de ≥ 35 años que fueron intervenidas consiguieron una tasa de gestación del 30,8% en un plazo medio de tiempo de 6,6 meses (1-14 m). En las pacientes que pasaron a FIV, pudimos observar que las pacientes de ≤ 34 años alcanzaban tasas de embarazo más altas que las de ≥ 35 años tanto si hacían FIV como primera opción (21/64 - 34,4% v.s. 6/30 - 21,4%) como si llegaban directamente a FIV sin someterse a cirugía previa (28/173 - 38,4% v.s. 13/66 - 19,7%).

DISCUSIÓN

En la actualidad existe suficiente información científica para intentar clarificar ideas y conceptos sobre el posible rendimiento que presentarán las pacientes estériles afectas de endometriosis cuando son sometidas a técnicas de fecundación in vitro.

Es evidente que estas pacientes que han sufrido frecuentes intervenciones quirúrgicas en sus ovarios para extirparles quistes endometriósicos, ven reducido su pool de folículos ováricos aptos para ser reclutados en un ciclo de estimulación de la ovulación.

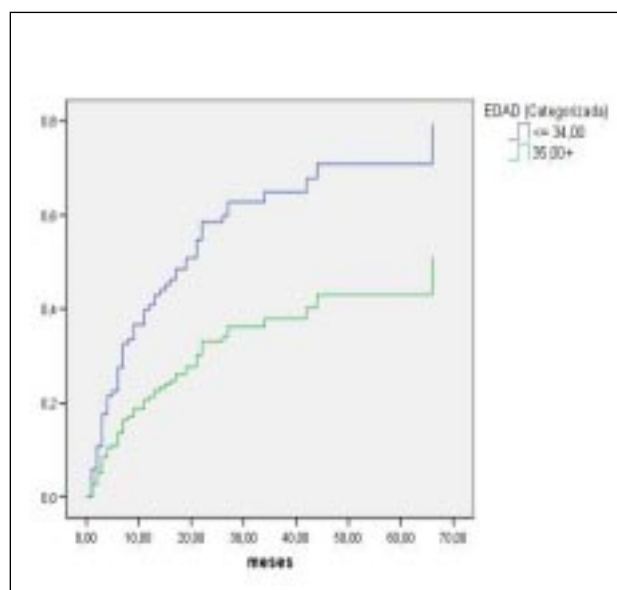
Al igual que sucede en nuestra serie son numerosos los artículos que indican que estas pacientes deben ser tratadas con fecundación in vitro si transcurre

más de un año desde la intervención quirúrgica y no se ha producido el embarazo (12-14).

Se admite también que aunque no hayan sufrido ninguna intervención quirúrgica, las pacientes con endometriosis tienen una peor reserva ovárica y tienden a responder peor a los protocolos de estimulación habituales, es decir existe un cierto consenso para aceptar que la fisiología folicular de estas pacientes está alterada y sea cual sea el estadio, es probable que necesiten mayor estimulación y que produzcan menos ovocitos (16). Por este motivo, muchos de los estudios que presentan peores resultados en el grupo de endometriosis los atribuyen más a la reducción del número de ovocitos disponibles que a la disminución de las tasas de fertilización o a problemas sistémicos tales como el potencial compromiso autoinmune que pueden presentar estas pacientes.

Tampoco se confirma en nuestro estudio la existencia de una menor calidad embrionaria y una peor capacidad de implantación. Muestras de embarazo clínico evolutivo, de implantación y de aborto son normales y totalmente comparables con las obtenidas en otras indicaciones. Otra variable que se acepta en la actualidad es la ausencia de relación existente entre el estadio de la enfermedad, la posible existencia de endometriomas y la tasa final de embarazo alcanzada (17-19). Cabe pensar por consiguiente que el potencial de los ovocitos y embriones de estas pacientes debe ser considerado normal. Finalmente, su normal

Tabla 6
Influencia de la edad e la tasa de embarazo tras cirugía de la endometriosis



capacidad de implantación se pone de relieve cuando estas pacientes reciben ovocitos donados e implantan correctamente e igual que pacientes afectas de otras patologías (20).

Como conclusión me gustaría enfatizar que en nuestra opinión las pacientes estériles que sufren una endometriosis que no quedan gestantes tras cirugía, son tan buenas candidatas para ser sometidas a IVF como las pacientes con esterilidades de cualquier otro origen. Por otra parte, aunque tuvieran realmente un peor pronóstico en IVF, ¿dejaríamos de aceptarlas en los programas de IVF cuando ésta es indiscutiblemente su última posibilidad terapéutica para conseguir un embarazo? Creo que nuestro deber es informar adecuadamente a las pacientes acerca de las opciones adecuadas y de las posibilidades de éxito esperables en su caso.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Simon C, Gutiérrez A, Vidal A, et al.:** Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in vitro fertilization and oocyte donation. *Hum. Reprod.* 1994; 9-4: 725-9.
2. **Arici A, Oral E, Bukulmez O, et al.:** The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University IVF-ET program. *Fertil-Steril.* 1996; 65-3: 603-7.
3. **Hull M, Williams JAC, Ray B, et al.:** The contribution of subtle oocyte or sperm dysfunction affecting fertilization in endometriosis-associated or unexplained infertility: a controlled comparison with tubal infertility and use of donor spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13-7: 1825-30.
4. **Barnhart KT, Dunsmoor R, Coutifaris C.:** The effect of endometriosis on IVF outcome. *Fertil Steril.* 2000; 74-3.Suppl 1 Abstract O-203.
5. **Barri PN, Coroleu B, Martínez F, et al.:** IVF and endometriosis. Abstract Book of the XIV IFFS World Congress. Caracas. 1992; Ed. O. Rodríguez-Armas.PS-2. Pag 8.
6. **FIVNAT: Bilan FIVNAT 1995;** *Contracept. Fertil. Sex.* 1996; 24-9: 694-9.
7. **Templeton A, Morris JK, Parslow W.:** Factors that affect outcome of in-vitro fertilization treatment. *The Lancet.* 1996; 348-November 23: 1402-6.
8. **García Velasco J, Mahutte NG, Corona J, et al.:** Removal of endometriomas before IVF does not improve fertility outcomes. A matched, case-control study. *Fertil. Steril.* 2004; 81-5: 1194-7.
9. **Somigliana E, Vercellini P, Vigano P, et al.:** Should endometriomas be treated before IVF-ICSI cycles. *Hum. Reprod. Update,* 2005; 12-1: 57-64.
10. **Littman E, Giudice L, Lathi T, et al.:** Role of laparoscopic treatment of endometriosis in patients with failed IVF cycles. *Fertil. Steril.* 2005; 84-6: 1574-8.
11. **Nezhat C, Littman E, Lathir R, et al.:** The dilemma of endometriosis: Is consent possible with an enigma. *Fertil. Steril.* 2005; 84-6: 1587-8.
12. **Adamson G.D.:** Laparoscopy, IVF and endometriosis: an enigma. *Fertil. Steril.* 2005; 84-6: 1582-4.
13. **The practice committee of the ASRM:** Endometriosis and infertility. *Fertil. Steril.* 2005; 81-5: 1441-6.
14. **Aboulghar M, Mansour RT, Serour G, et al.:** The outcome of IVF in advanced endometriosis with previous surgery: A case-controlled study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003; 188: 371-5.
15. **Marconi G, Vilela M, Quintana R, et al.:** Laparoscopic ovarian cystectomy of endometriomas does not affect the ovarian response to gonadotropin stimulation. *Fertil. Steril.* 2002; 78-4: 876-8.
16. **Pabuccu R, Onalan G, Goktolga U, et al.:** Aspiration of ovarian endometriomas before ICSI. *Fertil. Steril.* 2004; 82-3: 705-11.
17. **Olivennes F, Feldberg D, Liu HC, et al.:** Endometriosis: a stage by stage analysis-the role of in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 392-8.
18. **Al-Azemi M, López Bernal A, Steele J, et al.:** Ovarian response to repeated controlled stimulation in in vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum. Reprod.* 2000; 15-1: 72-5.
19. **Geber S, Paraschos T, Atkinson G, et al.:** Results of IVF in patients with endometriosis: the severity of the disease does not affect the outcome, or the incidence of miscarriage. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 1507-11.
20. **Díaz I, Navarro J, Blasco L, et al.:** Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil. Steril.* 2000; 74-1: 31-4.

Criopreservación de ovocitos y tejido ovárico

Ana Cobo, María Sánchez

Instituto Valenciano de Infertilidad- IUIVI, Universidad de Valencia

CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO

La supervivencia después del cáncer es cada vez mejor, sin embargo, y a pesar de que se han realizado grandes esfuerzos en el área de la preservación de la fertilidad, aun no se ha encontrado la solución ideal para proteger la función gonadal de la agresión que representa la terapia contra el cáncer. La incidencia del cáncer infantil está aumentando, a la vez que aumenta la esperanza de vida después del cáncer. Uno de cada 650 niños desarrollará un cáncer y actualmente, 75-80% de los niños con cáncer sobrevivirá tras 5 años del diagnóstico [1]. En el año 2010, uno de cada 250 jóvenes entre 20 y 29 años será superviviente de un cáncer en su infancia [2]. De esta manera, el número de mujeres jóvenes supervivientes al cáncer está creciendo y por tanto, la demanda de alguna solución encaminada a preservar la fertilidad a pesar del tratamiento oncológico. El efecto sobre los ovarios consiste en la aparición de un fallo ovárico precoz (FOP), consecuencia de la sensibilidad de los ovarios a los quimioterápicos (especialmente a los agentes alquilantes) y a las radiaciones ionizantes. La gonadotoxicidad producida por estos tratamientos está relacionada directamente con la edad, el agente terapéutico y las dosis administradas y se estima que el 42% de las niñas y mujeres jóvenes que recibe quimioterapia y/o radioterapia desarrolla un fallo ovárico precoz antes de los 30 años [3, 4]. Las distintas estrategias proteger y conservar la función ovárica en pacientes oncológicas incluyen el uso de análogos de la GnRH, la trasposición quirúrgica de los ovarios, la criopreservación de ovocitos maduros e inmaduros, la criopreservación de embriones y la criopreservación de tejido ovárico [5]. De todas éstas, la criopreservación de embriones es la única opción clínica-

mente establecida con buenos resultados ya que se consiguen tasas de recién nacidos vivos similares a las obtenidas con embriones frescos. Sin embargo, la congelación de embriones en niñas y adolescentes no está indicada, además, en mujeres sin pareja sería necesario el uso de semen de donante, lo que aún genera cierta controversia, entre otras razones porque el pronóstico del cáncer sigue siendo incierto para cada caso. Otro inconveniente, tanto para la congelación de ovocitos como para la de embriones, es la necesidad de la estimulación ovárica, en la que es necesario el uso de gonadotropinas, que, por otra parte, está contraindicado en neoplasias hormonodependientes. Además, hace falta tiempo hasta conseguir una respuesta ovárica adecuada, y en muchos casos se debe priorizar el inicio de la terapia oncológica.

La congelación de tejido ovárico, ofrece la posibilidad de restablecer la función ovárica hormonal, lo que no sucede con la congelación de ovocitos o embriones.

Así, la congelación de corteza ovárica, representa la mejor opción posible en niñas, adolescentes, mujeres sin pareja en las que no esté indicado el uso de semen de donante, en los casos en los que esté contraindicada la estimulación ovárica y en aquellos casos en los que no haya tiempo suficiente para dicha estimulación [6].

El tejido cortical ovárico, una vez descongelado, puede trasplantarse ortotópicamente (en su locus natural) y/o heterotópicamente (en cualquier otra localización), pero el trasplante ortotópico ofrece una gran ventaja, la posibilidad de alcanzar una maternidad natural. En el año 2002 nuestro grupo inició un proyecto de investigación para desarrollar la técnica de decorticación ovárica y trasplante ortotópico, dicho trasplante se llevó a cabo en fresco en 12 mujeres de entre 37 y 45 años, con indicación de histerectomía

simple por patología uterina benigna (REF Sánchez Cuadernillo). Las pacientes fueron sometidas a selección de corteza ovárica, previa comprobación del status hormonal basal (Estradiol y FSH en suero, entre el segundo y el quinto días del ciclo) y de la existencia de ovulación (Progesterona en suero entre los días 22 y 24 del ciclo) y administración de anovulatorios en el ciclo previo a la cirugía. En el protocolo operatorio, se procedió a la resección de la corteza del ovario izquierdo. Para el procesamiento, se procedió a la eliminación de restos de médula, sangre o cualquier otra impureza, y se cortaron en láminas de 1mm de espesor aproximadamente. Una muestra se remitió al laboratorio de Anatomía Patológica para su evaluación. El resto se conservó en el medio de cultivo Ham.s F10 hasta su trasplante. A continuación se procedió a la resección y procesamiento de la corteza del ovario derecho del mismo modo que en el ovario izquierdo. Las láminas se sumergieron en solución crioprotectora y se procedió a la congelación de las mismas. A continuación, se realizó la aplicación de la/s lámina/s de la corteza del ovario izquierdo sobre el lecho medular del ovario derecho. Finalmente, se realizó histerectomía simple, manteniendo el flujo sanguíneo que llega a los ovarios. Siempre que no exista contraindicación técnica se criopreservará la corteza del ovario derecho por su aporte vascular más directo que el izquierdo desde los grandes vasos.

El seguimiento post-operatorio se realizó mensualmente durante un año y cada dos meses durante el segundo año. Asimismo realizamos el seguimiento a un grupo control de 5 mujeres de las mismas edades, sometidas a histerectomía simple. Los resultados obtenidos fueron: en once de los doce casos (91,7%) y en cuatro de los cinco controles (80%) ($p=0,642$) pudimos detectar ovulaciones (mediante ecografía vaginal y niveles de Progesterona $\geq 5\text{ng/ml}$). Los diferentes patrones de los niveles séricos de FSH quedan reflejados en la Figura 1. En el patrón 1 (5 casos, 41,7%) se mantienen los niveles basales normales de FSH de forma comparable a los controles, mientras que el típico patrón 2 de incremento de FSH tras la cirugía y posterior disminución hasta niveles $<20\text{ mIU/mL}$ tras 240 días (2A) y 150 días (2B) se observó en 6 casos (50%); desafortunadamente en 2B (2 casos) se produjo después una elevación alcanzando niveles menopáusicos. Solo un caso (patrón 3) mostró una elevación de FSH desde la cirugía reflejo del cese de la función ovárica

Respecto a la sintomatología climatérica, incluso en el caso de elevación mantenida de FSH los síntomas referidos por las pacientes han sido hasta la fecha escasos y nunca de suficiente entidad como para

decidir someterse al autotrasplante del tejido ovárico congelado. Tan solo una paciente, de 48 años, precisó terapia hormonal sustitutiva pero discontinuó su uso por remisión de la sintomatología y esta no volvió a presentarse.

Este protocolo se diseñó especialmente para minimizar la isquemia. Dos factores principales se han relacionado con la pérdida folicular que se produce en el trasplante de tejido ovárico tras congelación/descongelación; los propios procesos asociados a la criopreservación y la isquemia/reperfusión asociada al trasplante. Parece, sin embargo, que es la isquemia el factor principal, ya que la pérdida folicular atribuible al daño por la criopreservación no es estadísticamente significativa si se compara con la producida en el tejido trasplantado en fresco [7].

Respecto al lugar de reimplante nuestra elección es la propia médula ovárica por diferentes razones relacionadas con la disminución de la isquemia o el daño producido por la misma. El mantenimiento del flujo vascular está asegurado por la arteria ovárica. Además existen diversas evidencias que apuntan al trasplante ortotópico de corteza ovárica como técnica de elección: la decorticación ovárica, manteniendo in situ la médula, permite conservar inalterada la red neuronal simpática y sensitiva que acompaña a los vasos del hilio ovárico y que tiene un efecto antiapoptótico a nivel folicular. La médula además se cree que juega un papel en el desarrollo folicular [8, 9] y la esteroidogénesis [10]. Con la aplicación de técnicas muy similares han sido publicados nacidos vivos tras gestación espontánea tras autotrasplante de fragmentos de corteza ovárica descongelada en una mujer con FOP producido por el tratamiento de enfermedad de Hodgkin [11], tras trasplante en fresco de dos tercios de la corteza ovárica entre hermanas gemelas monocigóticas una de las cuales había presentado un FOP [12] y tras FIV después de autotrasplante de tejido congelado también en una paciente con FOP por quimioterapia [13].

En Resolución de 1 de febrero de 2005 de la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana se concedió la acreditación para la actividad de Extracción e Implante de Tejido Ovárico Autólogo al Hospital Doctor Peset Aleixandre. De forma simultánea se creó un Banco de Tejido Ovárico en el Centro de Trasfusión de la Comunidad Valenciana (REF Sánchez Cuadernillo).

Desde la puesta en marcha de este programa 58 mujeres han sido intervenidas según protocolo descrito. Se ha practicado Resección unilateral de la corteza ovárica, preferentemente derecha. El procesamiento

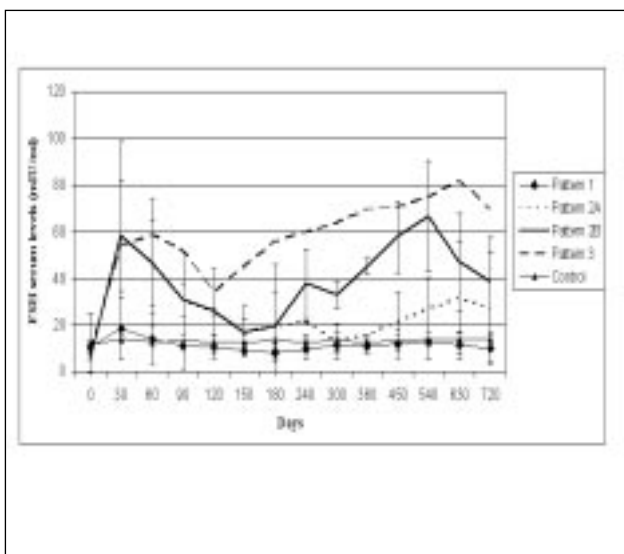


Figura 1

Niveles de FSH a lo largo del seguimiento de dos años en pacientes sometidas a auto-trasplante en fresco de corteza ovárica

del tejido ovárico se lleva a cabo en el Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

El tiempo transcurrido desde la obtención del tejido hasta el inicio de su manipulación para el almacenamiento (tiempo de isquemia) no debe superar las 24 horas, tiempo durante el cual las muestras deben permanecer en unas condiciones de temperatura entre 2 y 6°C.

De las 58 mujeres intervenidas, 52% tienen 30 años o más en el momento de la cirugía. El motivo más frecuente por el que se someten las pacientes al protocolo de congelación de corteza ovárica es el cáncer de mama (44%), seguido por la Enfermedad de Hodgkin (25%). Entre el resto de indicaciones destacan: el cáncer de ovario, sarcomas de diferente localización, cáncer de colon, leucemia, patología ovárica benigna y LES. Cabe destacar que el 50% de las pacientes ya han recibido algún tipo de tratamiento antineoplásico antes de la cirugía.

Una vez las pacientes se encuentren libres de enfermedad, su oncólogo lo considere oportuno y presenten FOP las pacientes se someterán a una nueva cirugía, en la que se realizará un implante de la corteza descongelada sobre la médula del ovario que se dejó intacto, previa resección de su corteza.

CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS

La población que se puede beneficiar con la criopreservación de ovocitos es bastante amplia. Como ya se ha mencionado, esta técnica es otra alternativa

para preservar la fertilidad en mujeres con cáncer que han de someterse a terapia oncológica, aunque en estos casos su utilización se ve restringida por el tipo de cáncer y porque el inicio del tratamiento oncológico es casi siempre inminente. La congelación de ovocitos también puede ser una indicación, en las mujeres que por múltiples motivos, entre los que podemos citar edad avanzada, falta de pareja, situación laboral o socio-económica, deseen preservar la fertilidad para circunstancias futuras. Por otra parte, la creación de bancos de ovocitos será una valiosa alternativa para el tratamiento de mujeres con problemas de anovulación ya que su almacenamiento en bancos, permitirá una mayor rapidez, eficiencia y seguridad para las receptoras de los programas de ovo-donación. La disponibilidad inmediata de ovocitos que hayan cumplido un tiempo de cuarentena, de manera semejante a lo que ocurre con los bancos de semen, hará innecesaria la sincronización entre donante y receptora, simplificando considerablemente el funcionamiento de los programas de ovo-donación. Además, de esta manera se logrará reducir en gran medida las cada vez más largas listas de espera.

Finalmente la congelación de ovocitos se puede plantear como solución al problema que genera la congelación de embriones “sobrantes” de los programas de reproducción asistida. Rutinariamente, en los centros de Fecundación in vitro, se produce un número considerable de embriones que finalmente no son transferidos y tienen que almacenarse para su posterior utilización. En un alto porcentaje de los casos, estos embriones no son reclamados por sus progenitores haciendo que el número de embriones “abandonados” en los bancos de almacenamiento, sea cada vez mayor. El destino de estos embriones es variado: pueden ser donados a otras parejas, donados a investigación o descartados. Cualquiera de estas opciones origina controversia y obliga a disquisiciones de tipo ético y por supuesto legal. La congelación de ovocitos es una excelente alternativa a la congelación de embriones, ya que reduce la creación de los mismos y por tanto su almacenamiento.

Históricamente, la congelación de ovocitos ha sido mucho menos eficiente que la de embriones. Existen varias razones que justifican estas diferencias. En primer lugar, la arquitectura de la célula juega un papel primordial. El ovocito está altamente especializado para la única función de generar un nuevo individuo; por consiguiente, posee numerosas características únicas. Su gran tamaño (diámetro total es de 150 µm), indica que el ovocito es una célula con un área y volumen superiores si comparamos con células somáticas o con el gameto masculino. Esta

característica hace que el intercambio a través de la membrana que ocurre durante el proceso de congelación sea mucho más complejo ocasionando serios problemas que afectan viabilidad post descongelación. Fruto del intenso trabajo en el área de criopreservación de ovocitos se han logrado solucionar diferentes problemas producidos en los ovocitos congelados, como son el endurecimiento de la zona pelúcida que ocasionó bajas tasas de fecundación y la liberación prematura de los gránulos corticales, principal responsable de altos índices de poliespermia [14-16].

En la actualidad, los focos de interés por parte de la comunidad científica con respecto a la congelación de ovocitos, son el estudio de la recuperación de los husos meióticos tras la descongelación y por otra parte la mejora de las tasas de supervivencia, con protocolos más simplificados y medios de congelación más inocuos.

En el ovocito en metafase II (MII) los cromosomas están circunscritos al huso, y sin la presencia de la membrana nuclear, lo que puede considerarse como un estado relativamente inestable. El huso meiótico, es una estructura del citoesqueleto compuesta por microtúbulos, los que presentan una gran capacidad de responder rápidamente a diferentes cambios fisiológicos mediante mecanismos de ensamblaje y desensamblaje de sus fibras [17]. Las alteraciones del huso meiótico, ocasionadas por la exposición a los crioprotectores y/o la temperatura, están bien documentadas [18-20]. Varios estudios demuestran que el huso meiótico puede re-polimerizarse correctamente tras la descongelación [17, 20-23].

En una revisión de 16 artículos publicados desde 1994 hasta el 2005, en los que se estudia la recuperación de husos meióticos de ovocitos humanos, congelados por diferentes métodos, la cifra de husos morfológicamente normales es de 72.7% con 67.1% de placas metafísicas compactas y sin dispersión cromosómica. Estas cifras fueron de 87.2% y 83.4% respectivamente para los controles. En los últimos años se ha prestado especial atención a la dinámica de la recuperación de los ovocitos descongelados con relación al tiempo que pasan en cultivo a 37°C tras la descongelación, encontrando una relación entre estos dos parámetros. Así, con la observación inmediata de los ovocitos descongelados la proporción de ovocitos con husos re-polimerizados es tan sólo del 5%. Si los ovocitos permanecen entre 1-2h en cultivo, esta cifra sube a un 76%, alcanzándose la máxima recuperación (93% de husos morfológicamente normales), a las tres horas de cultivo [22]. En nuestra experiencia, la

recuperación de husos normales tras 3 horas de cultivo in vitro es de 78,2%, con 89,4% de placas metafísicas compactas y en el ecuador del huso. Estas cifras fueron de 80,6% y 85,7% para los controles. No obstante, no sabemos si la re-polimerización de huso meiótico va ligada a un correcto funcionamiento del mismo. En este sentido es imprescindible la realización de estudios que analicen la constitución cromosómica de los embriones generados a partir de ovocitos congelados. Existen pocas publicaciones que informen sobre este aspecto [24, 25]. En el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), en colaboración con el Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Perugia (Italia), hemos realizado un estudio en el que se utiliza la técnica de hibridación in situ fluorescente para el análisis cromosómico de embriones generados a partir de ovocitos criopreservados [24]. La proporción de embriones anormales tras la descongelación y microinyección de ovocitos de donante fue del 28.6%, comparable con el 26% observado en el grupo control, formado por embriones procedentes de pacientes incluidas en nuestro programa de diagnóstico preimplantacional por enfermedades ligadas al sexo. Estos resultados sugieren que, en principio, con la criopreservación de ovocitos no existe un riesgo de generación de embriones cromosómicamente anormales superior al de una población control, no obstante es preciso continuar con esta línea de trabajo, antes de elaborar conclusiones definitivas.

En cuanto a la mejora de las tasas de supervivencia, cabe destacar que se ha venido trabajando intensamente en las últimas dos décadas, tanto en la mejora de los métodos de congelación lenta como en la vitrificación. En el método de congelación lenta, se han introducido variantes entre las que podemos mencionar la inyección intra-citoplasmática de trealosa previo a la congelación [26, 27], el incremento de la concentración de sacarosa en el medio de congelación [28], o la sustitución de sodio por colina en el medio base [29]. De éstas alternativas, las dos últimas han sido probadas con éxito, consiguiéndose recién nacidos vivos sanos (Tabla 1).

Por otra parte, la utilización de colina en el medio de congelación, en lugar de sodio, tiene por objeto minimizar el efecto de soluto durante la congelación-descongelación, ya que la membrana del ovocito no es permeable a la colina, y por tanto, la concentración intracelular de electrolitos no se verá incrementada durante el proceso [30]. También es probable que la colina no sólo ejerza su poder benéfico modificando el balance de sodio, si no también por un efecto esta-

Tabla 1
Resultados clínicos del método lento, con diferentes modificaciones

Referencia	Método	Nº Ovo.	SV %	Fec.%	Gestación N(%)	Impl.%	Aborto N(%)	RNV
Porcu et al 2000	Lento 0,2M sac.	Descong. 1502	54,1	57,7	16/92(17,4)	?	?	14
Winslow et al 2001	0,2M sac.	324	68,5	80,8	11/42(26,2) (8U,3G)	13,5	1(11)	16
Yang et al 2002	0,2M sac	112 (donante)	70,9	86,4	11/24(45,8)	25,3	?	14
Chen et al 2002*	0,3M sac	8	100	57	si	25,3	-	En curso
Quintans et al 2002	0,1M sac _Na,_Colina	?	63	59	6	25	4	2+1 En curso
Bataglia et al 2003*	0,3M sac	20	50	89	si	66,6	-	En curso
Fosas et al 2003	Lento 0,3M Sac	88 (donante)	89,	73,4	4/7 (57.1) (3U,1G)	19,2	-	5
Boldt et al 2003	0,2M sac. _Na,_Colina	90	74,4	59	4/11(36,4) (3U,1G)	16,6	?	?
Azambuja et al 2005	0,1M sac _Na,_Colina	276	62.3	69,2	8(25)	?	3(27,6)	En curso
Jain et al 2005	0,3M sac _Na,_Colina	103	71	66	5/9(56)	26,7	-	En curso
Chen et al 2005*	Lento 0,3M Sac.	159	75	67	7/21(33)	11	-	4+3 En curso
Levi Setti et al 2006*	Lento 0,3M Sac.	2900	69,9	67,5	18/145(12,4)	5,7	6(33)	13
Borini et al 2006	Lento 0,3M Sac	927	74,1	76	18/185(9,7)	5,2	3(14,2)	4+ 11 ongoing

*Case Rreport . U= Gestación única; G= Gestación gemelar

bilizador directo sobre las membranas celulares, ya que la colina es un componente de los fosfolípidos de las mismas [29, 31, 32].

Las publicaciones realizadas en 1998 por Stachecki y col. [30, 32] ilustraron el efecto de la sustitución de sodio por colina con ovocitos de ratón. Estos autores, obtuvieron no solo mejores tasas de supervivencia en medio de congelación con sustituto de colina, si no también mejor fecundación y desarrollo a blastocisto. Fue así como del resto de la comunidad científica empezó a interesarse por los efectos benéficos del uso de colina en el medio de congelación (Tabla 1). Así, en el 2002 se publica el primer recién nacido vivo en la especie humana con este tipo de medio de congelación. En los años siguientes se han publicado otros estudios que informan acerca de gestaciones conseguidas con esta modificación de la técnica (Tabla 1).

Por otra parte, la vitrificación como otra técnica de criopreservación de ovocitos, ha venido ganando cada vez mas adeptos, especialmente durante los últimos tres años. Esta es una técnica de congelación ultra-rápida en la que no ocurre la formación de cristales; en su defecto, el material solidificado toma una

consistencia vidriosa; de ahí el nombre que recibe. Durante la vitrificación, el líquido se torna cada vez mas viscoso hasta que las moléculas quedan inmobilizadas, la muestra deja el estado líquido y adquiere propiedades de sólido [33]. La ausencia de cristalización, se consigue gracias al uso de altas concentraciones de crioprotectores y a las altas velocidades de enfriamiento [34], para lograr este objetivo, existe una concentración crítica de crioprotector [35]. Inevitablemente, el uso de crioprotectores a tan elevada concentración, trae consecuencias biológicas, no sólo por toxicidad química si no también osmótica, por el llamado efecto "chilling" [36]. Este efecto es proporcional a la concentración de crioprotector, por tanto a menos crioprotector, menor daño celular, aunque, resulta evidente que la concentración de crioprotector debe ser la idónea para que ocurra vitrificación y no congelación. Para conseguir este objetivo, existen varias estrategias como son incrementar la velocidad del proceso, disminuir la concentración de crioprotector a niveles compatibles con el fenómeno de la vitrificación y disminuir el volumen en el que se vitrifican las muestras. El incremento en la velocidad

del proceso ofrece la ventaja de reducir el estrés osmótico que causa la alta concentración de crioprotector. Utilizando velocidades de 15000 a 30000 °C/min, por ejemplo tras inmersión directa en nitrógeno líquido (-196°C), de muestras tratadas con altas concentraciones de crioprotector a 25°C, se logran velocidades de 221°C/seg o 26520°C/min [35, 36]. Con respecto a la desvitrificación, los experimentos que han dado mejores resultados, son aquellos en los que se llevan las muestras de -196°C directamente hasta 37°C con lo que se alcanzan velocidades de 233°C/seg o 4460°C/min [37].

Con las pajuelas convencionales de 0,25ml el límite de velocidad de vitrificación/desvitrificación es <2000°C/min, resultando claramente insuficiente [36]. Además, un estudio reveló que tras la vitrificación de ovocitos de ratón en estas pajuelas convencionales, se presentan serias alteraciones en el huso meiótico [38]. Disminuyendo el volumen de la muestra, utilizando sistemas de soporte de mínima capacidad ($\approx 1\mu\text{l}$), se pueden lograr las velocidades deseadas. Para este fin, se han diseñado una variedad de sistemas de soporte. Entre estos encontramos, rejillas de microscopia electrónica (EM) [39, 40], pipetas para decumular (FDP) [41], bucles de nylon (cryoloops) [42-44], rejillas de nylon [45] y microgotas [46] pajuelas plásticas estiradas (OPS y CPS) [37, 38, 47]. Todos ellos se han utilizado con mayor o menor éxito en diferentes especies de mamífero, incluyendo la humana. El sistema OPS, del inglés "open pulled straw", desarrollado por Vajta y col. [36] consiste en la utilización de pajuelas convencionales estiradas manualmente tras la aplicación de calor. Los primeros experimentos con OPS se realizaron con ovocitos de bovino, en los que se consiguieron gestaciones [36]. La gran desventaja de este sistema, es el riesgo potencial de contaminación del material por contacto directo con nitrógeno líquido [48]. Todos los demás sistemas abiertos como EM, cryoloops, rejillas de nylon etc. presentan este mismo inconveniente. En el 2001 Chen y su grupo, publicaron un estudio en el que modificaron el sistema de carga del OPS, al que llamaron CPS, del inglés "closed pulled straw" [47]. El CPS tiene las mismas características del OPS, en cuanto a rápida transmisión de los cambios de temperatura, pero gracias al método de carga de las muestras, éstas quedan aisladas del medio externo. En el estudio con ovocitos de ratón publicado por Chen [47], se comparan las tasas de supervivencia y recuperación morfológica de husos meióticos al vitrificar con CPS, OPS, EM y pajuelas convencionales. Este estudio demostró que el sistema CPS ofrece tasas de supervivencia del 79% y un 90% de recuperación de

husos normales, siendo éstos resultados más ventajosos que los obtenidos con los otros sistemas. Recientemente Kuwayama et al ha diseñado un nuevo dispositivo (Cryo-top) en el que el volumen que contiene las muestras se ha reducido aún más (volúmenes inferiores a 0.1 μl) [49]. La experiencia de este grupo y otros con el uso del cryotop en humanos ofrece muy buenos resultados (Tabla 2). De nuevo, el gran inconveniente de este sistema es que los ovocitos entran en contacto directo con el nitrógeno líquido. Muy recientemente se ha introducido en el mercado un sistema llamado Cryo tip™, cuya principal ventaja es que es un sistema cerrado. Este dispositivo, basado en su antecesor CPS, consiste en un capilar plástico de un diámetro interno de $\approx 200\mu\text{m}$, que permite vitrificar las muestras en un volumen de $\sim 1\mu\text{l}$ de medio, con la ventaja de está preparado para sellar con calor en los dos extremos, de tal manera que las muestras quedan completamente aisladas del exterior. Los primeros resultados obtenidos en humanos con este sistema, han sido publicados hace muy pocos meses por Kuwayama et al [50]. Según estos datos el Cryo tip™ aporta una solución práctica y simple para resolver el problema de la hipotética contaminación por contacto directo con nitrógeno líquido, ofreciendo muy buenos resultados, comparables a los obtenidos con el Cryo-top. El Cryo tip™ se ha empezado a comercializar muy recientemente en Europa. A la luz de los datos de que disponemos actualmente, este sistema parece ser una alternativa bastante eficaz ya que permite obtener excelentes resultados con un sistema cerrado de vitrificación. Si embargo, es necesario reunir más datos acerca de los resultados, con el fin de afianzar esta nueva tecnología en el campo de la criobiología y lograr así su incorporación definitiva a la clínica.

Finalmente, no cabe duda de que se han conseguido importantes mejoras en los resultados obtenidos con la congelación de ovocitos. La experiencia acumulada desde que se consiguió la primera gestación en 1988, se refleja en los cerca de 200 nacidos vivos sanos que se cuentan actualmente en todo el mundo, lo que indica que con esta técnica es posible la recuperación de ovocitos intactos tanto fisiológica como cromosómicamente. No obstante, es necesario definir otros alcances de esta técnica, como el rendimiento por ciclo estimulado, y definir la proporción de embriones cromosómicamente normales.

En Resolución de 2 de Julio de 2004 y conforme a lo dispuesto en el Real Decreto 120/2003, de 31 de Enero; la Comisión Nacional de Reproducción Asistida, concedió el informe favorable al "Proyecto de Experiencia Controlada de Fecundación de

Tabla 2
Resultados clínicos de la vitrificación con diferentes sistemas de carga

Referencia	Sistema vitrificación	Nº Ovo Desvit.	SV %	Fec.%	Gestación N(%)	Impl.%	Aborto N(%)	RNV
Kuleshova et al 1999*	OPS	17	65,0	45,5	si	100		1
Yoon et al 2000	rejillas. ME	90	63,3	43,3	3/7 (42,9)	9,3		2+ 1 En curso
Yoon et al 2003	rejillas. ME	474	68,6	71,7	6/28 (21,4) (5U,1G)	6,4		7
Katayama et al 2003*	Cryo-top	7	100	100	2(100)	29,2		2
Ruvalcaba et al 2005§	Cryo-top	60	76,6	82,6	8(80,0)	32,3	50,0	4
Chian et al 2005§	Cryo-leaf	180	93,9	74,6	7(46,7)	20,4		En curso
Kyono et al 2005*§	Cryo-top	5	100	100	si	100		1
Kuwayama et al 2005	Cryo-top	64	91	89,6	12(41,4)	?	16,6	7+3 En curso
Cha et al 2005§	rejillas. ME de oro + slush LN ₂	216	80,1	82,7	7(38,9)	13,1		En curso
Kim et al 2005§	rejillas. ME	233	70,8	38,8	7(58,3)	24,5	28,6	4 + 3 En curso
Lucena et al 2005	Cryotop	159	89,9	87	13(57)	?		En curso

*Case Report . U= Gestación única; G= Gestación gemelar; §Comunicaciones presentadas en ASRM 2005

Ovocitos Previamente Congelados” presentado por el Instituto Valenciano de Infertilidad. En Resolución de 6 de Mayo de 2005 de la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana, y conforme a lo estipulado en el mencionado Real Decreto, concedió la autorización para el desarrollo de dicho proyecto, cuyo objetivo principal es evaluar la posibilidad de conseguir embarazos viables con ovocitos congelados. Este proyecto está definido en el marco de nuestro programa de donación de ovocitos. Para su ejecución, las donaciones de ovocitos se harán en dos fases. Una parte de los ovocitos de cada donante se adjudicará en “fresco” a una pareja receptora, estos pacientes formarán parte del grupo control. Los ovocitos restantes de la misma donante, serán congelados y almacenados en un banco de ovocitos creado para tal fin, durante un período mínimo de seis meses. Para la criopreservación se utilizará la técnica de congelación lenta y la vitrificación. Finalizado este tiempo se repetirá toda la batería de análisis necesarios para comprobar la sero-negatividad de las donantes. Tras estos controles, los ovocitos serán descongelados y donados a otra pareja receptora, estos pacientes formarán parte del grupo de estudio. En todos los casos las parejas de las receptoras aportarán semen normozoospermico. La técnica de inseminación empleada será la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), tanto en ovocitos “frescos” como en congelados. En el día tres de desarrollo, se realizará la

biopsia de blastómeras, para su análisis posterior mediante técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) para los autosomas 13, 16, 21, 22 y los sexuales, con el fin de verificar el estado de euploidía de los embriones a transferir. Se analizarán tanto los embriones derivados del grupo control como los del grupo de estudio. La transferencia de embriones cromosómicamente normales se realizará en el día cinco de desarrollo embrionario. A todas las pacientes gestantes se les indicará la conveniencia de realización de amniocentesis en la semana 15 de gestación. En la actualidad estamos desarrollando la fase de congelación y donación/ transferencia en fresco.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Terenziani M.** Childhood cancer survival trends in Europe: a EURO CARE Working Group study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3742-3751.
2. **Bleyer WA.** The impact of childhood cancer on the United States and the world. *CA Cancer J Clin* 1990; 40: 355-367.
3. **Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN.** Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5307-5314.
4. **Blumenfeld Z, Dann E, Avivi I, Epelbaum R, Rowe**

- JM.** Fertility after treatment for Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002; 13 Suppl 1: 138-147.
5. **Lobo RA.** Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med* 2005; 353: 64-73.
 6. **Poirot C, Vacher-Lavenu MC, Helardot P, Guibert J, Brugieres L, Jouannet P.** Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum Reprod* 2002; 17: 1447-1452.
 7. **Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG.** Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 2000; 15: 1300-1304.
 8. **Curry TE, Jr., Lawrence IE, Jr., Burden HW.** Ovarian sympathectomy in the golden hamster: effects on estrous cyclicity and follicular development. *Exp Clin Endocrinol* 1985; 86: 284-290.
 9. **Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE, Ojeda SR.** Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 1990; 127: 2199-2209.
 10. **Aguado LI, Ojeda SR.** Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* 1984; 114: 1944-1946.
 11. **Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A.** Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364: 1405-1410.
 12. **Silber SJ, Lenahan KM, Levine DJ, Pineda JA, Gorman KS, Friez MJ, Crawford EC, Gosden RG.** Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2005; 353: 58-63.
 13. **Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J.** Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005; 353: 318-321.
 14. **George MA, Johnson MH.** Use of fetal bovine serum substitutes for the protection of the mouse zona pellucida against hardening during cryoprotectant addition. *Hum Reprod* 1993; 8: 1898-1900.
 15. **Carroll J, Depypere H, Matthews CD.** Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 547-553.
 16. **Carroll J, Wood MJ, Whittingham DG.** Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod* 1993; 48: 606-612.
 17. **Sathananthan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, Mok H, Lee MN.** The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 1988; 21: 385-401.
 18. **Stachecki JJ, Cohen J.** An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 152-163.
 19. **Van der Elst J.** Oocyte freezing: here to stay? *Hum Reprod Update* 2003; 9: 463-470.
 20. **Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J.** Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990; 54: 102-108.
 21. **Gook DA, Osborn SM, Johnston WI.** Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993; 8: 1101-1109.
 22. **Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E.** Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004; 19: 655-659.
 23. **Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP.** Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 769-777.
 24. **Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J.** Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 354-360.
 25. **Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A.** Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999; 14: 3077-3079.
 26. **Eroglu A, Toner M, Toth TL.** Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril* 2002; 77: 152-158.
 27. **Eroglu A, Toth TL, Toner J.** Small amount of microinjected threalose protect mouse and human oocytes during freeze-thaw. *Fertil. Steril.* 2001; 76: Suppl.1 September.
 28. **Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C.** Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16: 411-416.
 29. **Stachecki JJ, Willadsen SM.** Cryopreservation of mouse oocytes using a medium with low sodium content: effect of plunge temperature. *Cryobiology* 2000; 40: 4-12.
 30. **Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen S.** Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. *Biol Reprod* 1998; 59: 395-400.
 31. **Bretscher MS.** Membrane structure: some general principles. *Science* 1973; 181: 622-629.
 32. **Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen SM.** Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of

- replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology* 1998; 37: 346-354.
33. **Fahy GM.** The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986; 23: 1-13.
 34. **Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575.
 35. **Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ.** Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002; 67: 1671-1680.
 36. **Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H.** Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-58.
 37. **Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J.** The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Letters* 2001; 22: 157-162.
 38. **Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS.** Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod* 2000; 15: 2598-2603.
 39. **Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY.** Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72: 142-146.
 40. **Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Han SY, Choi DH, Cha KY.** In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 2000; 73: 545-551.
 41. **Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ.** Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 146-150.
 42. **Fuchinoue K, Fukunaga N, Chiba S, Nakajo Y, Yagi A, Kyono K.** Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 307-309.
 43. **Liebermann J, Tucker MJ, Sills ES.** Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in > 1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2003; 30: 125-129.
 44. **Mavrides A, Morroll D.** Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 73-80.
 45. **Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E.** Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 2001; 42: 139-144.
 46. **Papis K, Shimizu M, Izaike Y.** Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000; 54: 651-658.
 47. **Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS.** Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod* 2001; 16: 2350-2356.
 48. **Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG, et al.** Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-140.
 49. **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 300-308.
 50. **Kuwayama M, Ieda S, Zhang J, Kato O.** The CryoTip method: Aseptic vitrification of oocytes and embryos. *Fertil Steril* 2005; 84: Suppl.1. September. S187.

Aspectos no reproductivos del fallo ovárico

Santiago Palacios

Director del Instituto Palacios de Salud y Medicina de la Mujer.

Presidente de la Asociación Española para el Estudio de la Menopausia. Madrid.

El fallo ovárico prematuro es la amenorrea por déficit de hormonas sexuales y elevación de los niveles séricos de gonadotropina, que se produce antes de los 40 años de edad. Puede ser espontánea o inducida por quimioterapia, radioterapia u ooforectomía bilateral.

El fallo ovárico prematuro espontáneo puede ser debido a causas genéticas, autoinmunes o ideopáticas. En estos casos, el ovario continúa produciendo pequeñas cantidades de testosterona y androstenediona que son convertidas en estrógenos a nivel periférico. Existen claras diferencias hormonales en los casos de fallo ovárico prematuro por ooforectomía bilateral o espontánea (Fig. 1) (1).

Recientemente, el Study of Women Across the Nation (SWAN) ha señalado una incidencia de 1,1% de menopausias naturales antes de los 40 años (2). Este porcentaje representaría aproximadamente unos 70.000 casos en España.

La disminución de los niveles de estradiol están asociados a sofocos, disfunción sexual, depresión, migraña y sequedad vaginal. Sin embargo, al igual que estos síntomas son más agudos en las mujeres ooforectomizadas, en los casos de menopausia prematura no quirúrgica serían semejantes a la menopausia natural.

La menopausia prematura está asociada a la aparición prematura de osteoporosis y de enfermedad cardiovascular (3,4). Incluso en casos de ooforectomía bilateral se ha observado un aumento de las depresiones con suicidio (5). Sin embargo, las mujeres con menopausia prematura presentan un menor riesgo de cáncer de mama (6).

Pero la realidad de las consecuencias de no tratar y de tratar con Terapia Hormonal a las mujeres con menopausia prematura no se conocen. Los únicos datos procedentes de ensayos clínicos randomizados, el

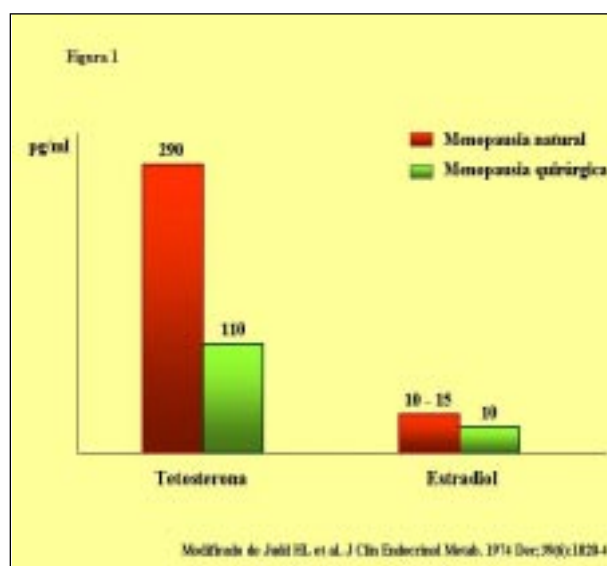


Figura 1

Women's Health Initiative (WHI) con estrógenos y gestágenos (7), y el WHI con estrógenos solos (8), no pueden ser extrapolados a mujeres que son 20 ó más años de media más jóvenes.

Existe, por lo tanto, un vacío de información que resulta si cabe paradójico; conocemos las consecuencias de los beneficios y riesgos de la Terapia Hormonal en mujeres de edad media de 63 años (7,8) y no conocemos estos mismos efectos en las mujeres de 40 años.

A nadie le sorprende que, recientemente en un estudio sobre menopausia prematura, Susan L. Hendrix (9) concluyera con la necesidad de investigar, entre otras, sobre las siguientes dudas:

¿La menopausia prematura es una enfermedad que necesita Tratamiento Sustitutivo?

¿Deberían ser tratadas estas mujeres con estrógenos solos o con gestágenos?

¿Qué tipo y qué dosis de Terapia Hormonal?
¿Por cuánto tiempo: hasta los 48, 51 ó 60 años?
¿Es más segura la Terapia Hormonal en mujeres con menopausia prematura que en las mujeres con menopausia natural?

BIBLIOGRAFÍA

1. **Judd HL, Judd GE, Lucas WE, Yen SS.:** Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1974 Dec; 39(6): 1020-4.
2. **Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF.:** Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 1986 Apr; 67(4): 604-6.
3. **Roos NP.:** Hysterectomies in one Canadian Province: a new look at risks and benefits. *Am J Public Health.* 1984 Jan; 74(1): 39-46.
4. **Centerwall BS.:** Premenopausal hysterectomy and cardiovascular disease. *Am J Obstet Gynecol.* 1981 Jan; 139(1): 58-61.
5. **Sherwin BB, Gelfand MM.:** The role of androgen in the maintenance of sexual functioning in oophorectomized women. *Psychosom Med.* 1987 Jul-Aug; 49(4): 397-409.
6. **Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E.:** Early menopause, number of reproductive years, and bone mineral density in postmenopausal women. *Am J Public Health.* 1993 Jul; 83(7): 983-8.
7. **Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al, and the Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators:** Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002 Jul 17; 288(3): 321-33.
8. **Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, for Women's Health Initiative Steering Committee:** Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2004 Apr 14; 291(14): 1701-12.
9. **Hendrix SL.:** Bilateral oophorectomy and premature menopause. *Am J Med.* 2005 Dec 19; 118(12 Suppl 2): 131-5.

Estado actual de la investigación en contracepción masculina

Roberto Lertxundi

Euskalduna Ginecología. Bilbao

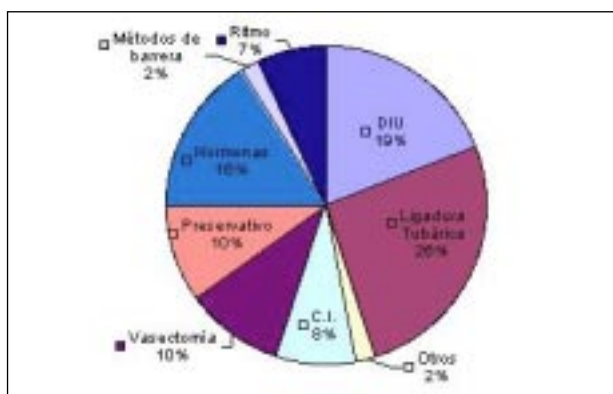
1. PRÓLOGO

En el hombre actualmente existen dos métodos anticonceptivos válidos: el condón y la vasectomía. El primero tiene los inconvenientes de interrumpir el acto sexual, un elevado índice de fallos y alterar las sensaciones coitales en la pareja. La vasectomía tiene el inconveniente de no ser fácilmente reversible.

El anticonceptivo ideal para el varón debería cumplir las siguientes condiciones:

1. Independencia del acto sexual.
2. Aceptable para el hombre y la mujer.
3. No interferir con la libido, potencia ni actividad sexual del varón.
4. No tener efectos secundarios a corto ni largo plazo.
5. No tener impacto en la futura descendencia.
6. Ser igual o más efectivo que los métodos femeninos comparables.

2. USO DE MÉTODOS ANTICONCEPTIVOS EN EL MUNDO (OMS 2002)



3. SITUACIÓN ACTUAL DEL : “CONTROL MASCULINO DE LA FERTILIDAD”

- * 1/3 del total de métodos anticonceptivos utilizados en el mundo, dependen de la cooperación masculina.
- * 80 millones de hombres en el mundo tienen realizada la vasectomía. Es un número semejante al total de mujeres que utilizan la píldora u otros métodos hormonales.
- * Aumenta el deseo de los hombres en asumir responsabilidades en materia de control de la fertilidad, no sólo por razones socio-económicas, sino también por razones de solidaridad e igualdad. Así lo confirman los estudios realizados en 2002 con la participación de 9.342 hombres en Europa (Escocia, Austria), USA, América latina (Colombia, Brasil) e Indonesia.

La conclusión es que existe una evidente necesidad de métodos reversibles masculinos de control de la fertilidad.

4. SUSTANCIAS ANTICONCEPTIVAS

En el tiempo actual se han dejado de lado líneas de investigación que anteriormente fueron propuestas e incluso utilizadas para las primeras fases de ensayos clínicos en materia de anticoncepción masculinas:

- El aceite de Gosipol.
- El t. De Wilfordi.
- La c. Maleata, etc.

En su momento la OMS formó un grupo de trabajo para la investigación de sustancias halladas en plantas medicinales, exóticas para los occidentales y

en productos vegetales con efectos anticonceptivos. Se identificaron en 170 productos. Pero ninguno de ellos resultó ser totalmente efectivo y carente de graves efectos secundarios. Los estudios realizados no pasaron en ningún caso de la fase I.

5. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis depende de las hormonas hipofisarias o gonadotropinas LH y FSH. Estas a su vez precisan de la hormona liberadora de Gonadotropinas o GnRH segregada en el hipotálamo. Las dos gonadotropinas LH y FSH actúan a través de receptores específicos localizados en el testículo, en las células de Sertoli (FSH) y en las células de Leydig (LH). La FSH induce la producción de espermatozoides que engloba cuatro fases:

- 1) Proliferación y diferenciación de las espermatogonias.
- 2) Desarrollo de espermatoцитos y meiosis.
- 3) Espermiogénesis o elongación de las espermátides redondas.
- 4) Espermiación o liberación de los espermatozoides al túbulo testicular.

Este proceso dura entre 64 y 72 días, lo que explica que cualquier anticonceptivo hormonal masculino precise de una fase de impregnación de casi 3 meses antes de conseguir la anticoncepción.

La LH, en las células de Leydig, produce Testosterona que también es responsable de la Espermiogénesis intratesticular pero que además tiene otras muchas funciones extratesticulares responsables de la masculinidad: Actúa en laringe, en la maduración y densidad ósea, en el crecimiento del vello corporal y producción sebácea, en el desarrollo muscular, en el crecimiento y función de los genitales externos y glándulas accesorias, y en la eritropoyesis.

Si se suprime la formación de FSH sola se disminuye la formación de espermatozoides pero no se consigue la azoospermia.

Si se suprimen la formación de FSH y LH sí se consigue la azoospermia pero se producen síntomas de supresión androgénica como son la pérdida de libido, alteración del fenotipo masculino, pérdida de la erección y alteraciones en la eritropoyesis y el metabolismo proteico, muscular, mineral y óseo.

Por todo ello los principios de anticoncepción hormonal masculina se han de basar en la eliminación de la LH y la FSH para conseguir la supresión de la espermatogénesis y de la testosterona intratesticular junto con la administración de testosterona periférica para mantener la masculinización y androgenicidad.

Se pueden conseguir estos objetivos mediante la administración de Testosterona sola o bien con la combinación de Testosterona con otras sustancias que inhiban la secreción de gonadotropinas como los progestágenos o las sustancias inhibitoras (antagonistas) de la GnRH.

6. EL PAPEL DE LOS ANDRÓGENOS

Testosterona sola

La administración de testosterona sola no sólo suprime la secreción por la hipófisis de LH y FSH sino que, al mismo tiempo, sustituye la testosterona testicular. Por ello ya en los años 70 se iniciaron estudios para suprimir la espermatogénesis con testosterona aunque no fue hasta los años 90 en que la OMS presentó un estudio en 4 continentes en el que a voluntarios se les administraron 200 mg de Enantato de Testosterona (ET) IM 1 vez por semana. Un 65% de los varones desarrollaron Azoospermia y el resto Oligozoospermia severa (< de 3 millones de esp./ml).

El porcentaje de embarazos era similar al conseguido con la utilización de preservativos, pero superior al ideal. Estos estudios demostraron la eficacia de la testosterona sola pero persistían los siguientes problemas: Necesidad de inyecciones semanales; una demasiado alta proporción de varones no llegaban a la azoospermia; precisaba identificar a los no respondedores al tratamiento; y las altas dosis de testosterona favorecían la aparición de efectos secundarios. Además la respuesta era diferente en raza asiática (91%) frente a raza blanca (60%). Todo ello hace pensar que sea poco probable que la futura anticoncepción hormonal masculina se base en testosterona sola.

Se han estudiado una amplia variedad de preparados inyectables de testosterona de acción prolongada. El de mayor duración es el Buciclato de Testosterona con una acción de 3 a 4 meses pero que no ha proseguido estudios debido a dificultades con la fórmula y toxicidad potencial.

El undecanoato de testosterona (UT) es un promotor agente al suprimir la espermatogénesis hasta niveles comparables al ET pero administrado a intervalos de 6 semanas que además parece se puede espaciar más al proseguir el tratamiento.

Los efectos secundarios de la administración de testosterona son leves y reversibles al dejar de utilizarla. Incluyen un leve aumento de peso, disminución del volumen testicular, presencia de acné y disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

7. COMBINACIONES DE TESTOSTERONA CON PROGESTÁGENOS

La capacidad de la progesterona y los progestágenos sintéticos de suprimir la acción de las gonadotropinas y la espermatogénesis es conocida desde hace medio siglo. Los progestágenos sólo producen pérdida de la libido, por ello se han estudiado en combinación con testosterona para intentar conseguir una dosis menor de testosterona un mayor porcentaje de supresión espermatogénica y una aceleración en el inicio de dicha acción.

Levonogestrel, desogestrel y etonogestrel son progestágenos utilizados en la contracepción femenina que combinados con preparados de testosterona de acción prolongada abren nuevas vías en el tratamiento del varón. Se utilizan como implantes subdérmicos que, aunque precisan una mínima intervención para su colocación y extracción tienen una acción más prolongada.

El acetato de Noretisterona (NET) es otro anticonceptivo femenino inyectable de acción prolongada que sorprendentemente ha sido poco estudiado en varones pese a que se demostró azoospermia en 5 varones a los que se administró NET con testosterona. En estudios recientes de NET con UT cada 6 semanas ha mostrado gran eficacia en la supresión de gonadotropinas.

8. TESTOSTERONA CON ANTAGONISTAS DE LAGnRH

Las combinaciones de testosterona con análogos de la GnRH favorecen la reducción de las dosis de testosterona aumentando la proporción de varones que llegan a la azoospermia. Ofrecen un más rápido inicio de la acción anticonceptiva. Tienen el inconveniente de precisar inyecciones diarias o semanales y un exagerado coste de las preparaciones que existen actualmente. Persisten problemas con efectos secundarios del tipo de aumento de peso y alteraciones en el metabolismo lipoproteico. Permiten introducir el concepto de su utilización solo en el momento de la inducción de la supresión de la espermatogénesis que se podría mantener solo con testosterona.

9. ÚLTIMA REVISIÓN COCHRANE (GRIMES 2005) SOBRE ANTICONCEPCIÓN HORMONAL MASCULINA

Conclusión general:

Se presentan aquí los datos más relevantes de esa revisión, cuya búsqueda bibliográfica incluía estudios

publicados hasta febrero de 2003, habiéndose revisado posteriormente el documento en febrero de 2005. Hemos encontrado otro estudio más de ese periodo (Hair 2001) y uno muy reciente (Anawalt 2005), cuyos datos se incluyen en este documento.

Grimes encontraba que solo tres estudios analizaban el embarazo como medida de resultados (WHO 1996; Pollanen 2001; Kamischke 2002).

La medida de resultado más común fue el recuento de espermatozoides expresado como una variable dicotómica: azoospermia (ausencia de espermatozoides) y oligospermia (variablemente definida como una concentración de espermatozoides < 1 millón, < 3 millones, ó 20 millones/ml).

Esta revisión se centra exclusivamente en la azoospermia como el resultado de interés principal por tres razones.

Primero, posiblemente será necesario lograr azoospermia para una eficacia anticonceptiva adecuada (Barfield 1797; WHO 1996; Kinniburgh 2001). Segundo, las definiciones de oligospermia u oligospermia severa variaban de un estudio a otro, por esto, se excluyeron las comparaciones entre los estudios. Tercero, la mayoría de los estudios calcularon incorrectamente la proporción de hombres con oligospermia al excluir aquellos con azoospermia del numerador. Además los estudios en general no recogían de manera consistente los efectos secundarios de los tratamientos, ni del tiempo transcurrido hasta la azoospermia.

En los estudios encontrados el número de participantes era bajo, con solo doce varones en el más pequeño y 68 en el más grande. La duración del seguimiento era variable, con un rango desde las 24 semanas a los doce meses.

Presentamos a continuación las tablas con los datos principales de los estudios aleatorizados que utilizaban como medida de efecto la consecución de azoospermia.

TABLAS. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS ESTUDIOS

Estudio Anawalt 1999

Participantes 36 varones en Seattle, Washington, entre 20-46 años, con historia y exploración física normales, niveles de gonadotropina normales, tres análisis de semen normales, y test sanguíneos normales. Exclusión por enfermedades médi-

cas, abuso de alcohol, uso de esteroides anabolizantes, o disfunción reproductiva.

Intervenciones Levonorgestrel oral 125 mcg al día comparadas Levonorgestrel oral 250 mcg al día más testosterone enanthate 100 mg intramuscular semanal (en ambos grupos) durante seis meses

Duración Seis meses

Resultados 89% de oligospermia en ambos grupos

Estudio Anawalt 2000

Participantes 24 varones en Seattle, Washington, edad entre 20-49 años, con historia y exploración física normales, niveles de gonadotropina normales, tres análisis de semen normales, y test sanguíneos normales. Exclusión por enfermedades médicas, abuso de alcohol, uso de esteroides anabolizantes, o disfunción reproductiva.

Intervenciones Desogestrel (DSG) 150 mcg orales diarios más testosterona 50 comparadas mg intramuscular semanal

DSG 150 mcg orales diarios más testosterona 100 mg intramuscular semanal

DSG 300 mcg oral diario más testosterona 100 mg intramuscular semanal durante seis meses

Duración Seis meses

Resultados Azoospermia en los 8 con DSG 150- Testosterona 100 IM, en los 8 con DSG 50- Testosterona 100 IM y en 7 de los 8 con DSG 300-

Testosterona 100 IM

Estudio Anawalt 2005

Participantes 41 varones.

Intervenciones Testosterona IM 100 mg semanal más 31 ,25m g comparadas Levonorgestrel oral diario

Testosterona IM 100 mg semanal más 62,5 mg Levonorgestrel oral diario

Duración Seis meses

Resultados Azoospermia similar en ambos (60 y 62%)

Estudio Anderson 2002a

Participantes 28 varones en Edimburgo, Escocia, entre 21-39 años con análisis de semen normal.

Intervenciones Un implante subcutáneo de etonogestrel (68 mg) comparadas. Dos implantes subcutáneos de etonogestrel (400 mg)

En ambos grupos más bolitas de testosterona

(400 mg) subcutánea. Un segundo tratamiento con bolitas de testosterona a las 12 semanas.

Duración 24 semanas

Resultados Azoospermia en 64% grupo de 1 implante y 75% de los de dos.

Estudio Anderson 2002b

Participantes 52 varones entre 19-41 años con análisis de semen normal (31 de South Africa y 21 de Nigeria).

Intervenciones Desogestrel (DSG)150 mg oral diario comparadas. Desogestrel 300 mcg oral diario Ambos grupos más bolitas de testosterona (400 mg) subcutánea. Un segundo tratamiento con bolitas de testosterona a las 12 semanas.

Duración 24 semanas en South Africa y 48 en Nigeria.

Resultados En South Africa 22 completaron al menos 22 semanas de tratamiento. Se logró azoospermia en 8/10 con 150 ug y en 8/12 de 300 ug. En Nigeria 4 se retiraron del estudio, en el resto se consiguió azoospermia.

Estudio Bagatell 1993

Participantes 22 varones sanos en Seattle, Washington, entre 19-42 años, con historia médica y exploración física normales, análisis de laboratorio normales. Contaje espermático superior a 20 millones/mL, y respuesta aceptable a test intradérmico con Nal-Glu. Exclusión si tabaquismo o abuso de alcohol.

Intervenciones Nal-Glu (un antagonista de GnRH) 100 mcg/kg/diario

comparadas subcutaneo más testosterona 200 mg intramuscularl semanal

Testosterona 200 mg intramuscular semanal de 16 a 20 semanas.

Duración 16 a 20 semanas

Resultados 7 de los 10 que tomaron Nal-Glu más progesterona y 6 de los 9 con solo testosterona resultaron con azoospermia

Estudio Bebb 1996

Participantes 38 varones en Seattle, Washington, entre 20-42 años, con historia médica y exploración física normales, gonadotropinas séricas normales, tres análisis sucesivos de semen normales y analítica sanguínea normal. Exdusión por enfermedad, uso defármacos, abuso de alcohol, uso

esteroides anabolizantes, o disfunción reproductiva.

Intervenciones Levonorgestrel 500 mcg oral diario más testosterona 100 mg comparadas i n - tramuscular semanal

Testosterone 100 mg intramuscular semanal

Duración Seis meses

Resultados Azoospermia en 12 de los 18 (66%) con LNG + testosterona y en 6 de los 18 (33%) con solo testosterona

Estudio I Behre 1992

Participantes 24 varones en Munster, Alemania, edad "joven", sin historia médica relevantes y exploración física y analítica sanguínea normales.

Intervenciones Implante de placebo subcutáneo más exyloxyphenylpropionato comparadas de 19- nortestosterona (19NT -HPP) 400 mg intramuscular

iniciales, y después 200 mg intramusculares cada tres semanas

19NT -HPP + Implante de Buserelina 3,3 mg

19NT -HPP + Implante de Buserelina 6,6 mg

Duración 24 semanas

Resultados Azoospermia: en 4 de los 8 en placebo más 19NT -HPP; en 4 de los 16 tratados con Buserelina

Estudio Behre 1995

Participantes 12 varones en Munster, Alemania, entre 18 y 40 años, sin historia médica relevantes y exploración física y analítica sanguínea normales.

Intervenciones Una inyección intramuscular de buciclato de Testosterona 600 comparadas mg.

Una inyección intramuscular de buciclato de Testosterona 1200 mg

Duración 32 semanas

Resultados Azoospermia: en ninguno de los de 600 mg y en tres de los 8 con 1200 mg

Estudio Gonzalo 2002

Participantes 68 varones en Los Angeles, California, entre 18-50 años, sin historia médica relevante, exploración física y analítica sanguínea normales y 3 análisis sucesivos de semen normales.

Intervenciones Parches transdérmicos de testosterona (10 mg/d)

Comparadas Implantes de levonorgestrel (160 mcg/d) más parches de testosterona (10 mg/d).

Levonorgestrel 125 mcg oral diario más parches de testosterona (10 mg/d)

Implantes de levonorgestrel (160 mcg/d) más testosterona 100 mg intramuscular

Duración 24 semanas

Resultados Azoospermia: en 24, 35, 33 y 93% respectivamente.

Estudio Hair 2001

Participantes 23 varones caucásicos, entre 20 y 43 años, media de 34 años: excluidos por bajo conteo de espermatozoides o colesterol alto.

Intervenciones Desogestrel oral 300 ug diarios y testosterona transdérmica comparadas 5mg diarios

Desogestrel oral 150 ug diarios y testosterona transdérmica 5mg diarios

Desogestrel oral 75 ug diarios y testosterona transdérmica 5mg diarios

Duración 24 semanas

Resultados 17 terminaron la fase de supresión. Azoospermia: ninguno en el grupo de DSG 75; 3 de los 6 en DSG 250; 4 de los 7 en DSG 300.

Estudio Handelsman 1996

Participantes 20 varones en Sydney, Australia, entre 21-50 años, sin enfermedad crónica, que no tomaban medicación, y función testicular normal. Exclusión por disfunción gonadal, abuso de drogas o test médicos de cribado anormales.

Intervenciones Implantes de Testosterona 400 mg comparadas Implantes de Testosterona 800 mg

Duración 12 meses

Resultados Azoospermia: en ninguno de los que usaba 400 mg y en 4 de los 10 con 800 mg

Estudio Handelsman 2000

Participantes 26 varones en Sydney, Australia, entre 18-45 años, con buena salud, test médicos de cribado normales, función testicular normal, y dos análisis de semen normales. Exclusión por condiciones médicas o trastornos psiquiátricos, abuso de drogas, uso de medicación, contraindicaciones para cirugía menor o para los productos en estudio.

Intervenciones Tres implantes de Testosterona (total 600 mg) comparadas. Implantes de

Testosterona (600 mg) más implante de estradiol (10 mg)

Implantes de Testosterona (600 mg) más implante de estradiol (20 mg)

Duración 12 meses

Resultados Azoospermia: en 9% (solo n, 43% (T+ 10 mg Estradiol) y 25% (T+ 20mg estradiol).

Estudio Kamischke 2000

Participantes 28 varones en Munster, Alemania, entre 18-45 años, sin historia médica relevante, exploración física y analítica sanguínea normales y análisis de semen normales, que no usaban otra medicación

Intervenciones Testosterona 1000 mg intramuscular cada seis semanas más comparadas levonorgestrel 250 mcg oral diario

Testosterone 1000 mg intramuscular cada seis semanas más placebo oral diario

Duración 24 semanas

Resultados Azoospermia: en 8/14 en grupo T+ LNG y 7/14 en grupo T+placebo

Estudio Kamischke 2002

Participantes 42 varones en Munster, Alemania, entre 18-45 años, sin historia médica relevante, exploración física y analítica sanguínea normales y análisis de semen normales.

Intervenciones Testosterona 1000 mg intramuscular a las semanas 2, 6, 12, y comparadas 18 más noretisterona

200 mg intramuscular a las semanas 0, 6, 12, y 18

Testosterone 1000 mg intramuscular más plus noretisterona 400 mg intramuscular (ambas administradas a las semanas 0, 6, 12, y 18)

Testosterona 1000 mg intramuscular a las semanas 0,6, 12, y 18 más noretisterona 10 mg oral diario.

Duración 24 semanas

Resultados Azoospermia: en 13/14, 11/12 y 12/14, respectivamente.

Estudio Kinniburgh 2001

Participantes 16 varones caucásicos en Edimburgo, Escocia, entre 21-39 años, sin historia médica relevante, exploración física y analítica sanguínea normales y análisis de semen normales.

Intervenciones Finasteride 5 mg oral diario más de-

sogestrel 150 mcg oral diario comparadas más plus

testosterona 400 mg subcutánea cada 12 semanas

Desogestrel 150 mcg oral diario más testosterona 400 mg subcutánea cada 12 semanas.

Duración 24 semanas

Resultados Azoospermia: en 5 de los 7 con finasteride y en 6 de los 8 sin finasteride.

Estudio Martín 2000

Participantes 30 varones en Edimburgo, Escocia, entre 23-42 años, sin historia médica relevante, exploración física y analítica sanguínea normales y análisis de semen normales.

Intervenciones Desogestrel 75 ug oral diario

Comparadas Desogestrel 150 ug oral diario

Desogestrel 300 ug oral diario

Más implantes de testosterona 300 mg subcutánea (todos los grupos)

Duración 8 semanas

Resultados Azoospermia: en 3 de los 100 con 330 ug

Estudio Matsumoto 1990

Participantes 51 varones (edad media 29 años) en Seattle, Washington, sin historia médica relevante, exploración física y analítica sanguínea normales y análisis de semen normales.

Intervenciones Testosterona 25 mg Intramuscular semanal

Comparadas Testosterone 50 mg Intramuscular semanal

Testosterone 100 mg Intramuscular semanal

Testosterone 300 mg Intramuscular semanal

Inyección de Placebo semanal.

Duración 6 meses

Resultados Azoospermia: en 50- 70% en testosterona a dosis altas.

Estudio Pollanen 2001

Participantes 43 varones en Turku, Finlandia, entre 21-45 años, sin historia médica relevante, exploración física normal, análisis de semen normales, dispuestos a confiar en el una alternativa si conseguía un conteo espermático <3 million/mL achieved, pareja femenina normal en edad reproductiva, y dispuestos a participar en el seguimiento.

Exclusiones por uso de hormonas esteroideas en los

tres meses anteriores, pareja embarazada, u obeso.

Intervenciones Un implante subdérmico de levonorgestrel (75 mg)

comparadas Dos implantes de levonorgestrel

Cuatro implantes de levonorgestrel

Levonorgestrel 30 mcg oral diario

Grupo con solo 5 alpha-dihydrotestosterone (10 g) transdérmico

En todos los grupos les daban 5 alpha-dihydrotestosterone (10 g) transdérmico

Duración 12 meses

Resultados 27 varones completaron la fase de supresión y ninguno llegó a azoospermia.

Estudio Wu 1999

Participantes 24 varones caucásicos en Manchester, UK, sanos con análisis de semen normal.

Intervenciones Desogestrel 300 mcg oral diario más testosterona 100 mg comparadas intramuscular semanal

Desogestrel 300 mcg oral diario más testosterona 50 mg intramuscular semanal

Desogestrel 150 mcg oral diario más testosterona 100 mg intramuscular semanal

Duración 24 semanas

Resultados Azoospermia en 18 de 23, siendo el más efectivo 300 DSG + 50 T (8de 8).

10. INVESTIGACIÓN ACTUAL:

- 1) Sobre la espermatogénesis
- 2) Sobre el epidídimo
- 3) Autoinmunidad

En relación con la primera (espermatogénesis) lo más prometedor es la combinación de testosterona con progestágenos. Como se ha indicado, el gestágeno permite reducir la dosis de testosterona (y minimizar los efectos secundarios) e iniciar antes la anticoncepción. Falta por determinar con mayor rigor la dosis mínima efectiva de testosterona y los efectos secundarios a medio y largo plazo.

Es esperanzadora la colaboración entre los laboratorios Organon y Schering con la perspectiva de presentar un anticonceptivo hormonal masculino para el año 2009. Probablemente consistirá en un implante subdérmico de Etonogestrel con Undecanato de testosterona. Hasta el momento ésta es la combinación con mayor efectividad y tiempo de actuación.

Population Council ha publicado los primeros estudios dirigidos por C. Yan Cheng sobre el uso del di-

clobencil-indazol-carbohidracida (AF 2364) como método anticonceptivo con administración oral a ratas adultas induciendo la interrupción de la espermatogénesis a nivel de espermátidas inmaduras. Se ha comprobado así mismo, su reversibilidad. En la actualidad se plantea la hipótesis de si los resultados obtenidos en los testículos de ratas pueden extenderse a los humanos como un método de contracepción masculina.

La actuación sobre el epidídimo, con el objetivo de impedir la maduración espermática y la reacción acrosómica es otro de los planteamientos que en estos momentos se está proponiendo por diversos grupos de investigadores, estando todos los estudios en fase I.

Finalmente, lo último de lo último, en investigación para el "control de la fertilidad masculina" se refiere a la "vacuna" contraceptiva para el hombre que, están en fase estrictamente experimental y que se apoya en un principio de respuesta autoinmune dirigida destacando dos líneas básicas:

* El receptor proteína G a HEG

* El epidídimo como regulador de la espermatogénesis vía control del transcriptosoma epididimal.

11. ¿CONFIARÁN LAS MUJERES EN LOS HOMBRES? LAS PERSPECTIVAS ACTUALES

Esta duda en la actualidad ha sido superada por los hechos. Es un prejuicio anticuado, como lo demuestran cuantos estudios se publican.

De ahí que la industria farmacéutica haya entrado a fondo en el campo de la contracepción masculina, más allá del condón o la vasectomía.

La compañía alemana Schering y la holandesa Organon han unido sus esfuerzos para conseguir "la píldora masculina" - lo que se ha venido calificando como "el píldoro".

En la actualidad se trabaja en la combinación de un implante y de una inyección.

Se está a la espera de la inmediata finalización de los ensayos en fase II y se plantea el comienzo de la fase III para este mismo año.

Según la Sra. Ursula Habericht directora del grupo de investigación de ginecología y Andrología de Schering "si los ensayos tienen éxito, el producto puede llegar al mercado para 2009".

La Sra. Habericht cree que los posibles efectos secundarios no son peores que los que producen los anticonceptivos hormonales femeninos, opina, asimismo, que este producto puede servir como la apertura de un nuevo campo para otras aproximaciones a la anticoncepción masculina.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Anawalt BD, Bebb RA, Bremner WJ, Matsumoto AM.:** A lower dosage levonorgestrel and testosterone combination effectively, suppresses spermatogenesis and circulating gonadotropin levels with fewer metabolic effects than higher dosage combinations. *Journal of Andrology* 1999; 20: 407-414.
2. **Anderson RA, Kinniburgh D, Baird DT.:** Suppression of spermatogenesis by etonogestrel implants with depot testosterone: potential for long-acting male contraception. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 3640-9.
3. **Grimes D, Gallo M, Grigorieva V, Nanda K, Schulz D.:** Hormonas esteroides para la anticoncepción en hombres (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2005 Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible a: <http://www.update-software.com>. (Traducidad de The Cochrane Library, 2005 Issue 2. Chichester, UK: John Wiley&Sons, Ltd). Acceso 13/5/2005 en: [http:// 212.49.218.200/newgenClibPlus/pdf/CD004316-ES.pdf](http://212.49.218.200/newgenClibPlus/pdf/CD004316-ES.pdf).
4. **Nieschlag E, Behre HM, Engelmann U, Schwarzer U.:** Male contribution to contraception. En: *Nieschlag&Behre(Ed) Andrology: Male reproductive health and dysfunction*, 2. edición Springer, Heidelberg. Alemania; 200: 399-418.
5. **Wang C, Swerdloff RS.:** Male hormonal contraception Am. J of Obst and Gynecol. 2004; 190: S60-S68.
6. **Wassener B.:** The male pill may still have a fruitful future. *Financial Times*, pag 8 22/7/2005.
7. **WHO.:** Task force on methods for the regulation of male fertility. Contraceptive efficacy of testosterone induced azoospermia in normal men. *Lancet* 1990; 336: 955-999.
8. **WHO.:** Task force on methods for the regulation of male fertility. Comparison of two androgens plus depot medroxyprogesterone acetate for suppression to azoospermia in Indonesian men. *Fertile Steril* 1993; 60: 1062-1068.
9. **World Health Organization:** Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility* 1996; 65: 821-9.
10. **Wu FCW, Balasubramanian R, Mulders TMT, Coelingh_Bennink HJT.:** Oral progestogen combined with testosterone as a potential male contraceptive: additive effects between desogestrel and testosterone enanthate in suppression of spermatogenesis, pituitary-testicular axis, and lipid metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 112-122.

Biología de la reproducción para ginecólogos

Dra. R. Núñez Calonge

Clínica Tambre. Madrid

1. INTRODUCCIÓN

La Reproducción Asistida requiere un equipo multidisciplinario, donde los miembros trabajen en estrecha colaboración. Hasta hace pocos años, las técnicas de reproducción asistida dependían exclusivamente de los ginecólogos, pero los avances en la biología de la reproducción han determinado que la posición del biólogo dentro del equipo adquiriera más preponderancia. Las decisiones que afectan directamente a la pareja deben ser tomadas de forma conjunta, y ambas visiones, la del ginecólogo y la del biólogo son importantes para el éxito en los resultados.

En este tema se detallan los aspectos más importantes que, desde el punto de vista sobre todo práctico, el médico debe conocer dentro de un laboratorio de Reproducción Asistida. Aunque por regla general se da más importancia al Laboratorio de Embriología, en reproducción se manejan tanto espermatozoides como ovocitos y en consecuencia, embriones. Por tanto, los dos pilares básicos en el campo de la biología de la Reproducción son el Laboratorio de Andrología y el Laboratorio de Embriología, con lo que es necesario que el ginecólogo conozca el funcionamiento de ambos.

2. ANÁLISIS DE SEMEN EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

2.1.- Principales determinaciones en el eyaculado que nos ayudan a seleccionar la Técnica de Reproducción Asistida.

2.1.1.- Madurez nuclear

La condensación de la cromatina durante la espermiogénesis y su decondensación en el momento de la

fertilización son esenciales para el éxito de la fecundación. La condensación y estabilización normal de la cromatina permite el transporte del genoma masculino, decondensándose después la cromatina cuando el espermatozoide penetra en el ovocito, para interactuar con el ADN del mismo y formar el genoma. El propósito de la condensación es reducir la masa de cromatina y facilitar al núcleo la degradación enzimática.

Durante la maduración epididimaria, el espermatozoide humano, como el de otros mamíferos, sufre una serie de cambios bioquímicos y estructurales que son pre-requisitos para una óptima capacidad fecundante. Entre los cambios madurativos, la formación de puentes disulfuro entre las protaminas nucleares origina un incremento de la estabilidad de la cabeza espermática. Este incremento es concomitante con un descenso en los grupos tiol libres en el núcleo (Bedford y col. 73). Después de la eyaculación, el zinc procedente del fluido prostático entra en la cromatina y se une a los grupos tiol libres, estabilizando así la estructura cuaternaria y asegurando el equilibrio entre los puentes disulfuro y los grupos tiol libres. Cuando existe un almacenamiento prolongado del plasma seminal puede tener lugar hiperestabilidad de la cromatina espermática. Por otra parte, en los espermatozoides humanos, el tiempo de tránsito a través del epidídimo varía entre individuos. Así, los espermatozoides del eyaculado tienen diferentes grados de estabilidad nuclear. El análisis de la proporción de espermatozoides con núcleos inmaduros en el eyaculado puede servir como prueba de madurez nuclear y por lo tanto de capacidad fertilizadora.

2.1.2.- Morfología espermática

El papel de la morfología espermática en el estudio del factor masculino, ha sido desde hace tiempo

motivo de controversia. Algunos investigadores consideran que la morfología es el principal parámetro en el análisis de semen a la hora de predecir el potencial fertilizador (Oehringuer y col, 95), mientras que otros autores no encuentran ninguna correlación (Sercchioli y col, 95).

Sin embargo, las evidencias en largas series de FIV, sugieren que la morfología de acuerdo al criterio estricto proporciona una información pronóstica importante sobre la tasa de fecundación (Grow y col, 94). Además, se ha encontrado una correlación positiva entre morfología espermática por criterio estricto y otros tests de función como la condensación de la cromatina (Claessens y col, 92), lo que aumenta la legitimidad de la morfología espermática como test de función.

Existen varios trabajos que demuestran que no existe una relación entre la morfología espermática y los resultados de ICSI (tasa de fecundación, división, calidad embrionaria y gestación) (Nagy y col, 98). Incluso se han publicado embarazos con espermatozoides globozoospermicos (Trokoudes y col, 95). En otros trabajos se habla de una disminución de la tasa de embarazo e implantación cuando existe un 100% de teratozoospermia (Tasdemir, 97) o la posibilidad de que los espermatozoides anómalos pueden manifestar un efecto negativo en el desarrollo embrionario e implantación) (Svalander y col, 98).

En cualquier caso, aunque el ICSI obvie el problema de teratozoospermia existente con otras técnicas de Reproducción Asistida, no debemos descartar la posible influencia negativa que implica esta anomalía a la hora de conseguir una gestación.

2.1.3- Supervivencia espermática

Si hemos visto que la movilidad espermática es uno de los principales parámetros implicados en la capacidad fertilizadora, la duración de la movilidad a lo largo del tiempo, podemos pensar que se trata de una característica más, ligada a este factor. Uno de los principales grupos de Reproducción que estudió la supervivencia espermática ligada a la fertilidad fue el Michelle Plachot. En 1987 publicó un artículo en el cual se realizó este test sistemáticamente en todas las parejas de FIV con patología masculina, encontrándose una correlación con los resultados de fertilidad.

Nuestro grupo, realizó un trabajo (Núñez y col, 96) en el cual se analizaba la supervivencia espermática a las 24 horas de incubación de todas las muestras de semen procesadas para Inseminación Artificial Intrauterina. Seleccionamos al azar 45 ciclos de inseminación en los que se obtuvo embarazo y se com-

probó si los espermatozoides mantenían la movilidad durante 24 horas. Estos resultados se compararon con los obtenidos en los mismos ciclos en los que no hubo embarazo, en los cuales no existía ninguna patología femenina conocida. Los resultados demostraron que en el 82,2% de los ciclos con embarazo se obtiene supervivencia a las 24 horas, frente al 17,7% que fue negativa. Sin embargo, en los ciclos sin embarazo, el 50% tuvo supervivencia frente al otro 50% en que no hubo. De aquí que consideráramos el test de supervivencia espermática como índice pronóstico negativo de embarazo en los casos en los que fuera negativo.

Al año siguiente, en 1997, Coccia y cols. publicaron un trabajo en el que correlacionaron la tasa de fecundación en FIV con el test de supervivencia espermática, hallando así mismo una correlación positiva: el 90% de los ciclos con fallo de fecundación poseían un test negativo (87% de sensibilidad y especificidad del 65%).

2.1.4.- Movilidad espermática en medios de cultivo: capacitación "in vitro"

Con el fin de que los espermatozoides sean funcionales, deben separarse lo más pronto posible del plasma seminal. La exposición prolongada de los mismos con los fluidos seminales hace que descienda considerablemente la movilidad y viabilidad (Mortimer, 84). Hay que tener en cuenta que nos referimos al comportamiento del espermatozoide "in vitro", de manera que la acción del plasma seminal difiere de la que se le confiere en el entorno fisiológico.

El lavado del eyaculado para eliminar el plasma seminal rápida y efectivamente es pues esencial, tanto en tests de laboratorios para comprobar la capacidad fertilizadora de los espermatozoides, como en Inseminación Intrauterina y Fecundación In Vitro (Mortimer y col, 90)

Con frecuencia se utiliza el término de "espermatozoides capacitados" al referirnos a espermatozoides lavados e incubados con medio de cultivo, esto es, imitando las condiciones de capacitación "in vivo". Sería más correcto referirnos a selección espermática o recuperación de espermatozoides móviles (R.E.M.), ya que la capacitación espermática es un complejo proceso en el cual tienen lugar una serie de modificaciones en el espermatozoide, no siempre discernibles. Las condiciones empleadas "in vitro" tratan de emular las fisiológicas con la retirada del plasma seminal y resuspensión de espermatozoides en medios que permitan la supervivencia y capacitación, pero, realmente, no podemos asegurar que la población de es-

permatozoides seleccionada se encuentre capacitada y sea capaz de fertilizar un ovocito.

Tras una hora de incubación de las muestras resuspendidas en medio de cultivo a 37°C, los límites normales de recuperación espermática no son claros. Se pueden encontrar eyaculados normales con unas cifras de recuperación muy bajas y viceversa. En Inseminación Artificial Intrauterina, el número mínimo más o menos estandarizado que se requiere es de 5-6 millones de espermatozoides móviles (con movilidad tipo a+b) por ml. Por debajo de estas cifras, el porcentaje de gestación baja considerablemente.

Con respecto al medio de cultivo utilizado para la incubación, cualquiera que sirva para capacitar los espermatozoides y se utilice en Fecundación *in vitro*, es bueno. Los medios utilizados actualmente incluyen BWW, Ham's F-10, Menezo B2 y, más recientemente, IVF (Medi-Cult, Vitrolife, COOK). Con respecto al estudio de la hiperactivación, ya que todos estos medios incluyen bicarbonato, calcio y glucosa, los requerimientos básicos, pueden ser igualmente válidos. Sin embargo, existen trabajos que refieren que la presencia de HEPES en el medio reduce la incidencia de hiperactivación (Anderson y col 89) y otros mencionan que el uso de Ham's F10 puede ser dañino para los espermatozoides, ya que contiene mayor concentración de hierro, el cual promueve en mayor cantidad la presencia de radicales libres que otros medios (Gómez y Aitken, 96).

La temperatura es otro factor importante a tener en cuenta en la valoración de la movilidad espermática. La mayoría de los trabajos refieren la utilización de los 37°C como temperatura óptima para la interpretación de los parámetros cinéticos, y todos ellos coinciden en que pequeñas variaciones de temperatura, inciden en cambios de movilidad.

Los espermatozoides procesados "in vitro" en condiciones de capacitación pueden, no obstante, evidenciar signos de su estado fisiológico. Los cambios en la movilidad espermática y la adquisición de la capacidad para sufrir la reacción acrosómica son aspectos críticos de la capacitación. Se ha verificado que la hiperactivación es un suceso no sincronizado en la población espermática. Este hecho, probablemente haya contribuido al retraso en su reconocimiento en el semen humano (Burkman y col,90). Esta asincronía puede deberse a la variabilidad existente entre eyaculados con respecto al pico de hiperactivación o a la heterogeneidad en la duración de la misma. Para ilustrar el problema, es obvio que una vez que la reacción acrosómica se ha completado, el espermatozoide permanece reaccionado y no vuelve al estado original. Sin embargo, el período de movilidad hiper-

activada viene precedido y seguido por una fase de movimiento flagelar moderado: el momento de observación es pues, crítico.

La conclusión que podríamos derivar de todo ello es que el eyaculado que se va a utilizar para inseminación intrauterina es necesario procesarlo inmediatamente después de la licuación del mismo, y es conveniente que no permanezca en el incubador más de dos horas, para prevenir la capacitación prematura y por tanto no llegue a fecundar el ovocito.

3. EL OVOCITO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

3.1.- Aspectos teóricos

3.1.1.- Estudio de la meiosis

Antes de poder hablar del ovocito desde el punto de vista del laboratorio de Embriología, es necesario conocer algunos aspectos fisiológicos básicos del mismo. La meiosis o división reduccional es uno de los más importantes.

La meiosis se denomina reducción celular, porque se reduce el número de cromosomas en el gameto a un número haploide (23 cromosomas). Cuando un ovocito maduro con un número haploide de cromosomas se une con un espermatozoide maduro, con un número haploide, se convierte en un cigoto diploide con 46 cromosomas.

La meiosis también crea nuevas combinaciones mezclando los cromosomas parentales. Durante la meiosis I, los cromosomas homólogos intercambian material genético entre ellos, por lo que los gametos heredan cromosomas que son derivados de ellos, pero no idénticos, al par de cromosomas homólogos de los padres.

La meiosis es un proceso que proporciona el mecanismo para mantener un nº constante de cromosomas de generación en generación, y permite la diversidad genética con la mezcla de cromosomas paternos y los genes.

La meiosis tiene dos estados: meiosis I y meiosis II. Durante la meiosis I los cromosomas homólogos se separan, y durante la meiosis II, las cromátidas se separan. El resultado son cuatro células (cuatro espermátidas, cada una con un nº haploide de cromosomas).

La meiosis en la mujer origina un único gameto viable que contiene todo el citoplasma y varios cuerpos polares pequeños. Así, la mayoría de los componentes citoplasmáticos del ovocito se conservan para

utilizarse en los primeros estadios de la embriogénesis futura. Teóricamente, deben formarse tres corpúsculos polares como resultado de las divisiones meióticas del ovocito: uno durante la meiosis I y dos durante la meiosis II. No obstante, en realidad, el primer corpúsculo polar raramente se divide durante la meiosis II.

La meiosis I tiene una profase completa, la cual se divide en 5 subestados: leptotena, zigotena, paquitena, diplotena y diacinesis. En diplotena está marcado por la apariencia morfológica de vesícula germinal. En Metafase I se forma el huso, y los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial. Este estado está marcado por la ausencia de la vesícula germinal antes de la extrusión del primer corpúsculo polar.

La meiosis II solo tiene una breve profase y no hay replicación de ADN, y no se intercambia material genético. En la Telofase II tiene lugar la división celular. En la mujer, el ovocito activado (presumiblemente fertilizado) continua reteniendo la gran parte del citoplasma y un segundo cuerpo polar hereda una pequeña cantidad.

3.1.2.- Maduración ovocitaria

Los ovocitos de mamíferos completan su crecimiento cuando los folículos alcanzan la fase antral. En ese momento, los ovocitos que estaban detenidos en diplotene de la profase I, experimentan un proceso de maduración que les permite transformarse en ovocitos secundarios, estadio en el que son ovulados y fecundados. El proceso del ovocito desde el estadio de dictiotena (profase de la Meiosis I) a Metafase II, se denomina maduración meiótica. Desde un punto de vista celular, esta maduración se caracteriza por la disolución de la membrana nuclear (ruptura de la vesícula germinal), condensación de la cromatina en distintos bivalentes, separación de cromosomas homólogos y emisión del primer corpúsculo polar.

Desde el punto de vista molecular, podemos distinguir la maduración nuclear y la citoplásmica. La maduración nuclear comprende toda una serie de procesos moleculares que permiten la salida de la profase I y la progresión hacia el estadio de MII y la detención de nuevo en este estadio a la espera de la fecundación.

La maduración citoplásmica se refiere a los procesos o mecanismos moleculares que suelen acompañar a la maduración nuclear y preparan al ovocito para la activación, la formación de los pronúcleos y el posterior desarrollo embrionario. Los ovocitos que son capaces de realizar la maduración nuclear no son capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, lo

que es indicativo de una maduración citoplásmica deficiente. La capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto es un indicador importante de la finalización de la maduración citoplásmica.

Ambos tipos de maduración son altamente susceptibles al aporte hormonal y a las condiciones de cultivo *in vitro* (pH, temperatura, oxígeno), que pueden causar alteraciones en la morfología del ovocito, algunas de ellas visibles al microscopio (Boiso y col, 2001).

3.2.- Aspectos prácticos

3.2.1.- Madurez ovocitaria *in vitro*

Tradicionalmente, la evaluación de la maduración ovocitaria en el laboratorio se ha basado en la expansión del complejo cumulus/corona que rodea al ovocito tras la punción. De esta forma, los ovocitos se clasifican rápidamente en maduros (correspondientes a MII), si poseen una cúpula expandida y una corona radiada clara. Un complejo cúmulo/corona menos expandido denota un estadio intermedio de madurez (estadio MI de maduración), y la ausencia de cúmulo expandido se asocia generalmente con inmadurez (que se correlaciona con los ovocitos en PI).

Aunque este tipo de análisis con frecuencia se aproxima al verdadero estatus molecular del ovocito, es frecuentemente impreciso y puede conducir a errores en el laboratorio al manejar los gametos.

Además, la maduración nuclear del ovocito y la maduración del cúmulo no siempre van aparejadas. Cuando tiene lugar esta disparidad, los ovocitos inmaduros pueden ser inseminados prematuramente y puede fallar la fecundación. Además del fallo de fecundación pueden ocurrir otros factores deletéreos colaterales combinando espermatozoides y ovocitos en momentos inadecuados.

Debido a estos inconvenientes, las técnicas han sido desarrolladas para permitir más seguridad en la comprobación del estado meiótico del ovocito. Una aproximación sistemática, que puede ser utilizada para emplear un score de maduración, tiene en cuenta el tamaño del folículo, expansión de la masa del cúmulo, tamaño y expansión de las células de la corona, cohesión de las células de la granulosa a la membrana y forma y color del ovocito en sí mismo, si es visible dentro de la masa de células que lo rodean.

3.2.1.1.- Ovocitos Metafase II

Los ovocitos metafase II son ovocitos maduros o preovulatorios, vagas descripciones que fallan al especificar el estatus meiótico exacto del ovocito.

Momentos después de su formación, el primer corpúsculo polar permanece conectado al ovocito por el huso meiótico, formando un puente citoplasmático. Los cromosomas dentro del primer corpúsculo polar pueden permanecer agrupados juntos, o sufrir una segunda división meótica, o estar dentro del citoplasma; generalmente, el núcleo no está formado. El primer corpúsculo polar contiene gránulos corticales debido a su extrusión antes de la penetración de un espermatozoide y liberación de los gránulos corticales. En el ovocito están presentes de una a tres capas de gránulos corticales en la periferia.

Bajo el microscopio, el ovocito se caracteriza por su forma esférica con un ooplasma claro y con granularidad homogénea. Está generalmente asociado con un cúmulo expandido y una corona radiada clara. Las células de la granulosa dispuestas a lo largo del ovocito están estrechamente agregadas y poseen características de madurez. Sin embargo, más de la mitad de los ovocitos humanos presentan al menos una anomalía morfológica (Ebner y col, 2003).

Una vez desnudado el ovocito, se observa el primer corpúsculo polar y ausencia de vesícula germinal (Figura 1).

Los ovocitos metafase II deben ser inseminados o inyectados entre 3 y 5 horas después de su recogida.



Figura 1

Ovocito metafase II con aspecto normal

3.2.1.2.- Ovocitos Metafase I

El ovocito Metafase I se considera próximo a la madurez o en un estadio intermedio. El ovocito ha completado la profase de la Meiosis I. La vesícula germinal y sus nucleolos han desaparecido. Durante este estado, se forma el huso y se recombinan los cromosomas paternos y maternos alineándose al azar hacia los polos. Más tarde, en la telofase, los cromoso-

mas se acortan independientemente o al ovocito o al primer corpúsculo polar.

Un ovocito Metafase I requiere de 1 a 24 horas en cultivo antes de alcanzar la madurez total. Aquellos que requieren más de 15 horas se consideran tardíos, mientras que lo hacen antes de 15 horas, tempranos.

Bajo el microscopio, el ovocito Metafase I se caracteriza por la ausencia de corpúsculo polar y de vesícula germinal. Un MI temprano es redondeado con un ooplasma homogéneo en granularidad y de color claro. Los MI tardíos pueden tener alguna granularidad central. Las células de la granulosa con aspecto maduro, luteinizado y cúmulo dispersos, están asociados con MI tardíos.

Ya que la extrusión del primer corpúsculo polar puede ocurrir en cualquier momento después de la recogida, es necesario examinar el ovocito a intervalos regulares para determinar el momento correcto de la inseminación. Si el semen se coloca con los ovocitos antes de que se haya completado la maduración nuclear y citoplasmática, generalmente fallan la descondensación dentro del ooplasma, o tiene lugar fertilización anómala. Si la inseminación se retrasa demasiado, puede tener lugar un envejecimiento in vitro, con similares consecuencias. Más del 80% de los ovocitos MI progresan a MII.

Deben inseminarse o microinyectarse de 1 a 5 horas después de la extrusión del primer corpúsculo polar.

3.2.1.3.-Ovocitos Profase I

Los ovocitos profase I se conocen como inmaduros o VG. Poseen una cantidad de ADN tetraploide debido a la presencia de 46 cromosomas dobles.

El ovocito comienza a madurar en respuesta a las gonadotropinas y a la reducción de los factores inhibidores de la maduración folicular. La vesícula germinal, que ha persistido a lo largo de las fases tempranas de crecimiento, comienza su progresión a su ruptura, y el ovocito se agranda.

La mayoría de los ovocitos PI recogidos para FIV se han estimulado para reasumir la meiosis y están en los estadios finales de la profase de la primera meiosis, habiendo alcanzado prácticamente su tamaño. Si un espermatozoide penetra este ovocito inmaduro, también fallará la activación, ya que el ovocito no está meióticamente maduro y sus cromosomas sufrirán una condensación prematura.

La ruptura de la vesícula germinal puede suceder en unos minutos, o requerir varias horas después de la punción. La longitud del tiempo necesario parece depender de cómo los sucesos de maduración han progresado dentro del folículo antes de la punción.

La vesícula germinal o núcleo del ovocito humano es esférica y contiene un nucleolo grande, refráctil y exocéntrico. Un examen más en detalle puede revelar un segundo nucleolo más pequeño. La vesícula germinal está localizada en el centro del ooplasma de los ovocitos PI jóvenes y en aquellos que tienen una parada madurativa en el desarrollo. En los ovocitos sanos, la VG migra hacia una posición más cortical. La disolución de la vesícula germinal marca la primera indicación microscópica de que se ha reanudado la meiosis. Como en los ovocitos maduros, la defensa frente a la polispermia está establecida por los gránulos corticales en la periferia del ovocito. En los ovocitos inmaduros, estos gránulos están esparcidos y de forma discontinua.

Bajo el microscopio, los ovocitos PI se caracterizan por su VG y los nucleolos refráctiles. Tienen forma irregular, el citoplasma oscuro y granular. Las células del cúmulo son generalmente compactas y con varias capas. Células libres de la granulosa dentro de la membrana son generalmente pequeñas y compactas. Los ovocitos PI con características de madurez del cumulus (aparición expandida y corona radiada) generalmente no rompen la VG.

Los ovocitos PI deben inseminarse o inyectarse entre 26 y 29 horas después de la punción.

3.2.2.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

En la preparación de los ovocitos para la microinyección, las células del cúmulo y la corona que rodean al ovocito deben de ser eliminadas, ya que solo los ovocitos desnudos pueden ser manejados con éxito con la pipeta de holding. La desnudación se realiza de forma estandarizada, combinando métodos enzimáticos y procedimientos mecánicos. Esto permite que el ovocito sea correctamente identificado antes de la microinyección y por tanto antes de la fecundación.

Por otra parte, el ICSI, es un método relativamente invasivo que requiere preparación y experiencia en la persona que lo realiza. El procedimiento de la microinyección en sí mismo podría, en teoría, dañar las estructuras citoplasmáticas del ovocito, y como resultado afectar al desarrollo embrionario (Dumoulin y col, 2001). Así, una de las formas de “medir” la experiencia del biólogo que realiza la microinyección, es comprobar la tasa de ovocitos degenerados que se producen tras el ICSI.

Por otra parte, la aspiración del citoplasma durante el ICSI también puede producir una disrupción del huso meiótico. Un defecto en el huso puede producir una no-disyunción durante la segunda meiosis o se-

gregación irregular de los cromosomas (Dumoulin y col, 2001). En suma, la aspiración de grandes volúmenes de citoplasma puede implicar el riesgo de dislocación accidental de grandes cantidades de proteínas o mitocondrias (Van Blerkon y col, 2001). Estos efectos deletéreos en las estructuras de los cromosomas y la polaridad del ovocito podrían, teóricamente, persistir en los estados posteriores del desarrollo embrionario.

3.2.3.- Selección ovocitaria en Reproducción Asistida: Anomalías ovocitarias en el Laboratorio de FIV

3.2.3.1.- Ovocitos gigantes

Los ovocitos con un tamaño más grande de lo normal (> 200 micras), llamados gigantes, son producidos por la falta de citocinesis durante la división mitótica, o por fusión de dos ovogonias y, consecuentemente están asociados a una dotación diploide de material genético. En ambos casos, los zigotos resultantes tendrán un juego triploide de cromosomas después de la replicación de ADN, y serán capaces de división normal e incluso de formación de blastocistos. Sin embargo, es altamente recomendable excluirlos del laboratorio de FIV aunque tengan 2 pronúcleos aparentemente normales.

Esta anomalía puede estar asociada a la estimulación ovárica. (Balakier y col, 2002).

3.2.3.2.-Primer corpúsculo polar

La gran mayoría de los ovocitos tienen un tamaño regular y, como resultado de la estimulación hormonal, la maduración nuclear acabará en el momento de la punción, lo cual está asociado con la extrusión del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino. Aunque algunos corpúsculos polares permanecen intactos en humanos hasta 20 horas después de la ovulación, los primeros corpúsculos polares de los mamíferos euterios tienen generalmente una vida más corta (Boiso y col, 2002). Teniendo en consideración esta dependencia del tiempo, se puede postular que la morfología del primer corpúsculo polar proporciona información adecuada de la edad post-ovulatoria del ovocito Ebner y col, 2006).

Por otra parte, los ovocitos con un primer corpúsculo polar intacto y bien formado, se ha comprobado que tienen mejor fecundación y calidad embrionaria. En consecuencia, también se obtienen mayores tasas de implantación y gestación, probablemente debido al incremento de la formación de blastocistos (Ebner y col, 2002).

3.2.3.3.-Huso meiótico

Un cierto porcentaje de ovocitos muestran un primer corpúsculo polar y sin embargo no han acabado la maduración nuclear. De hecho, se ha encontrado

que ovocitos con primer corpúsculo pero sin un huso birrefringente pudiera estar en telofase I o prometafase I (De Santis y col, 2005).

Recientemente, la introducción del microscopio de luz polarizada favorece la publicación de numerosos estudios que coinciden en el pronóstico negativo si el huso no es detectable o con una desviación de más de 90° desde la localización del primer corpúsculo polar (Rienzi y col, 2003). Alto grado de no alineación entre el huso meiótico y el primer corpúsculo polar predice un riesgo aumentado de anomalías de fecundación. Sin embargo, cuando tiene lugar la fecundación normal, el potencial de división de estos embriones no está afectado. Estos descubrimientos facilitan la selección de ovocitos para ICSI en situaciones en que debe evitarse la creación de embriones supernumerarios.

3.2.3.4.- Textura del citoplasma

La presión intracelular y la fluidez del citoplasma solo pueden ser estimadas cuando la pipeta de microinyección penetra en el oolema. Otro indicador de la viscosidad del ooplasma es la adhesión a la pipeta de microinyección. No obstante, estas observaciones son estrictamente empíricas y no pueden ser medidas adecuadamente. (Ebner y col, 2006).

La calidad de los cigotos derivados de ovocitos viscosos así como la de los embriones y blastocistos, no obstante, está seriamente disminuida. (Ebner y col 2003).

Se han descrito otras anomalías en la textura y densidad del citoplasma, como puede ser la granularidad, que puede ser homogénea, afectando a todo el gameto, o localizada centralmente. Esta última se ha correlacionado negativamente con la tasa de gestación dependiendo del grado de granularidad central (Kahraman y col, 2000). (Figura 2).



Figura 2

Ovocito con inclusiones citoplasmáticas

3.2.3.5.- Inclusiones

Las vacuolas así como las agregaciones de retículo endoplasmático liso se encuentran entre las características citoplasmáticas que más impiden la capacidad de desarrollo de los ovocitos. (Ebner y col 2005) (Figura 3).



Figura 3

Ovocito vacuolado

3.2.3.6.- Otras anomalías

De acuerdo con la literatura, el riesgo de producir ovocitos con anomalías en el citoplasma aumenta con los niveles de estradiol el día de la inyección de hCG. Esto podría deberse al hecho de que se ha producido un reclutamiento folicular en la inducción en unos folículos que in vivo hubieran quedado atrésicos. (Otsuki y col, 2004).

Un fenómeno similar ocurre en pacientes expuestos a altas dosis de gonadotropinas: granularidad del espacio perivitelino, dimorfismo y menores tasas de gestación (Hassan-Ali, y col 98).

Cualquier desviación de la microinyección normal (dificultad para romper la membrana, etc), podría indicar un cambio en la estructura tridimensional del ovocito que puede ocasionar problemas cuando tienen lugar el hatching (Ebner y col, 2002).

Algunas veces los ovocitos tienen una forma redondeada, pero el problema de dimorfismo es debido a la zona pelúcida. Si tanto la zona pelúcida como el ovocito están implicados en la distorsión, los embriones muy probablemente tengan una incompetencia de desarrollo (Figura 4). El descenso en el número de uniones estrechas intercelulares podría causar el retraso en la formación del blastocelo y la total expansión del blastocisto antes del día 6 (Ebner y col 2004).

En resumen: las anomalías ovocitarias y sus implicaciones pueden tener distintos orígenes y conse-



Figura 4

Ovocito con zona pelúcida anómala

cuencias. Las originadas en la maduración temprana pueden estar asociadas a fallos de fecundación y aneuploidias, mientras que aquellos que tienen lugar en las últimas etapas de la maduración pueden expresar fallo de desarrollo a pesar de la fecundación normal. La fusión de ovogonias, granulación oscura central y fallo en la formación del huso central puede ocurrir en la maduración temprana (riesgo de aneuploidia) mientras que la vacuolización y formación de agregados de retículo ocurrirán más tarde (problemas de división embrionaria) (Van Blerkom and Henry, 92).

En cualquier caso, la importancia de la morfología ovocitaria no debe ser subestimada.

4.- EL ZIGOTO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

4.1.- Aspectos teóricos

4.1.1.- Fisiología de la fecundación

La fecundación es un momento altamente significativo en la concepción. Imposible determinarlo in vivo, su fallo pudiera ser la principal causa de infertilidad humana. Los espermatozoides ascienden por el tracto reproductivo femenino uniéndose al epitelio del oviducto, y liberándose en grupos listos para la fecundación. Los espermatozoides unidos a la zona pelúcida tienen que sufrir la reacción acrosómica, uniéndose la membrana acrosomal externa con la interna. Este cambio es inducido cuando el espermatozoide se une a la ZP3 y posteriormente a la ZP2 en la zona pelúcida.

La unión del espermatozoide al ovocito determina su activación, estimulando la complejión de la meiosis II y la extrusión del primer corpúsculo polar. Las rotaciones del huso meiótico durante la anafase y telofase hacen que se expelan la mitad de los cromosomas meióticos en el segundo corpúsculo polar, quedando el resto en el ooplasma.

Los ovocitos durante el proceso de fecundación muestran otros movimientos que podrían ofrecer un marcador potencial de calidad embrionaria. El ooplasma rota en el sentido de las agujas del reloj entre que ha completado la maduración y la entrada del espermatozoide. Por razones desconocidas, el eje polar también sufre rotación, quizás controlado por el aster del espermatozoide, lo cual podría llevar el eje del ovocito en línea con la cabeza del espermatozoide fecundante en algunos ovocitos (Edwards and Beard, 97). Desafortunadamente, esto solo puede medirse in Vitro con mucha dificultad.

Después de la fecundación se forman dos pronúcleos: inicialmente uno mayor, el masculino, y otro menor, el femenino, localizado cerca del corpúsculo polar, el cual marcará el segmento animal del ovocito. Los pronúcleos aumentan de tamaño y se juntan (aposición) formándose nucleolos dentro de cada uno de ellos. Inicialmente pequeños, y en similar número en ambos pronúcleos, los nucleolos aumentan de tamaño y se distribuyen al azar dentro del nucleoplasma pronuclear. Entonces empiezan a moverse para juntarse en los pronúcleos durante la aposición para colocarse polarizados, adyacentes a las membranas pronucleolares. Los nucleolos son los lugares activos de la síntesis de RNAr. La unión de los mismos promueve un incremento en la síntesis de proteínas. (Payne et al, 97). Hacia el fin del estado de una célula (zigoto), los pronúcleos se decondensan para producirse la singamia y la primera división celular. Esta primera división tiene lugar sobre las 24 horas post fecundación, una vez que el centriolo espermático ha organizado el huso mitótico (Figura 5),

La asincronía en la formación y polarización de los nucleolos puede perjudicar severamente el desarrollo posterior del embrión (Van Blerko, 90)

La entrada del espermatozoide en el ovocito implica rápidos cambios bioquímicos en el gameto masculino hasta transformarse en pronúcleo: el empaquetamiento de la cromatina se reorganiza y las protaminas son sustituidas por histonas.

Inicialmente, el desarrollo del zigoto y primeras divisiones embrionarias son regulados por genes maternos y proteínas heredadas del ovocito. Los efectos maternos comienzan a ser menos evidentes conforme avanza el desarrollo embrionario.

La forma, tamaño y topografía de las mitocondrias cambian después de la entrada del espermatozoide. Algunas se concentran en el ooplasma, cerca del aster espermático en las regiones peri-pronucleares.

Inmediatamente antes del crecimiento de los pronúcleos, los orgánulos del citoplasma se contraen desde el cortex hacia el centro del ovocito, formándose el efecto “halo” (Payne y col, 97). Este fenómeno, que es una manifestación de la contracción de las mitocondrias y otras estructuras citoplasmáticas como el retículo endoplasmático y aparato de Golgi y que es mediada por los microtúbulos, ha sido documentada en mamíferos incluidos los humanos (Bavister y Squirrell, 2000) y es tenido en cuenta en la evaluación de los mismos como un efecto positivo.



Figura 5

Zigoto con los nucleolos de los pronúcleos alineados

4.1.2.- Anomalías de la fecundación

A veces se puede formar un número inusual de pronúcleos después de la fecundación: uno, tres o más de tres. Si no se observan pronúcleos ni corpúsculo polar tras la fecundación pudiera ocurrir que el huso meiótico ha pasado fuera del ovocito, como ocurre en pacientes con mola hidatiforme recurrentes (Edwards and Brody, 95).

Cuando el ovocito solo tiene un pronúcleo después de la fecundación, puede ser por distintas causas. Puede ser por activación partenogenética (25-30% de los casos), sobre todo después de ICSI (Munné and Cohen, 98). Otra causa puede ser la formación retrasada de uno de los pronúcleos o la fusión de dos pronúcleos (Nagy, 94). Errores meióticos en la segregación cromosómica podría tener las mismas consecuencias.

Más de dos pronúcleos implican polispermia por penetración de más de un espermatozoide, o retención del segundo corpúsculo polar en el ovocito. La fecundación implicando dos espermatozoides (dispermia), produce ovocitos con tres pronúcleos y dos corpúsculos polares. Esta anomalía es relativamente fre-

cuente en Fecundación in Vitro convencional y puede originar dos asters espermáticos y husos tripolares en la singamia, conduciendo a anomalías segregacionales complejas. La mayoría de los casos se paran después de divisiones irregulares y fragmentación. Otras veces se desarrollan como mosaicos, y unos pocos como puros triploides (Munné y Cohen, 98).

La diginia se origina cuando el segundo corpúsculo polar es retenido en el ovocito. Esto origina tres pronúcleos, dos de ellos maternos. Esta condición (diginia monospermica) afecta al 4% o menos de los ovocitos fecundados, sobre todo en ICSI. La mayoría se desarrollan como triploides uniformes, indicando que la singamia implica tres pronúcleos con un solo huso bipolar.

4.2.- Aspectos prácticos: evaluación de los cigotos en el laboratorio

Hasta el momento se han utilizado muchas estrategias para la selección del embrión con mayores posibilidades de implantación para transferir. Una de ellas es la selección de embriones en pronúcleos. El trabajo original de Scout and Smith en 1998 hadado origen a varios estudios sobre el valor pronóstico del patrón de cigotos, teniendo en cuenta: cuerpos precursores nucleolares, halo citoplasmático y orientación y tamaño de los pronúcleos. Recientemente, Senn y col (2006) han realizado un trabajo en el que utilizan un patrón acumulado donde tienen en cuenta la suma de los siguientes patrones: proximidad de los pronúcleos, orientación de los pronúcleos con respecto a los corpúsculos polares, centrado de los pronúcleos, halo citoplasmático, número de cuerpos precursores nucleolares y polarización de los mismos. En este estudio concluyen que este patrón puede utilizarse como única herramienta pronóstica para determinar la posibilidad de implantación de cigotos tanto en fresco como descongelados.

Sin embargo, en este mismo año, James y col, en un trabajo similar, no encuentran correlación entre el patrón pronuclear y la tasa de embarazo.

Quizás hay más unanimidad en el criterio de división temprana, como índice pronóstico positivo de los cigotos, como lo demuestra un estudio realizado por Fancsoyits y col (2005), en el que correlacionan la división temprana con el éxito en la selección embrionaria.

La división temprana a las 25-27 horas post inseminación, se ha manifestado en numerosos estudios como un índice muy efectivo de selección embrionaria (Fenwick y col, 2002). La razón por la que la división temprana origina embriones más viables y alcan-

za mayores tasas de gestación es desconocida, pero se postula que los cigotos que se producen son derivados de ovocitos con una adecuada sincronización entre maduración nuclear y citoplasmática (Lundin y col, 2001).

5.- EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES EN EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

5.1.- Aspectos teóricos

Las blastómeras de los embriones de dos células son relativamente indiferenciadas. Los embriones de 4 células son producto de la división meridional, en un embrión de dos células, de una de las dos blastómeras y transversal de la otra. Tres divisiones 2,5 días después de la fecundación producen embriones de 8 células. Aunque la mayoría de las blastómeras tienen una morfología normal, otras producen fragmentos, adyacentes al lugar de la citocinesis. Grandes fragmentos son indicativos de apoptosis o muerte celular.

La polaridad celular, opuesta a la polaridad embrionaria, llega a ser importante en embriones de 8 células. Las uniones gap se forman en las membranas de estos embriones y en estadios más avanzados de división. Poblaciones morfológicamente distintas de células internas (precursores de la masa celular interna) y células externas (precursores del trofoblasto) se segregan en el embrión de 16 células, cuando tiene lugar la compactación. Se forma entonces la mórula y las líneas celulares comienzan a tener su propia actividad génica. La masa celular interna se localiza excéntricamente en el embrión y contiene numerosas células troncales ya pertenecientes a varios tejidos. La masa celular externa de mórulas y blastocistos producen el trofoblasto, el primer tejido diferenciado para unirse al epitelio endometrial en la implantación.

5.2.- Aspectos prácticos

La comprobación de la morfología embrionaria, aunque es imperfecto, actualmente el método más popular de selección embrionaria para la transferencia.

Los parámetros morfológicos que pueden utilizarse para evaluar la calidad de un embrión son:

5.2.1.- Zona pelúcida

La zona pelúcida es una cubierta extracelular que consiste en unas pocas glicoproteínas altamente modificadas que rodean al embrión de los mamíferos entre el estadio de cigoto y el blastocisto. El grosor de

la zona pelúcida se ha medido en gran número de estudios: la mayoría apuntan a unas 10 micras (Betteridge, 95). No obstante, el grosor de la zona desciende durante el desarrollo embrionario debido a la expansión del blastocele y esta característica puede ser de ayuda como marcador de la calidad embrionaria.

5.2.2.- Espacio perivitelino

La expansión anómala del espacio perivitelino puede ser consecuencia de la hidratación de la envuelta de gránulos corticales del embrión, como ha sido propuesto por Dandekar and Talbot (92). La reducción en el tamaño del espacio perivitelino es un marcador de la reducción de la calidad embrionaria, y está relacionado con la menor compactación cuando llega al estadio de mórula.

5.2.3.- Fragmentación

La presencia de gran cantidad de células o fragmentos que extruyen del embrión, se considera como mala calidad embrionaria y es uno de los más importantes criterios empíricos de selección embrionaria (Antczak and Van Blerkom, 99). Ocurre con relativamente frecuencia (41%) entre el estado de 1 y 8 células. En los embriones humanos, la fragmentación puede ser clasificada en cinco patrones distintos (Alikani et al, 99), y la transferencia de embriones con mayor fragmentación produce menor tasa de implantación que los embriones sin fragmentos o en menor grado (Alikani, y col, 99). La clasificación está expresada como el porcentaje del volumen del embrión ocupado por fragmentos. El porcentaje de fragmentación está correlacionado con el mosaicismos, pero no con la aneuploidia (Munne y Cohen, 98, 2006).

Una de las principales razones propuestas para la baja tasa de implantación de estos embriones es que los fragmentos situados cerca de un posible eje de división, podrían ejercer un efecto negativo sobre la polaridad del embrión, limitando la posibilidad de implantación.

No hay a penas trabajos publicados sobre el nacimiento de niños con embriones grandemente fragmentados, pero los que hay (> 50% de fragmentación) evidencian resultados perinatales peores que con embriones normales (Ebner y col, 2001).

Ya que la fragmentación citoplasmática es una de las señales de apoptosis o muerte celular programada (Hardy and Spanos, 2002), la fragmentación, por ello, podría ser un marcador no invasivo de la apoptosis en el embrión, lo cual, cuando ocurre en exceso (espe-

cialmente en la masa celular interna), podría ser desastroso para la capacidad de implantación del embrión. La formación de blastocistos está seriamente comprometida cuando la fragmentación es mayor del 15%. (Alikani, 99).

Por otra parte, ciertos embriones con fragmentación no demasiado acusada, pueden “mejorar” y reabsorber los fragmentos después de cultivo in Vitro, por lisis o por reabsorción (Van Blerkom y col, 2001).

5.2.4.- Desarrollo del embrión

El estado de división del embrión es otra forma de clasificación de los mismos. En general, se ha demostrado que la velocidad de división de los embriones está asociada a la capacidad de formación de blastocistos y su potencial implantatorio (Bavister, 2000). Embriones en día +2 con 4 blastómeras y en día +3 con 8 blastómeras, tienen mayor capacidad que con 2 o 4 respectivamente. También se ha demostrado que tienen mayor capacidad de implantación los embriones con blastómeras iguales y en número par (Ebner, 2003).

5.2.5.- Presencia de blastómeras multinucleadas

La presencia de múltiples núcleos en las blastómeras no es infrecuente, y es una señal importante de reducida viabilidad.

Dos tercios de las blastómeras multinucleadas implican defectos de división en las células mononucleadas parentales, tales como defectos de migración cromosómica, nuclear fragmentación, fallo de división o errores en el empaquetamiento nuclear (Pickering, 95). La multinucleación en los primeros estadios, pero no en los de 8 células y después, compromete la implantación y la diploidia (Sandalinas, 2001). La separación desordenada de los cromosomas en anafase y telofase origina embriones mosaico (Kligman, 96), aunque la progenie de las blastómeras multinucleadas no es siempre anómala (Staessen, 98).

5.2.6.- Embriones con blastómeras irregulares

Las blastómeras irregulares podrían ser una manifestación de una distribución desigual de material genético. Se ha publicado que un número significativo de blastómeras afectadas de aberraciones cromosómicas corresponden a embriones con blastómeras irregulares (29,4%), comparadas con embriones normales (8,5%) (Hardarson y col, 2001). Como consecuencia, este tipo de embriones tienen un reducido potencial de implantación.

En base a todos estos criterios de selección, el

embrión óptimo para transferir sería: con 4 células, blastómeras no multinucleadas, regulares y menos del 20% de fragmentos en día 2, y 8 células, blastómeras no multinucleadas, regulares y menos del 20% de fragmentos en día 3 (Figura 6).



Figura 6

Embrión de 8 células, grado 1 en día +3

5.2.7.- Formación de blastocistos in Vitro.

La producción de blastocistos se considera como una señal para la eficiencia de los cultivos in Vitro. Sin embargo, se pueden producir blastocistos a pesar de condiciones ambientales deficientes (McEvoy, 2001).

El momento de formación de blastocistos puede ser un buen indicador de calidad embrionaria, ya que los embriones que cavitan temprano tienen mayor calidad que los que lo hacen tardíamente (Van Soom, 97). Se han encontrado diferencias en la expresión génica de embriones entre día 7 y 8 (Wrenzycki, 2003).

Los blastocistos expandidos en el día 5 originan mayores tasas de gestación que los que lo hacen en día 6 (Shoukir, 98).

La calidad de los blastocistos se mide en función de: tamaño de la masa celular interna, áreas de necrosis, compactación de la masa celular interna, expansión del blastocele, desarrollo del trofoectodermo y estado de la zona pélucida (Gardner, 2000). Los embriones óptimos implican compactación en el día 4, cavitación entre los días 5 y 6 y hatching en el día 7. (Figura 7)

5.2.8.- Relación entre calidad embrionaria y anomalías cromosómicas.

En un reciente artículo publicado por Munné y col (2006), se hace una revisión de la relación entre mala calidad embrionaria, desarrollo embrionario porcentaje de anomalías cromosómicas. En este trabajo se comenta que las anomalías cromosómicas producidas



Figura 7

Blastocisto cavitado, grado 1 en día +5

en embriones de reproducción asistida es más del 50%, independientemente de la edad materna. Mientras que las aneuploidias aumentan con la edad materna, anomalías post-meióticas, tales como mosaicismo, embriones caóticos, poliploidia y haploidía, tienen una incidencia similar en todos los grupos de edad (alrededor del 33%). Las anomalías post-meióticas aumentan con el dimorfismo. Uno de los más comunes encontrados en los embriones es la multinucleación, fragmentación y células desiguales entre otros. Todos los dimorfismos están asociados con un incremento en las anomalías post-meióticas y un descenso en el potencial de implantación.

Estudios cromosómicos en blastocistos indican que el mosaicismo es la anomalía más común, pero que desciende conforme la calidad del blastocisto es mayor. Sin embargo, a pesar de la calidad del blastocisto, más del 40% de los mosaicismos pueden ser embriones normales con anomalías cromosómicas, que no implantan o sufren abortos tempranos. Ya que la aneuploidia no está relacionada con el estadio de división, embriones dismórficos y trisómicos pueden alcanzar el estado de blastocisto.

5.2.9.- Breves consideraciones sobre la criopreservación embrionaria.

En todos los programas de Reproducción Asistida en los que se realiza Fecundación in Vitro, es necesaria la congelación embrionaria. Sin embargo, son muchos los centros que se quejan de las bajas tasas de supervivencia embrionaria post descongelación y/o baja tasa de gestación.

El éxito de un programa de criopreservación embrionaria se basa únicamente en dos aspectos esenciales: congelación de embriones de buena calidad (con menos del 20% de fragmentación) y un buen programa de congelación embrionaria.

La congelación de embriones de buena calidad a

veces es motivo de controversia entre ginecólogos y biólogos. El ginecólogo quiere a veces, ofrecer embriones congelados a la pareja, a toda costa. Y la consecuencia es que en la descongelación, si no han sido embriones idóneos, no sobrevivirán, con lo que el laboratorio será entonces, a ojo de los clínicos, el responsable de tal circunstancia.

Además de la baja fragmentación, un embrión apto para la congelación tiene que estar exento de vacuolas, en condiciones idóneas de división, y con ausencia de blastómeras multinucleadas. Solo así se podrá garantizar una óptima supervivencia, que, en términos generales, oscila entre el 75 y el 80% de los embriones.

Por otra parte, la congelación embrionaria per se, se basa en la adecuación progresiva de los embriones hasta el medio de congelación, carga de las pajuelas, y posteriormente introducción de las mismas en un criocongelador con una rampa de congelación programada. Este proceso, en si mismo sencillo, puede a veces fallar (y es lo que con más frecuencia nos hemos encontrado), al realizar de forma inadecuada el "seeding". Este tiene que realizarse, de forma manual, a los -7°C, de forma rápida, para permitir que la subida espontánea de temperatura que sufren los embriones por el calor que se libera, se contrarreste con la que realizamos nosotros en el laboratorio.

CONCLUSIONES

Como ya se ha comentado anteriormente en la introducción, la base para el éxito en Reproducción Asistida es que haya un equipo multidisciplinario con colaboración mutua. En este sentido, es vital la relación entre clínicos y laboratorio. Ambos puntos de vista no tienen por qué estar enfrentados, sino ser complementarios. Tampoco cabe la idea de quien es más importante en cuanto a los resultados de gestación.

Con frecuencia, en muchos centros se culpa al laboratorio cuando se produce una bajada de resultados, y sin embargo los biólogos se quejan de que los éxitos nunca son achacados al mismo. Quizás esto viene como consecuencia de que cualquier alteración negativa en el laboratorio (medios de cultivo, aparataje, medio ambiente, etc), tiene una afectación más drástica en la tasa de fecundación y desarrollo embrionario. Pero no debemos de olvidar que ninguno puede trabajar sin la presencia del otro. Y el aumento del conocimiento de las técnicas del laboratorio por el ginecólogo, así como de los protocolos de inducción y técnicas que realizan los clínicos por los biólo-

gos, redundará en un mayor éxito para todos, y por supuesto, para las pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, and Scott RT.:** Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil. Steril*, 1999; 71: 836-842.
2. **Antczak M, and Van Blerkom J.:** Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum. Reprod.*, 1999; 14: 429-447.
3. **Bavister BD, and Squirrell JM.:** Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum. Reprod.*, 2000; 15 (Suppl. 2), 189-198.
4. **Betteridge KJ.:** Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology*, 1995; 44: 1061-1098.
5. **Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, and Squire JA.:** Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum. Reprod.*, 2002; 17: 2394-2401.
6. **Bedford JM, Calvin H, Cooper GW.:** The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil.*, 1973; 18 (Suppl): 199-213.
7. **Burkman LJ.:** Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Claude Gagnon Eds., CRC Press, Boca Raton., Fl., 1990.
8. **Boiso I, Veiga A and Edwards E.:** Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. (2002) *RBM On line*, vol 5, nº 3, 328-350.
9. **Claassens OE, Menkveld R, Franken DR et al.:** The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Human Reprod.*, 1992; 7: 242-247.
10. **Coccia ME, Becattini C et al.:** A sperm survival test and in vitro fertilization outcome in the presence of male factor infertility. *Human Reprod*, 1997; 12/9; 1969-1963.
11. **Dandekar P, Talbot P.:** Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 1992; 31: 135-143.
12. **De Santis L, Cino I, Rabellotti E, et al.:** Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reproductive BioMedicine Online*, 2005; 11: 36-42.
13. **Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RCM, van Wissen LCP, Geraedts JPM, and Evers JLH.:** Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum. Reprod*, 2001; 16: 306-312.
14. **Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Poeger U, and Tews G.:** First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum. Reprod.*, 2002; 17: 2415-2418.
15. **Ebner, Moser, Sommergruber and Tews.:** Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: review. *Hum Reprod Update*, 2003.
16. **Ebner et al.:** Development competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod*, 2003.
17. **Ebner T, Moser M, Sommergruber M et al.:** Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and Sterility*, 2005; 83: 1635-1640.
18. **T Ebner, M Moser, G Tews.:** Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive BioMedicine Online*, 2006; 12 (4), 507-512.
19. **Edwards RG, and Beard HK.:** Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997; 3: 863-905.
20. **Edwards RG, Brody SA.:** Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. WB, Saunder, Philadelphia, USA, 1995.
21. **Fansovits P, Toth L, Takacs ZF, Murber A, Papp Z and Urbancsek J.:** Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. *Fertil Steril*, 2005; 84 (4) 881-887.
22. **Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, and Schoolcraft WB.:** Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil. Steril.*, 2000a; 73: 1155-1158.
23. **Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ et al.:** Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril*; 1994; 62: 559-567.
24. **Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, and Lundin K.:** Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.*, 2001; 16: 313-318.
25. **Hardy K, Spanos S.:** Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinology*, 2002; 172 (2), 221-236.
26. **Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D et al.:** Perivitelline space granularity: a sign of human meno-

- pausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 1998; 13: 3425-3430.
27. **James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J.:** The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod*, 2006; 21: 345-356.
 28. **Kahraman S, Yakin K, Do»nmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz C, Sertyel S, Samli M, and Imirzalioglu N.:** Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 2000; 15: 2390-2393.
 29. **Kligman I, Benadiva C, Alikani M, and Munne S.:** The presence of multinucleated blastomeres in human embryos correlates with chromosomal abnormalities. *Hum. Reprod.*, 1996; 11: 1492-1498.
 30. **McEvoy TG, Robinson JJ, Sinclair KD.:** Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction*, 2001; 122: 507-518.
 31. **Mortimer D, Courtot AM, Giovangrandi Y, Jeulin C and David G.:** Human sperm motility after migration into and incubation in, synthetic media. *Gamete Res*, 1984; 9, 131.
 32. **Mortimer D.:** Objective analysis of sperm motility and kinematics. In *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, Keek B.A and Webster B.W., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
 33. **Gomez E, and Aitken J.:** Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa, *Fertil Steril*, 1996; 65: 880-882.
 34. **Munne, S, and Cohen J.:** Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod. Update*, 1998; 4: 842-855.
 35. **Munne S.:** Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod BioMedicine Online*, 2006; 12 (2): 234-253.
 36. **Nagy ZP, Verheyen, Torunaye H and Van Steirteghem AC.:** Special applications of intracytoplasmic sperm injection: The influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. (1998) *Human Reprod* 13, suppl 1(143-154).
 37. **Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen R, Van de Velde H and Van Steirteghem AC.:** Timing of oocyte activation, pronucleus formation, and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum.Reprod.*, 1998; 13: 1606-1612.
 38. **Núñez R, I. Vázquez, J. Alsina, S.Cortés, Caballero P.:** Test de supervivencia espermática a las 24 horas de incubación, en muestras de IAC. XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Tenerife, 1996.
 39. **Oehninger S et al.:** Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection ? *Human Reprod*, 1998; 13/8: 2161-2164.
 40. **Otsuki J, Okada A, Morimoto K et al.:** The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Human Reproduction*, 2004; 19: 1591-1597.
 41. **Payne D, Flaherty SP, Barry MF, and Mathews CD.:** Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear form score as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum. Reprod.*, 1997; 12: 705-708.
 42. **Pickering SJ, Taylor A, Hohnson MH, Braude PR.:** An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Hum Reprod*, 1995; 10: 1912-1922.
 43. **Plachot M.:** In vitro fertilization in case of male infertility. National survey. *Contracept.Fertil Sex*; 1987; 15/7-8: 699-700.
 44. **Rienzi et al.:** Hum Reprod Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI, 2003.
 45. **Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, and Munne,S.:** Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum. Reprod.*, 2001; 16: 1954-1958.
 46. **Scott LA, and Smith S.:** The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum. Reprod.*, 1998; 13: 1003-1013.
 47. **Senn A, Urner F, Chanson A, Prime MP, Wirthner D and Germond M.:** Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum Reprod*, 2006; 21: 234-239.
 48. **Serchioli R, Porcu EE, Falmingi C.:** Sperm morphology is not the only criteria of male infertility. *Human Reprod*; 1995; 10: 1039-1041.
 49. **Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, and Sakkas D.:** The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Hum. Reprod.*, 1998a; 13:671-681.
 50. **Staessen C, Van Sterteghem AC.:** The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum Reprod*, 1998; 13: 1625-1631.
 51. **Svalander P, Jakobsson A et al.:** The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to strict criteria sperm morphology, *Human Reprod*, 1996; 11: 1019-1022.
 52. **Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S, Lahraman**

- S, Biberoglu I.:** Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome intracytoplasmic sperm injection in humans. *Human Reprod* 1997; 12 (6): 1214-7.
53. **TroLoudes DM et al.:** Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intraytoplasmic sperm injection treatment., *Human Reprod*, 1995; 10/4: 880-882.
54. **Van Blerkom J. and Henr, G.:** Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically-mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum. Reprod.*, 1992; 7: 379-390.
55. **Van Blerkom J.:** Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature oocytes after exogeneous ovarian hyperstimulation. *J. Electron Microsc. Technique*, 1990; 16: 324-346.
56. **Van Blerkom J, Davis P, and Alexander S.:** Differential mitochondrial inheritance between blastomeres in cleavage stage human embryos: determination at the pronuclear stage and relationship to microtubular organization, ATP content and developmental competence. *Hum. Reprod.*, 2000; 15: 2621-2633.
57. **Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR et al.:** Compactation rate of in-vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, 1992; 38: 905-919.
58. **Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H.:** Timing of blastocyst expansion affects spatial mRNA expression patterns of genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction*, 2003; 68: 2073-2080.