

# ASEBIR

Revista de Embriología Clínica  
y Biología de la Reproducción

NOVIEMBRE  
2021

VOL. 26 Nº 2



*XI Congreso*  
**ASEBIR**  
*Toledo 2021*

PONENCIAS

COMUNICACIONES  
ORALES

COMUNICACIONES  
PÓSTER



Micropipetas



Aceites y  
medios



Vitrificación



Agujas de  
punción



Catéteres de  
transferencia

¿A qué esperas para  
conocer nuestros  
productos?

# ASEBIR

## Índice

.....

**05 EDITORIAL**  
XI Congreso ASEBIR. Bienvenida  
Antonio Urries López,  
*Presidente ASEBIR*

.....

**06 XI CONGRESO ASEBIR**  
Información  
Comités y Premios  
Programa científico

.....

**20 PONENCIAS**

- 21** Sesión de INVESTIGACIÓN
- 22** DEBATE
- 24** Sesión de CRIOBIOLOGÍA
- 28** Sesión de EMBRIOLOGÍA
- 39** Sesión de ANDROLOGÍA
- 50** Premio EMB-ASEBIR 2019
- 63** Sesión de GENÉTICA
- 69** Sesión de CALIDAD

.....

**80 COMUNICACIONES ORALES**

.....

**120 COMUNICACIONES PÓSTERS**

.....

# ASEBIR

## Editores

### EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

### EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Laura Mifsud i Elena. Hospital Quirónsalud, Valencia  
Beatriz González López De Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra  
Yosu Franco Iriarte. Hospital Ruber Internacional, Madrid

### COMITÉ EDITORIAL

#### Presidente:

Antonio Urries López. Hospital Quirónsalud, Zaragoza

#### Vicepresidente:

Mark Grossmann i Camps. Barcelona IVF, Barcelona

#### Secretaría:

Beatriz González López de Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra

#### Tesorero:

Nicolás Prados Dodd. IVI Sevilla, S.L., Sevilla

#### Grupos de Interés:

Belén Buch Tomé. Centro Gutenberg, Málaga  
Nicolás Prados Dodd. IVI Sevilla, S.L., Sevilla

#### Docencia y Formación:

Antonio Alcaide Raya. REPROFIV, Madrid  
Cristina Camprubí Sánchez. GenIntegral, Reference Laboratory Genetics, UAB, Barcelona  
Francisco Javier Vendrell Montón. Sistemas Genómicos, S. L., Paterna, Valencia

#### Congresos, Publicaciones e I+D:

Laura Mifsud i Elena. Hospital Quirónsalud, Valencia  
Beatriz González López De Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra  
Yosu Franco Iriarte. Hospital Ruber Internacional, Madrid

### Tecnología de la información y comunicación:

Abel Gayo Lana. Clínica ERGO, Gijón  
Enrique Olaya Vila. VITA Medicina Reproductiva, Elche, Alicante

La Revista de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) está indexada en las bases de datos ICYT, de ciencia y tecnología, e IME, de Biomedicina, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España y en las bases de datos LATINDEX, para Iberoamérica y CUIDEN®, de la Fundación Index.

### PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR  
C/ Cronos 20, Edificio 4, 1º, 6ª  
28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94  
www.asebir.com · asebir@asebir.com

### DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Take it Easy Comunicación  
Paseo Ruiseñores, 9, 50006 Zaragoza  
tiecomunicacion.es · comunicacion@tiecomunicacion.es  
Tfno.: 876 64 29 97

Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424

Soporte válido: 78-R-CM

*ASEBIR no se responsabiliza de las opiniones vertidas en el contenido de esta revista*



**BIENVENIDA**

**XI CONGRESO ASEBIR**

Estimados amigos y colegas,

Parecía que el momento no iba a llegar pero lo hemos conseguido por fin.

Ya estamos aquí, en nuestro Congreso, el XI Congreso Nacional de ASEBIR, y si veis el programa, ha vuelto a ser un éxito. Tanto a nivel participativo como de altura científica.

Y todo ello ha sido posible gracias al Comité Científico y Organizador del Congreso, liderado por nuestro compañero Ramón José Suárez, "Mon", que a pesar de todos los problemas actuales han trabajado duramente en el éxito de esta reunión. Y, por si fuera poco, en el entorno incomparable que nos está regalando esta magnífica ciudad que es Toledo.

Naturalmente no podemos dejar de mencionar nuestro agradecimiento a todas las empresas e instituciones que se han volcado con nosotros en sacar adelante este proyecto.

Y permitirme una reflexión final: en todos los Congresos hemos podido presumir de una alta calidad científica, pero en estos momentos creemos necesario destacar otro punto para nosotros muy importante: Toledo 2021 va a ser el momento y lugar de nuestro reencuentro, demostrando que seguimos aquí con más fuerza si cabe.

**Antonio Urries López**

*Presidente de ASEBIR*



# XI CONGRESO ASEBIR



XI Congreso  
**ASEBIR**  
Toledo 2021

## INFORMACIÓN

### FECHAS

17, 18 y 19  
de noviembre  
de 2021

### SEDE

Palacio de Congresos  
El Greco,  
Paseo Miradero,  
s/n, 45003 Toledo

### WEB

[www.congresoasebir.es](http://www.congresoasebir.es)

### CRÉDITOS

La acción formativa: XI CONGRESO ASEBIR TOLEDO 2021, con número de Registro: P-2021-14714, ha sido acreditada por la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de Castilla-La Mancha con 1,3 créditos.

Recomendamos consultar los REQUISITOS PARA LA OBTENCIÓN DE CRÉDITOS [www.asebir.itchosting.es/creditos/](http://www.asebir.itchosting.es/creditos/)

### AUSPICIOS

Actividad auspiciada por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) y la Sociedad Española de Contracepción (SEC)

### SECRETARÍA TÉCNICA

GRUPO PROCESS, Betaprocess, S.L.  
C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª  
Madrid 28037

Tel: +34 91 377 14 23

E-mail: [info@congresoasebir.es](mailto:info@congresoasebir.es)

[inscripciones@congresoasebir.es](mailto:inscripciones@congresoasebir.es)

GRUPO  
**PROCESS**  
SMART EVENT

# XI CONGRESO ASEBIR

## COMITÉS Y PREMIOS

### COMITÉS

#### **Presidente Comité Científico y Organizador Local:**

Ramón José Suárez García

#### **Vocales Comité Científico**

Carmen Cañadas Gálvez

Minerva Ferrer Buitrago

Yosu Franco Iriarte

José Luis Girela López

Beatriz González López de Bustamante

M<sup>a</sup> Victoria Hurtado de Mendoza Acosta

Miriam Iglesias Nuñez

Pere Mir Pardo

José Muñoz Ramírez

Iván Ochando Sánchez

María Sánchez Toledo

Miquel Solé Inarejos

Antonio Urries López

Xavier Vendrell Montón

#### **Vocales Comité Organizador Local**

Icía García Escribano

Rosa Ana Garrido Esteban

Mark Grossmann i Camps

Laura Herraiz Nicuesa

Bienvenida María Lozano Ruiz

Clara Isabel Luna Cañas

Laura Mifsud i Elena

Beatriz Rojas Ruiz

Laura Ruiz Rincón

Verónica Sáez Martínez

### COMITÉ DE HONOR

#### **Excma. Sra. D.<sup>a</sup> Carolina Darias San Sebastián**

Ministra de Sanidad

#### **Excmo. Sr. D. Emiliano García Page**

Presidente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

#### **Ilmo. Sr. D. Jesús Fernández Sanz**

Consejero de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

#### **Excmo. y Magfco. Sr. José Julián Garde López-Brea**

Rector de la UCLM

#### **Dr. D. Vicente Carlos Silva Deustua**

Jefe de servicio de Ginecología del Hospital Virgen de la Salud de Toledo

### PREMIOS

#### **Premio EMB-ASEBIR 2021**

El premio estará dotado con diploma acreditativo y un premio en metálico de 5.000€ por gentileza del Grupo Equipos Médico-Biológicos.

El anuncio de la comunicación ganadora se hará el último día del Congreso, y la entrega del premio se realizará durante la Cena de Clausura por parte del Sr. Sergio Oliveró (Dir. Gral. Grupo EMB) y el Dr. Antonio Urries López (presidente de ASEBIR).

#### **Premio a la Innovación MERCK ASEBIR 2021**

El premio estará dotado con 3.000 € y un diploma acreditativo que será entregado, el 18 de noviembre según programa, por el Dr. Antonio Urries López, presidente de ASEBIR y por un representante de Merck.

#### **Premio ASEBIR al Mejor Póster 2021**

El ganador expondrá su trabajo en el Auditorio el viernes 19 de noviembre.

El premio será entregado, según programa, por el Dr. Antonio Urries López (presidente de ASEBIR) y estará dotado con diploma y 600 € para el ganador y diploma acreditativo para los 5 finalistas.

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

### PROGRAMA CIENTÍFICO

---

#### MIÉRCOLES 17 DE NOVIEMBRE

---

**10:00 - 11:00 h. INAUGURACIÓN** a cargo de Antonio Urries López, presidente de ASEBIR; Ramón J. Suárez García, presidente del Congreso y autoridades.

**11:00 - 12:30 h. SESIÓN 1 - Investigación traslacional e Innovación en Reproducción Humana.**

Moderadores: Minerva Ferrer Buitrago, Crea, Valencia y José Muñoz Ramírez, HM Hospitales Toledo

**11:00 - 11:45 h. Regulación de las técnicas de transferencia nuclear a nivel mundial.**

Ponente: César Palacios González, The Oxford Uehiro Centre for Practical Ethics. Oxford University. Oxford – UK.

**11:45 - 12:30 h. Genome editing in human embryos: latest results, prospects and translation to clinical practice.**

Speaker: Nuria Martí Gutiérrez, Center for Embryonic Cell and Gene Therapy, Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, EEUU

**12:30 - 13:30 h. DEBATE: El futuro del embriólogo clínico tras la automatización de los laboratorios.**

Moderadores: Minerva Ferrer Buitrago, Crea, Valencia y Xavier Vendrell Montón, ASCIRES, Valencia

Ponentes: Marcos Meseguer Escrivá, IVI Valencia, Valencia y Emilio Gómez Sánchez, TAHE Fertilidad, Murcia.

**13:30 - 15:00 h. Comida**

**15:00 - 16:30 h. SESIÓN 2 - Criobiología**

Moderadores: Miquel Sole Inarejos, Institut Universitari Dexeus, Barcelona y María Sánchez Toledo, Complejo Hospitalario Universitario De Albacete.

**15:00 - 15:45 h. Guía de recomendaciones sobre Criogenia.**

Ponente: Miquel Solé Inarejos, Institut Universitari DEXEUS, Barcelona.

**15:45 - 16:30 h. Criopreservación de tejido ovárico.**

Ponente: Christiani Andrade Amorín, UCLouvain (University of Louvain), Institut de recherche expérimentale et clinique, GYNE research group, Brussels, Belgium

**16:30 - 17:15 hrs. SYMPOSIUM MERCK: “La nueva era pospandemia en el laboratorio de reproducción asistida”**

Moderador: Nicolás Garrido. Fundación IVI. Valencia.

**Nuevas formas de trabajar en el laboratorio.**

Ponente: Llanos Medrano. IVF Spain. Alicante

**Casos de éxito en el uso de las tecnologías dentro y fuera del laboratorio.**

Ponente: Mónica Parriego. Dexeus Mujer. Barcelona.



# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

### 17:15 - 18:15 h. COMUNICACIONES CRIOBIOLOGÍA

Moderadores: Miquel Solé Inarejos, Institut Universitari Dexeus, Barcelona y María Sánchez Toledo, Complejo Hospitalario Universitario De Albacete.

17:15 - 17:25 h.

**CO-001 - Assisted hatching en embriones criopreservados. Estudio prospectivo, randomizado y con doble ciego.**

V. Montalvo Palles, A. Farreras Ayestaran, J. Massó Hernández, A. Garcia-Faura Cirera, B. Marques López-Teijón, M. López-Teijón Pérez.

Institut Marques - Barcelona (Barcelona)

17:25 - 17:35 h.

**CO-002 - Impacto de la estimulación ovárica en la supervivencia de ovocitos vitrificados.**

M. Poveda García (1), A. Aragón Esteve (1), S. Sánchez Macho (2), R. López Sánchez (1), E. Moya Gutiérrez (1), JM. Moreno García (1), R. Núñez Calonge (3), JJ. López Gálvez (1)

(1) Unidad de Reproducción Clínica Vistahermosa - Alicante (Alicante), (2) Unidad de Reproducción Montpellier - Zaragoza (Zaragoza), (3) Unidad de Reproducción Clínica Moncloa - Madrid (Madrid)

17:35 - 17:45 h.

**CO-003 - CRYOTOP vs CRYOLOCK: ¿un cambio de soporte implica un cambio en las tasas?.**

A. García Sifre, L. Ortega López, Y. Galiana Briones, A. Bosch Villegas, J. Aizpurua

IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

17:45 - 17:55 h.

**CO-004 - Impacto de los parámetros morfológicos y de desarrollo embrionario sobre la supervivencia y las tasas de implantación con blastocistos vitrificados.**

E Sánchez Chiva, P Campos Lozano, A Coello Perles, MJ De los Santos Molina, A Cobo Cabal

IVI Valencia - Valencia (Valencia)

17:55 - 18:05 h.

**CO-005 - La congelación de semen no afecta la tasa de nacido vivo en pacientes normozoospermicos: resultados de 6.594 ciclos de ICSI**

M. Torra Massana, M. Tutusaus Arenas, D. García García, R. Vassena, A. Rodríguez Aranda

Clínica Eugén - Barcelona (Barcelona)

18:05 - 18:15 h.

**CO-006 - Evaluación de la demanda teórica y real de criopreservación de la fertilidad femenina (CPF) en un sistema público: la necesidad de concienciar a los profesionales.**

MJ. Lupiáñez Giner, A. Clavero Gilabert, MC. Gonzalvo López, S. Rodríguez Guirado, E. Fernández Sierra, A. Sola Leyva

Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada)

### 18:15 - 20:00 h. Cóctel Inaugural

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

### JUEVES 18 DE NOVIEMBRE

---

#### 08:35 - 09:45 h. SESIÓN 3 - Embriología 1

Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza Acosta, Sevilla y M<sup>a</sup> del Carmen Cañadas Gálvez, Ginefiv, Madrid

08:35 - 09:10 h. Edición genética de embriones humanos para fines de investigación científica.

Ponente: Ana Veiga Lluch, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge. IDIBELL. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

09:10 - 09:45 h. Developmental potential of aneuploid human embryos cultured beyond implantation.

Speaker: Marta Shahbazi, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

#### 09:45 - 10:45 h. COMUNICACIONES EMBRIOLOGÍA 1

Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza Acosta, Sevilla y M<sup>a</sup> del Carmen Cañadas Gálvez, Ginefiv, Madrid

09:45 - 09:55 h.

CO-007 - Algoritmo KIDSCORED5TM V3 como herramienta de apoyo a la decisión de los embriólogos: asociación con riesgo de aneuploidía y potencial de implantación

A. Galán Rivas, L. Bori Arnal, F. Meseguer Estornell, MA. Valera Cerdá, L. Alegre Ferri, M. Meseguer Escrivá  
IVIRMA Valencia - Valencia (Valencia)

09:55 - 10:05 h.

CO-008 - Diferencias del desarrollo In Vitro entre embriones euploides y aneuploides detectadas por visión computacional: ¿podría la inteligencia artificial predecir la ploidía?

L. Bori Arnal (1), D. Beltrán Torregrosa (1), F. Meseguer Estornell (1), MA. Valera Cerdá (1), D. Gilboa (2), M. Meseguer Escrivá (1)  
(1) IVI Valencia - Valencia (Valencia), (2) AIVF - Tel Aviv (Israel)

10:05 - 10:15 h.

CO-009 - El uso de espermatozoides procedentes de biopsia testicular en ciclos de ICSI se asocia a un desarrollo más rápido de los embriones

M. Petrolo, F. Zambelli, D. García García, M. Martínez, A. Rodríguez Aranda, R. Vassena  
Clínica Eugén - Barcelona (Barcelona)

10:15 - 10:25 h.

CO-010 - Estudio del potencial del estado oxidativo del medio de cultivo como biomarcador de calidad y viabilidad embrionaria

MA. Valera Cerdá, A. Garg, L. Bori Arnal, F. Meseguer Estornell, T. Vilorio Samochín, M. Meseguer Escrivá  
IVIRMA Valencia - Valencia (Valencia)

10:25 - 10:35 h.

CO-011 - El análisis transcriptómico de la masa celular interna revela nuevos aspectos sobre la capacidad de desarrollo de los embriones mosaicos

A. Martín Bastida (1), A. Mercader Bayarri (2), F. Insua (2), A. Tejera Pastor (2), N. Grau Grau (2), L. Escrich Albelda (2), M. Nohales Corcoles (2), A. Delgado Mendibe (2), D. Beltrán Torregrosa (2), M.J. De los Santos Molina (2)  
(1) Fundación IVI-HIS La Fe - Valencia (Valencia), (2) IVI RMA - Valencia (Valencia)

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

10:35 - 10:45 h.

**CO-012 - Aplicación de la inteligencia artificial en la rutina clínica del laboratorio de FIV: clasificación embrionaria y predicción de resultados clínicos.**

A. Tejera Pastor, L. Bori Arnal, MA. Valera Cerdá, F. Meseguer Estornell, A. Garg, M. Meseguer Escrivá  
IVI Valencia - Valencia (Valencia)

**10:45 - 11:05 h. Pausa Café**

**11:05 - 12:15 h. SESIÓN 3 - Embriología 2**

Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza Acosta, Sevilla y Verónica Sáez Martínez, Quirónsalud, Ciudad real

**11:05 - 11:40 h. Las células madre en la medicina Reproductiva: ¿Están listas para el paciente?**

Ponente: Cristina Eguizabal Argaz, Grupo de Terapia Celular, Células Madre y Tejidos. Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos. IIS Biocruces Bizkaia.

**11:40 - 12:15 h. Estudio multicéntrico para la validación del criterio ASEBIR sobre la valoración morfológica de blastocistos.**

Ponente: M Carme Pons Gatell, Institut Universitari DEXEUS, Barcelona.

**12:15 - 13:05 h. COMUNICACIONES EMBRIOLOGÍA 2**

Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza Acosta, Sevilla y Verónica Sáez Martínez, Quirónsalud, Ciudad Real

12:15 - 12:25 h.

**CO-013 - Embriones que excluyen células multinucleadas durante la formación del blastocisto podrían autocorregir su contenido genético**

A. Munuera Puigvert, V. Montalvo Pallès, J. Massó Hernáez, A. García-Faura Cirera, B. Marquès López-Teijón, M. López-Teijón Pérez  
Institut Marquès - Barcelona (Barcelona)

12:25 - 12:35 h.

**CO-014 - ¿Está ejerciendo el test genético preimplantacional para aneuploidías (PGT-A) un efecto en los resultados perinatales?**

P. Muñoz Espert, L. Van os Galdós, L. Medrano López, J. Ballester Balaguer, J. Aizpurua  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

12:35 - 12:45 h.

**CO-015 - Efecto de técnicas de manipulación embrionaria en la incidencia de gemelación monozigótica en ciclos de ovodonación**

L Van Os Galdós, P. Muñoz Espert, LL. Medrano López, A. Garcia Sifre, J. Aizpurua Sáenz  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

12:45 - 12:55 h.

**CO-016 - Ovodonación: ¿existen diferencias en los resultados al utilizar ovocitos frescos o vitrificados?**

A. García Sifre, L. Ortega López, L. Van Os Galdós, A. Parrella, M. Enciso Lorences, J. Aizpurua  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

12:55 - 13:05 h.

**CO-017 - Estudio comparativo de la cinética embrionaria en ciclo natural vs ciclo con estimulación ovárica para FIV**  
M. Guimerà Leal, M. Guimerà Leal, M. Méndez Justo, E. Vidal Sordé, Y. Cívico Vallejos, B. Hernández Dacruz, G. Casals Soler, F. Fabregues Gasol, D. Manau Trullàs, S. Cívico Vallejos  
Hospital Clinic de Barcelona - Barcelona (Barcelona)

**13:05 - 13:50 hrs. SIMPOSIO COOPERSURGICAL**

**Implementación de RI Witness RFID en el grupo Care Fertility**

Ponente: Iria Castro, Care Fertility London, London, UK

**13:50 - 15:15 h. Comida**

**15:15 - 16:45 h. SESIÓN 4 - Andrología**

Moderadores: José Luis Girela López, Universidad De Alicante, Alicante e Icíá García Escribano, Hospital Virgen de la Salud, Toledo

15:15 - 16:00 h. **El RNA espermático: un campo emergente en la búsqueda de biomarcadores de fertilidad masculina.**

Ponente: Joan Blanco Rodríguez, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

16:00 - 16:45 h. **Proteínas de membrana esenciales para la fecundación. Aplicación en microesferas y modelos tridimensionales.**

Ponente: María Jiménez Movilla. Universidad de Murcia, Murcia.

**16:45 - 17:30 hrs. SIMPOSIO GRUPO EMB: "Evaluation Technology from Vitrolife"**

**Benefits of automatic embryo selection; iDAScore**

Speaker: Marcos Meseguer Escrivá, Embriólogo y Supervisor Clínico Senior, IVIRMA, Valencia

**Genomic Tools: An Insight into the Development of EmbryoMap**

Speaker: Senthil Natesan, Senior Manager, Product Applications- Genomics, VITROLIFE SWEDEN AB

**17:30 - 17:50 h. Pausa Café**

**17:50 - 18:50 h. COMUNICACIONES ANDROLOGÍA**

Moderadores: José Luis Girela López, Universidad De Alicante, Alicante e Icíá García Escribano, Hospital Virgen de la Salud, Toledo

17:50 - 18:00 h.

**CO-018 - El perfil metabólico del semen difiere en relación con la calidad seminal**

NM. Molina (1), A. Sola Leyva (1), N. Morales (2), I. Perez Prieto (1), E. Vargas (1), A. Yoldi (3), M. Molina (3), A. Vaquero (3), CM. Aguilera (4), S. Altmäe (1)

(1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada; Instituto de Investigación Biosanitaria ibs - Granada (Granada), (2) Unidad Reproducción, UGC Laboratorio clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. HU Virgen de las Nieves - Granada (Granada), (3) CEIFER Biobanco - NextClinics - Granada (Granada), (4) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos José Mataix, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada; CIBEROBN (Centro de Investigación - Granada (Granada))

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

18:00 – 18:10 h.

**CO-019 - Primer nacido vivo procedente de una muestra seminal congelada en casa por el propio paciente.**

B. Pujal Bravo, V. Montalvo Palles, J. Massó Hernández, F. García José, A. García-Faura Cirera, B. Marques López-Teijón, M. López-Teijón Pérez

Institut Marques - Barcelona (Barcelona)

18:10 – 18:20 h.

**CO-020 - Novedoso sistema de capacitación espermática basada en microfluidos, el camino hacia la automatización de la selección del semen**

F. Meseguer Estornel, R. Rivera Egea, L. Bori Arnal, MA. Valera Cerdá, T. Vilorio Samochín, M. Meseguer Escrivá

IVIRMA Valencia - Valencia (Valencia)

18:20 – 18:30 h.

**CO-021 - Validación prospectiva del parámetro ASHA (Average Sperm Head Area) como factor de riesgo de aneuploidia espermática en caso de infertilidad masculina idiopática**

JJ. Bataller Sánchez (1), A. Barberá Alberola (1), M. Ferrer Buitrago (1), V. Moliner Aguilar (1), X. Vendrell Montón (2), C. Calatayud Lliso (1), M. Ruiz Jorro (1)

(1) CREA - Valencia (Valencia), (2) Sistemas Genómicos - Paterna (Valencia)

18:30 – 18:40 h.

**CO-022- A novel artificial intelligence system to enhance the accuracy of semen analysis**

A. Parrella NA, L. Ortega López, Y. Galiana Briones, I. Vilella Amorós, J. Aizpurua

IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

18:40 – 18:50 h.

**CO-023- Estudio de la expresión génica de SLC9C2 en testículo de mamíferos**

P. Cots Rodríguez (1), M. Balastegui Alarcón (1), M. Avilés González (1), L. González Brusi (2), N. García Carrillo (3), P. Sòria Monzó (1), J. Ballesta Germán (1), E. Gómez Sánchez (4), MJ. Gómez Torres (5), M. Avilés Sánchez (1)

(1) Universidad de Murcia - Murcia (Murcia), (2) Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) - Madrid (Madrid), (3) Laboratorio de experimentación animal, ACTI, Universidad de Murcia - Murcia (Murcia), (4) Tahe Fertilidad - Murcia (Murcia), (5) Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante - Alicante (Alicante)

**18:50 - 19:05 h. Exposición premio EMB-ASEBIR 2019**

Moderadores: Antonio Urries López, presidente ASEBIR y Ramón J. Suárez García, presidente Congreso

**Blastocistos humanos procedentes de cigotos unipronucleares: un modelo biológico para el estudio de la ploidía, euploidía, topografía y parentalidad cromosómicas.**

Ponente: Xavier Vendrell Montón, Sistemas Genómicos, S.L., Paterna, Valencia.

**21:00 h. Cena y entrega del Premio a la Innovación MERCK ASEBIR 2021 y del Premio ASEBIR al Mejor Póster 2021 en el RESTAURANTE VENTA DE AIRES. (Pº Circo Romano, 35. Toledo)**

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

\* REST. VENTA DE AIREs a 12 min. andando desde el Palacio de Congresos. (No hay servicio de autocares)

### VIERNES 19 DE NOVIEMBRE

---

#### 08:30 - 10:00 h. SESIÓN 5 – Genética

Moderadores: Pere Mir Pardo, Igenomix, Paterna, Valencia y Bienvenida María Lozano Ruiz, Quirónsalud, Ciudad Real

##### 08:30 - 09:15 h. Importancia del asesoramiento genético en Reproducción Asistida.

Ponente: Anna Abulí Vidal, Institut Universitari Dexeus, Barcelona.

##### 09:15 - 10:00 h. Importancia del cribado poblacional en Reproducción Asistida.

Ponente: Julio Martín Rodríguez, IGENOMIX; Paterna, Valencia.

#### 10:00 - 11:10 h. COMUNICACIONES GENÉTICA

Moderadores: Pere Mir Pardo, Igenomix, Paterna, Valencia y Bienvenida María Lozano Ruiz, Quirónsalud, Ciudad Real

##### 10:00 – 10:10 h.

##### CO-024 - Hallazgos incidentales en el test genético preimplantacional para estudio de enfermedades hereditarias (PGT-M) mediante genotipado de SNPS.

E. Toro Toro, CM. Armada Sánchez, D. Campos Rodero, L. Álvarez Gómez, E. Garcia-Guixé, A. Gómez Duro, M. Sandalinas Alabert, C. Giménez Sevilla  
Reprogenetics Spain - Barcelona (Barcelona)

##### 10:10 – 10:20 h.

##### CO-025 - La fiabilidad del diagnóstico genético preimplantacional no invasivo (niPGT-A) no depende de la técnica de análisis genético

B. Lledó Bosch, R. Morales Sabater, JA. Ortiz Salcedo, A. Rodríguez Arnedo, J. Ten Morro, JC. Castillo Farfán, A. Bernabéu García, J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu Pérez  
Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

##### 10:20 – 10:30 h.

##### CO-026 - Factores que aumentan el riesgo de aborto bioquímico tras la transferencia de embriones euploides en ciclos de PGT-A

JA. Ortiz Salcedo, R. Morales Sabater, B. Lledó Bosch, A. Rodríguez Arnedo, A. Bernabéu García, J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu Pérez  
Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

##### 10:30 – 10:40 h.

##### CO-027 - Relación entre el Ruido (DLR-DERIVATIVE LOG RATIO) en los resultados de NGS en PGT-A con el diagnóstico de mosaicismos cromosómicos en las biopsias de trofoectodermo.

R. Morales Sabater, B. Lledó Bosch, JA. Ortiz Salcedo, A. Cascales Hernández, J. Ten Morro, A. Bernabéu García, J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu Pérez  
Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

##### 10:40 – 10:50 h.

##### CO-028- Clonación gamética por generación de androgenotas humanas: caracterización genética y edición genómica por CRISPR-CAS9

MJ. Escrivà Pérez (1), R. Bautista Llácer (2), N. Grau Grau (1), A. Oller (2), L. Escrich Albelda (1), X. Vendrell Montón (2)

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

(1) IVI Valencia, Fundación IVI - Valencia (Valencia), (2) Sistemas Genómicos - Paterna (Valencia)

10:50 - 11:00 h.

### CO-029 - Gene conversion in human embryos induced by gene editing

M. Gutierrez (1), D. Liang (1), Y. Lee (2), H. Ma (1), A. Koski (1), A. Mikhailchenko (1), S. Heitner (1), E. Kang (2), P. Amato (1), S. Mitilipov (1)

(1) Oregon Health & Science University - Portland (Oregon), (2) CHA University - Gyeonggi (South Korea)

11:00 - 11:10 h.

### CO-030 - Detección de contaminación materna en NIPGT-A mediante genotipado

C. Pérez Pelegrín

BIOARRAY - Elche (Alicante)

11:10 - 11:30 h. Pausa Café

11:30 - 12:15 h. SYMPOSIO - MILTENYI BIOTEC

### Técnicas específicas de selección espermática: utilidad y aplicación

Ponente: Alberto Pacheco, IVI RMA Madrid

### MACS ART: la importancia de la selección espermática

Ponente: José Luis Mateos, Miltenyi Biotec

12:15 - 13:45 h. Asamblea General Ordinaria Socios ASEBIR

### 1ª parte. La JD informa.

- Aprobación del acta anterior.  
Beatriz González, secretaria JD ASEBIR
- Introducción a cargo de Presidencia.  
Antonio Urries, Presidente ASEBIR
- Informe Tesorería y aprobación de cuentas.  
Nicolás Prados, Tesorero ASEBIR
- Informe Vocalías.  
Mark Grossmann, Vicepresidente ASEBIR
- Presentación nuevos miembros Junta Directiva ASEBIR y ratificación
- Ruegos y preguntas

### 2ª parte. Próximo Congreso.

- Presentación sede Congreso 2023 Palma de Mallorca.

### 3ª Parte. Charlas informativas

- Charla Situación de los embriólogos en Europa.  
Juan Manuel Moreno Moya
- Charla RD especialidades en ciencias de la salud y áreas de capacitación específica.  
Antonio Urries, Presidente ASEBIR

13:45 - 15:15 h. Comida

# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

### 15:15 - 16:45 h. SESIÓN 6 – Calidad

Moderadores: Miriam Iglesias Nuñez, Hospital Universitario Quirón, Madrid e Iván Ochando Sánchez, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete

#### 15:15 - 16:00 h. Planes de contingencia en las Unidades de Reproducción.

Ponente: Empar Ferrer i Robles, CREA (Centro Médico de Reproducción Asistida), Valencia.

#### 16:00 - 16:45 h. Actualización de los RRHH, RRF y gestión de la calidad en el laboratorio.

Ponente: Carla Olmedo Illueca, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia.

### 16:45 - 17:05 h. Pausa Café

### 17:05 - 18:05 h. COMUNICACIONES CALIDAD

Moderadores: Miriam Iglesias Nuñez, Hospital Universitario Quirón, Madrid y Beatriz Rojas Ruiz, HM Hospitales, Toledo

#### 17:05 - 17:15 h.

##### CO-031 - Perfil y condiciones laborales del embriólogo clínico en España

I. Ochando Sánchez (1), MT. Sánchez Núñez (2), P. Fernández Berrocal (3)

(1) Hospital General Universitario de Albacete - Albacete (Albacete), (2) Departamento de Psicología de la Universidad de Castilla-La Mancha - Albacete (Albacete), (3) Facultad de Psicología de la Universidad de Málaga - Málaga (Málaga)

#### 17:15 - 17:25 h.

##### CO-032 - ¿Qué opinan las pacientes sobre el anonimato de la donación de gametos?

R. Núñez Calonge (1), A. Guijarro Ponce (2), N. Santamaria (3), M. Poveda (4), P. Nieto (5), A. Sola (6), T. Rubio (7), J. Iñiguez (8), P. González (9), P. Alberola (10)

(1) Grupo UR Internacional - Madrid (Madrid), (2) Zaida Espacio de Salud - Cuenca (Cuenca), (3) UR Mediterráneo - Almería (Almería), (4) Clínica UR Vistahermosa - Alicante (Alicante), (5) Cefiva - Oviedo (Oviedo), (6) UR Montpellier - Zaragoza (Zaragoza), (7) UR La Vega - Murcia (Murcia), (8) IMED - Valencia (Valencia), (9) Clínica La Inmaculada - Granada (Granada), (10) Hospital La Moncloa - Madrid (Madrid)

#### 17:25 - 17:35 h.

##### CO-033 - Realidad de los usuarios del control de calidad externo de ASEBIR en la evaluación morfológica de embriones frescos

L. Martínez Granados (1), M. Serrano Molina (2), ML. López Regalado (1), E. Veiga Álvarez (3), B. Freijomil Díaz (4), N. Ortiz Piñate (5), L. Sánchez Castro (6), A. González Utor (7), JA. Castilla Alcalá (8), M. Iglesias Nuñez (9)

(1) Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid), (2) Clínica IFEM - Córdoba (Córdoba), (3) Hospital Clínico Universitario de Santiago - Santiago de Compostela (Coruña), (4) Institut Marqués - Barcelona (Barcelona), (5) Instituto Europeo de Fertilidad - Madrid (Madrid), (6) Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (Asturias), (7) IMER Sevilla - Sevilla (Sevilla), (8) Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada), (9) Hospital Universitario Quirónsalud Madrid - Pozuelo de Alarcón (Madrid)

#### 17:35 - 17:45 h.

##### CO-034 - Informes de embriones aneuploides y uso del sistema internacional para la nomenclatura de la citogenética humana

L. Martínez Granados (1), P. Mir Pardo (2), E. Ferrer I Robles (3), P. Piqueras Trilles (4), E. Cano Oliva (1), M. Canales Gijón (5), M. López Regalado (1), E. Conesa Blanco (6), C. Olmedo Illueca (7), M. Iglesias Nuñez (8)

(1) Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid), (2) IGENOMIX - Valencia (Valencia), (3) CREA Centro Médico de Reproducción Asistida - Valencia (Valencia), (4) Ginemed Murcia-Valencia - Murcia (Murcia), (5) FIV4 Instituto de Reproducción Humana - Gijón (Asturias), (6) Universidad de Alcalá - Alcalá de Henares (Madrid), (7) Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (Valencia), (8) Hospital Universitario Quirónsalud Madrid - Pozuelo de Alarcón



# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

(Madrid)

17:45 - 17:55 h.

CO-035 - El tamaño no importa: establecimiento de un sistema electrónico de testigo y trazabilidad en un centro de RA, independientemente del número de ciclos que realice

N. Ortiz Piñate, C. de la Cruz Suárez

Instituto Europeo de Fertilidad - Madrid (Madrid)

17:55 – 18:05 h.

CO-036 - Evaluación del efecto del aceite mineral y del diseño de placa en la estabilidad de la temperatura y osmolaridad del medio de cultivo

D. González Abreu (1), C. Miret Lucio (1), M. Benavent Martínez (1), A. García Esteve (1), M. Escriba Suárez (1), E. Mestres Gonzalvo (2), N. Costa Borges (2), G. Calderón De la Olla (2), J. Crespo Simó (1), J. Teruel López (1)

(1) Equipo Juana Crespo - Valencia (Valencia), (2) Embryotools - Barcelona (Barcelona)

**18:05 – 18:15 h. Exposición Mejor Póster 2021**

**18:15 – 18:30 h. Cierre y Clausura del Congreso**

**21:00 h. Cena de Clausura y Entrega del Premio “EMB-ASEBIR 2021” en el Cigarral de las Mercedes (Carretera Piedrabuena, 72. Toledo)**

\* Habrá un servicio de autobuses, con salida a las 21:00 hrs. en las Dársenas de Sanfont, junto a las escaleras mecánicas, situadas entre el Palacio de Congresos y el parking de Safont.



# XI CONGRESO ASEBIR

## PROGRAMA CIENTÍFICO

Nuestro agradecimiento a las casas comerciales sin cuya colaboración no sería posible realizar este evento.

### PATROCINADORES PRINCIPALES



### PATROCINADORES



No te pierdas ningún detalle



## Microscopio invertido semi-motorizado IX73

- ✓ Flexible
- ✓ Ergonómico
- ✓ Fácil de usar

**OLYMPUS SCIENTIFIC SOLUTIONS**



Para obtener más información, póngase en contacto con [infosd.iberia@olympus.es](mailto:infosd.iberia@olympus.es)  
o visite nuestro sitio web [www.olympus-lifescience.com/es/solutions/icsi](http://www.olympus-lifescience.com/es/solutions/icsi)

# PONENCIAS

INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL  
DEBATE  
CRIOBIOLOGÍA  
EMBRIOLOGÍA  
ANDROLOGÍA  
PREMIO EMB-ASEBIR 2019  
GENÉTICA  
CALIDAD

# INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL

## INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL E INNOVACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA. REGULACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA NUCLEAR A NIVEL MUNDIAL

**César Palacios González**

The Oxford Uehiro Centre for Practical Ethics. Oxford University. Oxford – UK.

(El texto de esta ponencia no ha sido facilitado por el autor)

## GENOME EDITING IN HUMAN EMBRYOS: LATEST RESULTS, PROSPECTS AND TRANSLATION TO CLINICAL PRACTICE

**Nuria Martí Gutiérrez**

Center for Embryonic Cell and Gene Therapy, Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, EEUU

Applications of genome editing ultimately depend on DNA repair triggered by targeted double strand breaks (DSBs). However, repair mechanisms in human cells remain poorly understood and vary across different cell types. We observed that a substantial number of DSBs are repaired by gene con-

version using a homologous allele as a template. Additionally, conversion tracks may expand bidirectionally well beyond the target region leading to an extensive loss of heterozygosity (LOH). While gene conversion could be applicable for gene correction, extensive LOH presents a serious safety concern.

## EL FUTURO DEL EMBRIÓLOGO/A CLÍNICO/A TRAS LA AUTOMATIZACIÓN DE LOS LABORATORIOS

Marcos Meseguer<sup>1</sup> y Emilio Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> VIRMA-Valencia, Valencia

<sup>2</sup> TAHE Fertilidad, Murcia.

La automatización es un término que engloba la sustitución de cualquier intervención humana por procesos mecánicos o informáticos. Y su aplicación conlleva la externalización de nuestros movimientos corporales o actos mentales, por actos automáticos e involuntarios realizados por otro dispositivo. Aunque el concepto tiene un origen industrial, su aplicación en laboratorios clínicos ya supuso un gran cambio en las rutinas de diagnóstico clínico general. Sin embargo, su aplicabilidad en espacios como el laboratorio de fecundación in vitro (FIV) sigue suscitando debate y en muchas ocasiones, desconfianza.

Cuando hablamos de automatización nos imaginamos en un laboratorio de fecundación in vitro robotizado, en el que nuestro papel como expertos/as en embriología se reduciría a activar botones conforme avanza el proceso de fecundación y desarrollo de los embriones. Pero si desgranamos el flujo de tareas, desde la obtención de gametos hasta la transferencia embrionaria, nos daremos cuenta de que la aplicabilidad de la automatización cobra sentido solo en ciertos pasos de todo el proceso. Este aspecto hace más sustancial el debate, y nos sitúa en la realidad de una automatización parcial de laboratorio de fecundación in vitro, para poder juzgar en cada punto las ventajas y las desventajas de este cambio de paradigma en las competencias de un embriólogo/a clínico/a.

Con este debate, vamos a tratar de responder qué se persigue con la automatización y cómo va a afectar a la embriología clínica tal y como la conocemos ahora. Si el objetivo principal de la automatización de un laboratorio es la mejora de la eficiencia del proceso técnico (fecundación in vitro) y del resultado (embarazo a término), es importante caracterizar dos partes: 1) la mecanización de las técnicas (e.g ICSI o vitrificación automáticas) y 2) la sistematización de las tomas de decisiones (e.g algoritmos).

La mejora de eficiencia persigue una serie de ventajas en referencia al proceso de fecundación in vitro per se: reducción de tiempos, simplificación de tareas, reducción de la subjeti-

vidad, reducción de coste (RRHH, materiales), mejora de la seguridad a través de una reducción del posible error humano y una mejora de la repetibilidad y precisión en los resultados. Por otro lado, los algoritmos han irrumpido en la tarea de seleccionar los embriones con mejores posibilidades de embarazo y nacimiento. En los últimos años, el desarrollo e implementación de la tecnología de Inteligencia Artificial (IA) ha demostrado el potencial para abordar las ineficiencias en varios pasos de la reproducción asistida, que incluyen la mejora en algunos procesos del laboratorio de FIV y, más concretamente, en la selección de embriones. En este sentido equipos multifocales formados por expertos/as en embriología, ingeniería y bioinformática han llevado a cabo estudios con miles de embriones y pacientes que permiten ofrecer una selección embrionaria universal, estandarizada y automática.

Uno de los objetivos de la IA es llegar a analizar un embrión cromosómicamente euploide sin necesidad de aplicar técnicas invasivas. Gracias a estos avances por primera vez, un sistema basado en la IA puede analizar con precisión los primeros estadios de desarrollo embrionario y cuantificar la duración de los ciclos celulares, además de conocer el diámetro de las células que forman el blastocisto, generando así un algoritmo con capacidad de distinguir entre embriones con mayor o menor probabilidad de ser cromosómicamente normal o anormal ya que se comportan de manera diferente en su patrón de desarrollo y este se puede analizar de manera automatizada por análisis de imagen. La posibilidad de seleccionar y categorizar cromosómicamente los mejores embriones supondrá sin duda un aumento en las tasas de gestación y embarazo, y una reducción de las probabilidades de anomalías cromosómicas, proporcionando una predicción objetiva y fiable, mediante una técnica rápida y económica. Esto es una revolución porque permitiría evitar las técnicas invasivas.

La IA es un término amplio que incluye aprendizaje automático y aprendizaje profundo; se refiere a cualquier programa con la capacidad de resolver problemas, aprender de las experiencias y realizar tareas como lo hacen normalmente los seres humanos. Estos sistemas clasifican los embriones auto-

## DEBATE

máticamente empleando métodos de aprendizaje dirigido basados en la experiencia de embriólogo/as experto/as, detecta y evalúa todos los pasos del desarrollo del embrión y además clasifica su morfología. La selección embrionaria automatizada, en comparación con la manual, es más precisa, por lo que la probabilidad de embarazo evolutivo está relacionada directamente con el porcentaje de puntuación y, por tanto, la paciente tiene mayores probabilidades de éxito. De este modo la IA puede ofrecer una serie de ventajas como: i) la identificación más amplia y anticipada del paciente potencial con nuevos indicadores de infertilidad y correlaciones de los patrones de comportamiento a través de análisis de big data; ii) la mejora en la gestión de las expectativas de los pacientes a través del análisis de predicciones del éxito de la FIV considerando los nacidos vivos; iii) mayores tasas de éxito del tratamiento a través de un protocolo personalizado e individualizado; iv) el apoyo en la toma de decisiones clínicas en todos los pasos del proceso de laboratorio, basado en algoritmos y visión por computadora para identificar la mayoría de los gametos y embriones viables y v) la definición del estado de recepción del endometrio a través de algoritmos inteligentes y biomarcadores que ayudan a determinar las posibilidades de una transferencia óptima y consecución del embarazo.

En definitiva, la inversión en IA permitirá mejorar el equipamiento de los laboratorios, formar y dar trabajo a futuros embriólogo/as con una visión diferente de la embriología, adaptados a los nuevos tiempos.

No obstante, ¿cuál es el coste a pagar por estos beneficios? Es importante considerar que tanto la mecanización de las técnicas como el uso de algoritmos de predicción requerirán una estandarización y validación clínica antes de su traslación a la práctica habitual. Por otro lado, los controles de seguridad recaerán en el control del sistema y resolución de fallos del mismo, un aspecto totalmente técnico que tal vez haya de realizar personal externo especializado, y no un experto/a en embriología. Esto puede acarrear ciertas desventajas como por ejemplo el coste elevado. El desarrollo e implementación de la automatización de procesos conlleva un alto coste, ya que se trata de equipos muy complejos, que además requie-

ren de mantenimiento constante, actualizaciones de software frecuentes para adaptarse a las necesidades cambiantes, reparaciones y recuperación de datos, etc. Asimismo, sobrevuela la idea de una reducción del personal necesario en un futuro. Resulta evidente que la aplicación de estas nuevas tecnologías, que implican la automatización de muchos procesos del laboratorio, eliminará muchos puestos de trabajo. Una sola persona experta en embriología clínica, incluso personal técnico, podrá monitorizar un sinnúmero de tratamientos, por lo que la demanda de estos puestos de trabajo disminuirá. Es cierto que se crearán otros, pero quien desarrolla y controla los equipos, no es quien realiza las tareas. Por otro lado, puede generarse una ausencia de creatividad. Las máquinas no piensan, simplemente replican procesos para los que han sido diseñadas. Ante cualquier cambio en las condiciones no sabrían cómo actuar, no son capaces de alterar sus respuestas en entornos cambiantes. No disponen de la iniciativa de una inteligencia humana, ni de la capacidad de adaptarse. La experiencia del/a embriólogo/a es necesaria para poder llevar a cabo con éxito algunos procedimientos o tomar determinadas decisiones, cuando aparecen contingencias inesperadas que requieren de decisiones rápidas que implican una intervención inmediata.

En definitiva, la revisión del estado de la cuestión nos lleva a pensar que la automatización, entendida en sus dos vertientes: la mecanicista, de carácter más intervencionista; y la inferencial, de orden anticipatorio, predictivo y ligada a la toma de decisiones, es un hecho irreversible en nuestro contexto. La aplicación de automatismos en los laboratorios de embriología permite obtener, guardar y procesar una cantidad de datos suficiente como para identificar parámetros clave que impactaran en la toma de decisiones clínicas. No obstante, esta evolución requiere de una vigilancia y debate profundos en cuanto a la validación de las herramientas y la actualización del conocimiento, de forma que se evite un recambio de equipos por personas excesivamente rápido, así como la implementación precipitada de prototipos. La reflexión profunda, la discusión científico-técnica y los procedimientos de validación serán clave en este nuevo escenario que se plantea en el campo de la reproducción humana asistida.

# SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA

## GUÍA DE RECOMENDACIONES SOBRE CRIOGENIA

### **Dr. Miquel Solé Inarejos**

Servei de Medicina de la Reproducció.  
Hospital Universitari Dexeus  
Gran Vía Carles III, 71-75  
08028 Barcelona

La criobiología está adquiriendo cada vez mayor importancia en las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). La criogenia son el conjunto de técnicas que tienen como objetivo la disminución de la temperatura sobre un material hasta la temperatura de ebullición del Nitrógeno Líquido (NL2) o a temperaturas aún más bajas.

La criopreservación de espermatozoides, embriones u ovocitos conllevan el procesamiento, enfriamiento y almacenamiento a bajas temperaturas (menor de -140 °C) con el objetivo de mantener completamente su viabilidad y funcionalidad sin que su reintroducción en el cuerpo humano suponga ningún riesgo para el mismo.

El mantenimiento a largo plazo de las células o tejidos en un entorno estable se logra habitualmente utilizando NL2. Es un líquido inerte, incoloro, inodoro, no corrosivo, no inflamable y relativamente estable. Se utiliza en la criopreservación de células y en otros materiales biológicos para su almacenamiento antes de su uso clínico posterior. Se define como un gas licuado con un punto de ebullición normal por debajo de -90 °C. La temperatura de trabajo es de -196 °C. A estas temperaturas, la actividad enzimática y los procesos metabólicos en las células se detienen y, por lo tanto, las muestras se pueden mantener en estado latente, pero potencialmente viables. El NL2 requiere su almacenamiento en equipos específicos para manipular líquidos criogénicos. Un sistema de almacenamiento típico consiste en un tanque de almacenamiento criogénico que es similar en construcción a una botella de vacío.

Existen algunos riesgos asociados al uso de NL2, son el riesgo en las posibles variaciones de temperatura que pueden sufrir las muestras durante su manipulación y almacenamiento, el riesgo de contaminación de las muestras criopreservadas y, no menos importante, los riesgos que suponen para los profesionales. A pesar de la importancia del correcto mantenimiento y manipulación de las muestras criopreservadas, son escasas las directrices sobre la zona de alma-

cenamiento donde se encuentran las muestras.

Afortunadamente, los incidentes adversos graves con LN2, el equipo o el proceso asociado con su uso tienden a ser raros. Sin embargo, cuando ocurren, la pérdida de material único, lesiones del personal o incluso la muerte hacen que sea necesario tomar todas las medidas posibles para evitar este tipo de graves consecuencias.

Las pérdidas individuales o de parejas que pierden material en un incidente crítico pueden ser enormes. Ninguna otra área de almacenamiento criogénico (por ejemplo, almacenamiento de sangre o tejidos) tiene el mismo impacto, ya que la mayoría del material se almacena para donación anónima y, como resultado, los incidentes de "congelación" rara vez (o nunca) llegan a la prensa.

Actualmente los marcos de referencia de España respecto a la criopreservación y en donde se establecen los requerimientos aplicables a las salas de criobiología para almacenamiento de células y tejidos humanos y de FIV se basan en diversos documentos.

En 2014, se aprobó el Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, respondiendo a la evidente necesidad de regular la utilización de células y tejidos humanos, así como de los productos elaborados derivados de ellos, cuando están destinados a ser aplicados al ser humano.

También se ha elaborado una norma específica para los Laboratorios de Reproducción Humana Asistida que asegure una gestión eficiente y de calidad. En este sentido, AENOR publicó la norma UNE 179007 que especifica los requisitos de un sistema de calidad. Tiene como base los requisitos de la ISO 9001 de sistemas de gestión de la calidad ampliando con requisitos específicos de su sector. Además, al ser genéricos pretende que sean aplicables a todas las organizaciones sin importar el tipo, tamaño y producto suministrado.



# SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA

Así pues, la norma UNE 179007 certifica a los laboratorios de las unidades asistenciales en los que se realizan actividades relacionadas con gametos o preembriones con finalidad de reproducción humana asistida, ya sea para uso propio, para donación dentro de la pareja o fuera de ella. El alcance aplica hasta que se dé el uso previsto a los gametos o preembriones conforme a la legislación vigente.

La ESHRE colabora a nivel mundial y aboga por mejoras universales en la investigación científica y la armonización en la práctica clínica. También proporciona una guía para mejorar la seguridad y la garantía de calidad en los procedimientos clínicos y de laboratorio. En este sentido la ESHRE ha recogido una serie de pautas y recomendaciones.

El objetivo de crear una Guía sobre Criogenia en TRA es orientar a los profesionales mediante una serie de recomendaciones para garantizar la seguridad de los trabajadores y del material criogenizado.

Uno de los aspectos más importantes para la seguridad de las muestras, son los tanques de almacenamiento. Están diseñados para permitir que los gases líquidos se mantengan en la cámara interior del tanque con una exposición mínima al calor, por lo tanto, los gases se mantienen en forma líquida a temperaturas cercanas a los  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La pérdida de vacío en los tanques de almacenamiento da como resultado tasas de evaporación más altas del NL2 y cambios en la temperatura dentro de la cámara interior del tanque, lo que provoca un aumento acelerado de la temperatura en el tiempo.

Estos contenedores pueden ser de diferentes fabricantes y diferentes capacidades. En general hay dos tipos, los tradicionales que mantienen la temperatura criogénica por introducción de las muestras en nitrógeno en fase líquida y los secos o de vapor que mantienen la temperatura de las muestras por enfriamiento del interior a través de camisa exterior rellena de NL2.

Para garantizar que las muestras biológicas estén almacenadas a la temperatura correcta, existen sistemas de control de llenado y de alarmas que advierten en caso de bajar la temperatura o los niveles de NL2. Todo ello proporciona una seguridad en los procesos de almacenamiento biológico ya que la ruptura de la criopreservación puede provocar su destrucción. Es por ello, muy importante garantizar la continuidad del suministro de NL2 en óptimas condiciones.

Otro riesgo asociado al almacenamiento de muestras en NL2 es el riesgo de contaminación por diferentes patógenos. En

gametos y embriones, la integridad de la zona pelúcida, el método de criopreservación y la esterilidad tanto del NL2 como del recipiente de almacenamiento juegan un papel importante en el mantenimiento de la asepsia. Además, el riesgo de contaminación cruzada debido a un sellado defectuoso, fugas o rotura de los envases generalmente aumenta cuando se mantiene una gran cantidad de productos biológicos juntos en un mismo ambiente líquido. Además, durante la manipulación en el almacenamiento de muestras, la condensación y la congelación de la atmósfera por encima de los contenedores de nitrógeno pueden generar cristales que sedimentan hacia el interior. Estos cristales pueden atrapar microorganismos ambientales.

Aunque la mayoría de microorganismos no representan una amenaza para la salud humana, tienen el potencial de contaminar las muestras almacenadas. La carga microbiana en los tanques se puede limitar evitando la presencia de hielo en los tanques y empleando recipientes para las muestras, herméticamente sellados. Algunas medidas para minimizar el riesgo de contaminación son el uso de la fase de vapor de nitrógeno para el almacenamiento y la limpieza periódica de los tanques de almacenamiento.

Los contenedores de almacenamiento que permiten mantener el material biológico en un estado viable durante un cierto periodo de tiempo deben ubicarse en la sala de almacenamiento criogénico. Estructura diseñada para la conservación a baja temperatura, generalmente mediante el uso de fluidos criogénicos, del material biológico destinado a usos clínicos.

Existen una serie de peculiaridades en torno a las características organizativas, estructurales y tecnológicas de una sala de almacenamiento criogénico. La sala debe cumplir unos requisitos estructurales determinados como situación; área/volumen; pavimento, paredes y techos; accesos y el mantenimiento de un ambiente controlado. Actualmente en los centros de reproducción asistida nos podemos encontrar que esta sala puede ser un espacio separado físicamente del laboratorio de FIV o un espacio dentro de él destinado exclusivamente a esta actividad.

Entre los requisitos dentro de la sala de almacenamiento están los sistemas de seguridad y control de acceso. Debido a que son muestras biológicas de gran valor y sensibilidad debe haber un registro continuo de todo lo que ocurre en la sala de almacenamiento, del profesional que realiza cada proceso, del lugar donde son almacenadas las muestras, entre otros. En la actualidad existen sistemas de control auto-

# SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA

matizados que facilitan este registro y permiten tener una exhausta trazabilidad de todo el proceso de almacenamiento. Además, tenerla es una herramienta muy potente frente a auditorias de certificación o inspecciones sanitarias.

La sala debe de estar también preparada para la seguridad de los profesionales que desarrollan su labor en ella. Las características del nitrógeno (inodoro, incoloro e insípido), hacen que represente un riesgo para los trabajadores ya que ante un accidente de fuga puede pasar inadvertido. Incluso, podría producir asfixia sin ninguna sensación o advertencia previa. En el punto de ebullición (a los  $-195.79\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), su volumen se expande enormemente (1 l. en fase líquida es igual a 682.3 l. en fase gaseosa) y puede desplazar al oxígeno por competición con la hemoglobina. Para ello, la sala deberá de tener detectores del nivel de oxígeno que avisen de la posibilidad de peligro por hipoxia. Igualmente deberán estar perfectamente señalizadas, con salida al exterior tipo antipánico. Las renovaciones de aire deben ser exclusivamente por introducción de aire exterior. Las extracciones deben ser por aire forzado a nivel de suelo ya que el gas de nitrógeno producido tiende a descender por la temperatura, desplazando por convección al aire anexo.

Otro aspecto importante sobre la seguridad de los profesionales, son los equipos de protección individual (EPIs). No solo es necesario que el personal lleve la vestimenta rutinaria del laboratorio, además para manipulaciones con NL2 debería incorporar EPIs específicos que protejan de quemaduras por frío debidas al contacto directo con material que esté enfriado o por proyección directa de NL2.

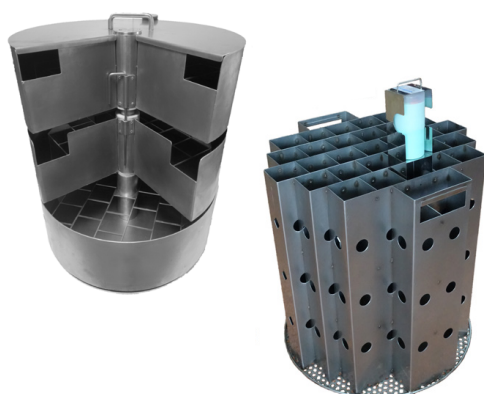
Se van a tratar a lo largo de esta Guía los requisitos mínimos que debe tener una sala de almacenamiento criogénico proporcionando su seguridad y siguiendo las normativas vigentes, las directrices de sociedades y el consenso de expertos. En definitiva, las pautas a seguir con el objetivo de unificar y de seguir la misma línea de trabajo para todos los centros de reproducción.

Por último, son importantes los protocolos de actuación frente a situaciones de emergencias que nos podemos encontrar y planes de contingencia alternativos para asegurar el correcto estado del material en caso de no poder dar respuesta desde el propio centro de trabajo debido a algún imprevisto.

## CONTROL EN SALAS DE CRIOBIOLOGIA



**MONITORES DE OXÍGENO Y CO2**



**BANDEJAS GIRATORIAS Y GUIAS DE RACKS PARA CONTENEDORES CRIOGENICOS**



**CONTROL DE NIVEL Y TEMPERATURA "INALÁMBRICO"**



# SESIÓN DE CRIOBIOLOGÍA

## CRYOPRESERVATION OF OVARIAN TISSUE

### Christiani A. Amorim

Pôle de Recherche en Gynécologie, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, 52 Avenue Mounier, 1200 Brussels, Belgium  
christiani.amorim@uclouvain.be / +32 2 764 5287

Cryopreservation of human ovarian tissue has been increasingly applied worldwide to safeguard fertility in cancer patients, notably in young girls and women who cannot delay the onset of their treatment. Moreover, it has been proposed to patients with benign pathologies with a risk of premature ovarian insufficiency. So far, more than 200 live births have been reported after transplantation of cryopreserved ovarian tissue, and almost all patients recovered their ovarian function after tissue reimplantation (1). This presentation aims to summarize the recent results described in the literature regarding human ovarian tissue cryopreservation in terms of methods and main results obtained so far. To cryopreserve human ovarian tissue, most studies describe a slow freezing/rapid thawing protocol, which is usually an adaptation of a protocol developed for sheep ovarian tissue (2). Since freezing has been shown to have a deleterious effect on ovarian stroma and granulosa cells, various research groups have been vitrifying ovarian tissue. Despite promising results, only a few babies have been born after transplantation of vitrified/warmed ovarian tissue (3). Optimization of both cryopreservation strategies as well as thawing/warming protocols is therefore necessary to improve the survival of follicles in cryopreserved ovarian tissue.

### BIBLIOGRAPHY

1. Dolmans MM, Falcone T, Patrizio P. Importance of patient selection to analyze in vitro fertilization outcome with transplanted cryopreserved ovarian tissue. *Fertil Steril*, 2020;114:279-280.
2. Rivas Leonel EC, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of ovarian tissue: a review. *Transfus Med Hemother*, 2019;46:173-181.
3. Shapira M, Dolmans MM, Silber S, Meirou D. Evaluation of ovarian tissue transplantation: results from three clinical centers. *Fertil Steril*, 2020;114:388-397.
4. Leonel ECR, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of Pre-antral Follicles. In: Bozkurt Y (Ed). *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*, IntechOpen.

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

## EDICIÓN GENÉTICA DE EMBRIONES HUMANOS PARA FINES DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

**Anna Veiga, Begoña Arán**

Banco de Líneas Celulares de Barcelona  
Programa de Medicina Regenerativa. Idibell  
Barcelona

### ANTECEDENTES

Las técnicas de edición genómica en embriones preimplantacionales pueden utilizarse para dos finalidades muy distintas.

En el caso de embriones afectados de enfermedades monogénicas, la edición genómica (terapéutica) suprime o modifica la mutación causante de la enfermedad con el fin de obtener embriones libres de la enfermedad.

A partir de los resultados previos obtenidos en modelos animales, la técnica de edición genómica de CRISPR/Cas9 se ha utilizado ya en embriones humanos para demostrar su utilidad terapéutica. Liang et al (2015) intentaron reparar el gen de la beta-globina en cigotos tripronucleares (3PN). Tang et al, (2017) demostraron que era posible la corrección eficaz de los genes HBB y G6PD en embriones 2PN mediante el uso de CRISPR/Cas9.

Otros autores han utilizado CRISPR/Cas9 en cigotos 2PN y 3PN con un número limitado de embriones y tasas de eficiencia variables (Kang et al, 2016; Liang et al., 2017; Zhang et al., 2019)

El grupo de Mitalipov (Ma et al., 2017) realizó experimentos en los que inyectaron sgRNA-Cas9 RPN en cigotos 2PN para la corrección del gen MYBP3. Sus resultados registraron una corrección del 45% de eficiencia, sin mosaicismo y sin detección de off-targets. Concluyeron que la edición se realizaba en el alelo paterno usando el alelo materno como molde. Esta afirmación ha provocado una cierta controversia y experimentos similares deberán aportar las evidencias necesarias para su confirmación (Egli et al, 2017).

Se han logrado avances en la comprensión del mecanismo de corrección en embriones editados. Recientemente, el

grupo de Egli (Zuccaro et al., 2020) utilizó CRISPR/Cas9 en embriones humanos para la reparación de la delección homocigota en el alelo paterno asociado a EYS en retinitis pigmentosa. Esta delección es una mutación en el exón 34 que fue reparada exitosamente en el 50% de los embriones tempranos mediante indels causados por CRISPR/Cas9 a través de mecanismos MMEJ y NHEJ sin mosaicismo detectable. El 50% restante de los embriones presentaron indels indeseados, pérdida de segmentos teloméricos del cromosoma paterno o indels específicos en el cromosoma 16.

El grupo de Mitalipov (German et al, 2019) ha publicado recientemente el mecanismo de reparación del DNA inducido por DSB en embriones preimplantacionales heterocigotos para la mutación en el exón 22 del gen MYH7 del cromosoma 14, implicado en la cardiopatía hipertrófica familiar (HCM). Los autores reportan que aproximadamente un 40% de corrección observada en los alelos reparados es el resultado de la conversión génica con una consecuente pérdida de la heterocigosis que favorece el alelo materno.

En otro artículo publicado recientemente (Alanis-Lobato et al., 2020), los autores analizan 43 genomas y transcriptomas de células aisladas de embriones preimplantacionales editados mediante CRISPR/Cas9 en OCT4. Los autores describen pérdida de heterocigosis en las células editadas que afectan regiones más allá del locus POU5F1, así como pérdida y ganancia de segmentos del cromosoma 6, en el que se encuentra el gen OCT4. Se observó una edición genómica no deseada en el 22% de las células analizadas.

Todos los artículos publicados indican un alto nivel de complejidad tanto en la edición on-target como off-target, evidenciando la necesidad de realizar investigación básica para evaluar la eficiencia y la seguridad de la edición genómica en embriones humanos.

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

Otra de las aplicaciones de la técnica de edición genómica CRISPR/Cas9 en embriones de mamífero es la que permite el estudio del papel de determinados genes durante el desarrollo embrionario (Ruzo and Brivanlou, 2017). En este caso, el uso de la edición genómica permite suprimir o alterar la expresión de los genes con la finalidad de demostrar su función.

La supresión de la actividad de genes que se expresan tempranamente en el embrión humano puede tener consecuencias adversas en su desarrollo tal como ha demostrado el grupo de Niakan (Fogarty et al 2017). El estudio tenía como objetivo ahondar en la función del gen de pluripotencia Oct4 en los primeros estadios del desarrollo embrionario humano. Se consiguieron embriones nulos para hOct4 que interrumpieron su desarrollo en un estadio celular inferior a 8 células. Los embriones que consiguieron llegar a etapa de blastocisto resultaron ser mosaicos y se demostró que los embriones genéticamente modificados aunque iniciaban la formación a blastocisto, la masa celular interna (ICM) apenas se formaba. También se llevaron a cabo estudios del transcriptoma en los que se observó que la mutación en hOct4 provocaba además la inhibición de la expresión de otros genes, incluyendo NANOG (epiblasto), GATA2 (trofoectodermo) y GATA4 (endodermo primitivo). Estos resultados contrastan con lo observado en ratón, en que embriones nulos para mOct4, se continúa expresando NANOG en la ICM.

La edición genómica en embriones humanos presenta actualmente distintos problemas técnicos que impiden su aplicación clínica. Es imprescindible elegir un sistema eficiente de edición, con sgRNA específicos que no produzcan off-targets. Por otra parte y a pesar de utilizar embriones en estadio de cigoto, en la mayoría de publicaciones no se consigue evitar el mosaicismo tras la edición genómica con CRISPR/Cas9. Un sistema de microinyección eficiente y ajustado al timing adecuado de pronúcleos parece disminuir el fenómeno del mosaicismo aunque los escasos datos publicados están todavía en discusión.

## PROYECTO

### CRISPR/Cas9 HUMAN EMBRYO GENOME EDITING FOR THE STUDY OF GENES RELATED TO EARLY EMBRYO DEVELOPMENT

Este proyecto se está llevando a cabo en el Banco de Líneas Celulares del Programa de Medicina Regenerativa de IDIBELL en colaboración con Dexeus Mujer pretende poner a punto la técnica de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genómica en cigotos y posteriormente utilizarla para estudiar la

función del gen Oct4 y otros genes de expresión temprana en el desarrollo del embrión humano. Se pretende optimizar la metodología de CRISPR/Cas9 en cigotos humanos y ampliar los conocimientos actuales sobre la relevancia de determinados genes en el desarrollo embrionario.

Los cigotos han sido donados para investigación por parejas del Programa de Fecundación in vitro de Dexeus Mujer, de acuerdo a la legislación vigente. El proyecto ha recibido autorización por parte de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida a través de la Generalitat de Catalunya (Febrero 2020, 0336/11882/2018). El proyecto se ha beneficiado de una beca de la Sociedad Española de Fertilidad (Becas de investigación 2019), una beca Ayudas MERCK de Investigación 2020 y una beca del Fondo de Investigación Sanitaria 2021 (FIS) del Instituto de Salud Carlos III.

El análisis del desarrollo de los embriones editados se realiza mediante monitorización dinámica en un incubador equipado con Time Lapse (Embryoscope) lo que permite un análisis continuo del proceso de división embrionaria. De esta manera, puede analizarse cada etapa del desarrollo (morfodinámica) y determinar con precisión las consecuencias de la edición genómica en el desarrollo. Así mismo se realizó un análisis molecular para determinar si la edición se ha producido correctamente. Se amplifica el DNA genómico mediante un kit single cell WGA. Los productos de las PCR son secuenciados mediante Sanger y los indels/inserciones son verificados mediante inspección visual de los cromatogramas.

## OBJETIVOS

Los objetivos principales del proyecto son:

### 1. Optimización de la edición genómica de OCT4 usando CRISPR/Cas9 en cigotos humanos y análisis del desarrollo embrionario mediante.

- Análisis morfocinético de los embriones editados y control mediante metodología time-lapse
- Análisis de aneuploidías mediante Next Generation Sequencing (NGS) y análisis molecular de las mutaciones generadas en los embriones editados. Análisis de mutaciones "off-target" mediante Sanger.

### 2. Edición genómica mediante CRISPR/Cas9 de otros genes relacionados con el desarrollo embrionario temprano.

- Diseño y validación de sgRNA específicos para otros genes implicados en el desarrollo embrionario temprano.
- Análisis morfocinético de los embriones editados y control mediante metodología time-lapse

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

- Análisis de aneuploidías mediante Next Generation Sequencing (NGS) y análisis molecular de las mutaciones generadas en los embriones editados. Análisis de mutaciones “off-target” mediante Sanger.

## RESULTADOS PRELIMINARES

De un total de 80 embriones donados, 63 han resultado útiles para el estudio tras la descongelación. Cuarenta y ocho se han microinyectado con sgRNA (hOCT4)-Cas9 RNP y 15 únicamente con solo la proteína Cas9, como control. Se ha observado edición genómica en el 64,6% de los cigotos inyectados y el 70,4% de los supervivientes tras la microinyección. Se ha obtenido amplificación genómica en todos los embriones del grupo control y no se ha observado edición. Los detalles se muestran en la tabla siguiente:

	inyectados	supervivientes	amplificación	editados (%)
Estudio	48	44	43	31 (64,6%/70,4%)
Control	15	15	15	0

Se han analizado los distintos parámetros morfofocinéticos a través de la metodología Time Lapse, así como la tasa de blastocisto. Se compararán los parámetros observados en el grupo de cigotos editados con el grupo control y con los establecidos en los programas de FIV en embriones con patrones normales de desarrollo y capacidad de implantación demostrada.

Actualmente, se están analizando en detalle los distintos tipos de edición genómica obtenidos y se está diseñando un “score” relativo al tipo de edición para correlacionarlo con el desarrollo embrionario.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alanis-Lobato G, Zohrenb J, McCarthy A, Fogarty N, Kubikova N, Hardman E, et al. Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *bioRxiv*. 2020 <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.135913>.
2. Egli D, Zuccaro M, Kosicki M, Church G, Bradley A and Jasin M. Inter-homologue repair in fertilized human eggs? *BioRxiv* 2017 <https://doi.org/10.1101/181255>.
3. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*. 2017;550(7674):67-73.
4. German D, Mitalipov S, Mishra A, Kaul S. Therapeutic genome editing in cardiovascular diseases. *JACC Basic Transl Sci* 2019; 4(1): 122–131.
5. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(5):581-8.
6. Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, et al. Correction of beta-thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein & cell*. 2017;8(11):811-22.
7. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & cell*. 2015;6(5):363-72.
8. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017;548(7668):413-9.
9. Ruzo A, Brivanlou AH. At Last: Gene Editing in Human Embryos to Understand Human Development. *Cell stem cell*. 2017;21(5):564-5.
10. Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Molecular genetics and genomics: MGG*. 2017;292(3):525-33.
11. Zhang M, Zhou C, Wei Y, Xu C, Pan H, Ying W, et al. Human cleaving embryos enable robust homozygotic nucleotide substitutions by base editors. *Genome Biol*. 2019;20(1):101.
12. Zuccaro MV, Xu J, Mitchell C, Marin D, Zimmerman R, Rana B, et al. Allele-Specific Chromosome Removal after Cas9 Cleavage in Human Embryos. *Cell*. 2020.

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

## DEVELOPMENTAL POTENTIAL OF ANEUPLOID HUMAN EMBRYOS CULTURED BEYOND IMPLANTATION

**Marta Shahbazi**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MRC Laboratory of Molecular Biology (LMB). Cambridge, UK

Aneuploidy, the presence of an abnormal number of chromosomes, is a major cause of early pregnancy loss in humans. Yet, the developmental consequences of specific aneuploidies remain unexplored. Here, we determine the extent of post-implantation development of human embryos bearing common aneuploidies using a recently established culture platform. We show that while trisomy 15 and trisomy 21 embryos develop similarly to euploid embryos, monosomy 21 embryos exhibit high rates of developmental arrest, and trisomy 16 em-

bryos display a hypo-proliferation of the trophoblast, the tissue that forms the placenta. Using human trophoblast stem cells, we show that this phenotype can be mechanistically ascribed to increased levels of the cell adhesion protein E-CADHERIN, which lead to premature differentiation and cell cycle arrest. We identify three cases of mosaicism in embryos diagnosed as full aneuploid by pre-implantation genetic testing. Our results present the first detailed analysis of post-implantation development of aneuploid human embryos.



## Nace la primera RED de muestras biológicas

- La única RED nacional que cubre las principales capitales de la península, baleares y canarias.
- Todo el personal, los vehículos y las gestiones están certificados, formados y adaptados para el transporte de muestras.
- Contamos con el único seguro de muestras que se ha dado de alta en nuestro país, totalmente único e innovador. Que cubre todo tipo de muestras.
- Tendremos almacenamiento en frío de muestras.
- Tenemos un innovador sistema de trazabilidad adaptado para cada necesidad que el cliente precise.
- Contamos con la ISO Transporte de muestras biológicas a nivel nacional e internacional.
- Podrá conocer en tiempo real la posición de su envío.
- Departamento especializado para atención y traslados de pacientes.

y además....

- Olvide la manipulación incorrecta.
- El desconocimiento del tipo de mercancía y condiciones que precisan sus muestras.
- Olvide el trato de conductores, que no dan valor a la importancia que estas tienen para sus pacientes.
- Ofrezcale a sus pacientes el servicio que cumple íntegramente la normativa y la mejor solución para el traslado de sus muestras.
- Evite las altas temperaturas con envíos controlados.

96 182 66 42 - [info@lab-courier.com](mailto:info@lab-courier.com)

## LAS CÉLULAS MADRE EN LA MEDICINA REPRODUCTIVA: ¿ESTÁN LISTAS PARA EL PACIENTE?

**Cristina Eguizabal Argaiz**

Grupo de Terapia Celular, Células Madre y Tejidos. Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos. IIS Biocruces Bizkaia. [cristina.eguzabalargaiz@osakidetza.eus](mailto:cristina.eguzabalargaiz@osakidetza.eus) / 944 007 151

### ABSTRACT

Las células madre, especialmente las adultas, han demostrado un gran potencial y disponibilidad para el tratamiento de la infertilidad en estudios en animales y humanos entre ensayos preclínicos y clínicos, respectivamente. Las células madre alogénicas de placenta y sangre del cordón umbilical, las células madre autólogas de médula ósea y hematopoyéticas y las derivadas de tejido adiposo son especialmente útiles porque no solo se obtienen fácilmente, sino que también evitan el rechazo del injerto después del trasplante. Recientemente, se han obtenido varios ensayos clínicos con resultados prometedores para tratar los trastornos relacionados con la infertilidad en pacientes masculinos y femeninos. Sin embargo, hay varios problemas relacionados con las terapias con células madre adultas para tratar la infertilidad que deben investigarse: (1) se deben realizar más ensayos clínicos para obtener más datos clínicos y (2) aún se desconoce el mecanismo de las células madre adultas en el tratamiento de la disfunción de los órganos reproductivos.

Además, se están desarrollando muchos enfoques experimentales prometedores basados en células madre para restaurar la fertilidad masculina en niños prepúberes. Recientemente, se han logrado hitos importantes en este campo, el trasplante de SSC se ha traducido a testículos de cadáveres humanos, se ha obtenido una prueba de concepto para el injerto de tejido testicular en primates no humanos y se han dado pasos importantes para establecer la espermatogénesis in vitro. Sin

embargo, hasta que se hayan realizado ensayos clínicos exitosos que demuestren la seguridad y eficacia de la restauración de la fertilidad, la criopreservación del tejido testicular para la preservación de la fertilidad debe seguir siendo experimental.

Finalmente, aunque la diferenciación de células germinales in vitro de las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs) se menciona a menudo como una posible opción futura para el tratamiento de la infertilidad, se debe tener en cuenta que los protocolos reales no permiten una diferenciación suficiente de los espermatozoides u ovocitos completamente maduros, e incluso si es posible, probar la funcionalidad de los mismos mediante la fertilización de los ovocitos y la producción de descendencia presentará muchos conflictos éticos, que deben abordarse con mucho cuidado. Sin embargo, las estrategias de modelado de hiPSCs para estudiar los aspectos fundamentales de la especificación de las células germinales pueden considerarse pasos cruciales para obtener más conocimientos sobre el desarrollo de las células germinales y los procesos de diferenciación. En conclusión, la generación de gametos artificiales a partir de iPSCs humanos es todavía una "perspectiva lejana".

En esta ponencia, resumimos el uso de células madre adultas mediante ensayos clínicos prometedores y los avances gametogénesis in vitro, así como los retos futuros en este campo.



# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

## ESTUDIO MULTICÉNTRICO PARA LA VALIDACIÓN DEL CRITERIO ASEBIR DE VALORACIÓN MORFOLÓGICA DE BLASTOCISTOS

**M. Carme Pons.** Institut Universitari Dexeus, Barcelona  
**Beatriz Carrasco.** Institut Universitari Dexeus, Barcelona  
**Natalia Rives.** Barcelona IVF, Barcelona  
**Arantazu Delgado.** Institut Universitari IVI Valencia, Valencia  
**Álvaro Martínez-Moro.** IVF Spain, Madrid  
**Irene Cuevas.** Hospital General Universitario de Valencia, Valencia  
**Olga Cairó.** CIRH, Barcelona  
carpon@dexeus.com / 696 544 514

### INTRODUCCIÓN

La calidad embrionaria es uno de los factores determinantes en el éxito de las Técnicas de Reproducción Asistida y el criterio de selección del embrión, decisivo en los resultados clínicos y en la reducción del tiempo hasta el nacimiento de un niño sano. El criterio de selección morfológico ha sido aplicado desde los inicios de la Fecundación in vitro y, a pesar de sus limitaciones y de la aparición de nuevos métodos de selección no-invasivos, la mayoría de centros de reproducción humana asistida continúan seleccionando los embriones basándose en parámetros morfológicos.

Distintas sociedades científicas han elaborado sistemas de gradación embrionaria para intentar paliar algunas de las deficiencias del criterio morfológico. En este contexto, la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) fue pionera en la estandarización de un criterio publicando en 2007 una clasificación para embriones tempranos y blastocistos humanos. La clasificación ASEBIR se diseñó, desde el inicio, abierta a modificaciones derivadas del mayor conocimiento científico y, en lo posible, de la evidencia científica. Objetivos prioritarios del Grupo de Interés de Embriología (GIE) han sido su actualización (Cuevas et al., 2018) y su validación. El primer trabajo de validación demostró la validez predictiva del criterio ASEBIR en estadio de día 3 tanto para la tasa de implantación como para la tasa de nacido vivo (Pons et al., 2014).

En los últimos años, con la evolución de las transferencias hacia el estadio de blastocisto, el GIE de ASEBIR se propuso iniciar el proyecto para la validación del criterio ASEBIR en este estadio y, a su vez, para investigar aspectos menos consensuados cuyo conocimiento pudiera contribuir a la reducción de la subjetividad y a la mejora en los resultados clínicos.

El objetivo principal del estudio fue la validación del criterio ASEBIR de clasificación morfológica en estadio de blastocisto mediante el cálculo de las tasas de implantación y de nacido vivo en cada una de las categorías establecidas. Los objetivos secundarios fueron: 1) Evaluar el valor predictivo de cada uno de los parámetros morfológicos del blastocisto [Masa Celular Interna (MCI), Trofotodermo (TE) y grado de expansión (GE)]. 2) Evaluar la influencia de la calidad embrionaria en estadios tempranos sobre la calidad del blastocisto y sus resultados clínicos. 3) Evaluar la influencia del tipo y grado de compactación en día 4 sobre la calidad del blastocisto y sus resultados clínicos. 4) Investigar el impacto de algunos parámetros morfológicos no incluidos en la clasificación actual.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Diseño del estudio

Estudio retrospectivo multicéntrico observacional llevado a cabo por miembros del GIE de ASEBIR. El estudio incluyó 6 centros participantes que aportaron datos de 1044 embriones transferidos desde enero 2017 a diciembre 2019. Se incluyeron transferencias en fresco de un único blastocisto (SET) en día 5 procedentes de ciclos con ovocitos propios (mujeres entre 18 y 39 años) y ovocitos donados (mujeres receptoras entre 18 y 45 años). Las pacientes con malformación uterina o cirugía previa fueron excluidas del estudio, así como los ciclos con muestra seminal criptozoospermica o testicular. Los embriones fueron cultivados en incubadores con sistema time-lapse (37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) y evaluados retrospectivamente según las características morfológicas incluidas en el criterio ASEBIR desde el día 1 hasta el día 5 mediante observación puntual en las horas post-inseminación (hpi) recomendadas (día 1: 17 hpi; día 2: 44 hpi; día 3: 68 hpi; día 4: 92 hpi; día 5: 116 hpi). Adicionalmente, se evaluaron parámetros no incluidos en la clasifica-

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

ción ASEBIR (colapso e hilos) y se realizaron mediciones cuantitativas para distintos parámetros (diámetro del blastocisto, número de células del TE, área de la MCI, porcentaje de células excluidas de la compactación).

## Test de concordancia

Previo al inicio del estudio, se realizó un test de concordancia para determinar el grado de acuerdo entre los centros participantes en la evaluación de las características morfológicas de 30 embriones mediante videos registrados con tecnología time-lapse.

## Análisis estadístico

Todas las variables continuas fueron analizadas para normalidad. Aquellas que no cumplían una distribución normal fueron comparadas utilizando el test U de Mann Whitney. Las variables categóricas fueron comparadas utilizando el test Chi-cuadrado. La relación entre tasas de implantación y nacido vivo fueron analizadas mediante tablas cruzadas y regresión logística bivariada. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado como indicador de significancia estadística. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS versión 20.0. (IBM, New York, USA).

## Aprobación ética

El proyecto ha sido aprobado por los Comités de Ética de Investigación con medicamentos (CEIm) de cada uno de los 6 centros participantes (Código de protocolo: FSD-GIE-2018-08. V1 06/11/2018).

## RESULTADOS

### Test de concordancia

El test de concordancia previo a la realización del estudio mostró un grado de acuerdo entre participantes admisible (índice kappa  $> 0,61$ ) en la mayoría de las características analizadas (fecundación; número de células, fragmentación, multinucleación y vacuolización en día 2 y día 3; estadio en día 4 y grado de expansión y morfología del TF en día 5). Sin embargo, el acuerdo no fue admisible en la evaluación de la MCI ni de la simetría en día 2 y en día 3. Respecto a la categoría asignada según el criterio ASEBIR, aunque el acuerdo fue admisible para el día 5, resultó inadmisibles para día 2, día 3 y día 4. Dado que el grado de acuerdo en el test de concordancia resultó inferior al deseable para respaldar la fiabilidad del estudio multicéntrico, los miembros de la Comisión Permanente del GIE se reunieron para consensuar los parámetros morfológicos y categoría para 30 embriones (valoración de referencia). Posteriormente, se repitió el test de concordancia para determinar el grado de acuerdo de cada centro partici-

pante con la valoración de consenso. Los 6 centros obtuvieron un grado de acuerdo admisible (índice Gwet  $> 0,61$ ) para todos los parámetros y, por tanto, todos los centros pudieron empezar con la recogida de datos.

### Relación entre categoría del blastocisto y tasa de implantación y de nacido vivo

Se analizaron un total de 1044 blastocistos transferidos en día 5. Las tasas de implantación y de nacido vivo globales fueron del 62.7% y del 53.0%, respectivamente. Los blastocistos se clasificaron en categorías según el criterio ASEBIR distribuyéndose de la siguiente forma: 197 blastocistos de categoría A (18.8%), 596 de categoría B (57.1%), 246 de categoría C (23.6%) y 6 de categoría D (0.6%). Dado el bajo número de blastocistos de categoría D, éstos fueron eliminados del análisis. Las diferencias en las tasas de implantación y de nacido vivo entre las distintas categorías fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). Tabla I. La aplicación del modelo de regresión logística mostró que las probabilidades de implantación y de nacido vivo al transferir embriones de categoría A y B son significativamente superiores a las de los embriones de categoría C mientras que no se observaron diferencias significativas entre embriones A y B. (Tabla II).

### Valor pronóstico de los parámetros morfológicos del blastocisto

El análisis del impacto de los tres parámetros morfológicos del blastocisto (morfología de la MCI, morfología del TE y GE del blastocisto) como variables independientes mostró que la morfología del TE y el GE afectaban significativamente a las tasas de implantación (TE: Chi-cuadrado=27.81  $p < 0.001$ ; GE: Chi-cuadrado=37.14,  $p < 0.001$ ) y de nacido vivo (TE: Chi-cuadrado=19.18,  $p < 0.001$ ; GE: Chi-cuadrado=27.69,  $p < 0.001$ ) mientras que la morfología de la MCI no se encontró que afectara de forma significativa ni a la tasa de implantación (Chi-cuadrado=4.1,  $p = 0.13$ ) ni a la de nacido vivo (Chi-cuadrado=5.36,  $p = 0.07$ ). La aplicación del modelo de regresión logística mostró que la morfología del TE era la única variable que podía predecir de forma significativa las probabilidades de implantar o de obtener un nacido vivo. De este modo, un blastocisto con TE A tiene el doble de probabilidad de implantación [OR: 2.17 (1.38-3.39)] y de dar lugar a un nacido vivo [OR: 1.95 (1.26-3.0)] que un blastocisto con TE C. Tabla III.

El análisis de la distribución de los blastocistos según la morfología del TE y de la MCI mostró que existía relación entre ambas variables ( $p < 0.001$ ). De los blastocistos con MCI A ( $n = 479$ ), la mayoría tenían TE A (29.2%) o B (61.2%) frente al 9.6% con TE C. En cambio, de los blastocistos con MCI C ( $n = 121$ ), el porcentaje que tenían TE A fue del 9.1% frente al 38 % con TE C. Tabla IV.

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

Al analizar los resultados en función de la categoría de la MCI y del TE, se observaron diferencias en las tasas de implantación y de nacido vivo cuando los blastocistos tenían MCI C, aunque estas diferencias no fueron significativas. Tabla V y Tabla VI.

## Influencia de la calidad embrionaria en día 3

La categoría de los embriones en día 3 se relacionó positivamente con la categoría en día 5, de tal manera que, a mayor calidad del embrión en estadio de división, mayor calidad del blastocisto desarrollado a partir de ese embrión. Sin embargo, una vez el embrión fue clasificado en día 5, no se observaron diferencias significativas en la tasa de implantación o de nacido vivo en función de la categoría asignada en día 3.

## Influencia de la calidad embrionaria en día 4

El grado de compactación en día 4 se relacionó positivamente con la categoría del embrión en día 5, de forma que, a mayor grado de compactación, mayor calidad del blastocisto desarrollado a partir de ese embrión. Sin embargo, una vez el embrión fue clasificado en día 5, se observaron diferencias significativas en la tasa de implantación en función del grado de compactación en día 4, pero no se observaron en la tasa de nacido vivo. Impacto de algunas características no incluidas en la clasificación ASEBIR.

Las características analizadas han sido la presencia de hilos, la presencia de colapso y la exclusión de células durante la formación del blastocisto. La observación de hilos se relacionó positivamente con la tasa de implantación (64.6% vs 61.1%) y de nacido vivo (54.3% vs 51.2%) aunque no significativamente ( $p=0.26$ ). Respecto al colapso, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de implantación o de nacido vivo entre los blastocistos que habían colapsado y los que no. En cuanto al impacto de la exclusión celular, se ha observado que a mayor porcentaje de células excluidas, peor calidad en día 5 ( $p<0.001$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados del estudio multicéntrico demuestran que la clasificación ASEBIR en estadio de blastocisto tiene valor pronóstico tanto para la tasa de implantación como para la tasa de nacido vivo, ya que dichas tasas aumentan gradualmente según la categoría del blastocisto, siendo máximas en los de categoría A y mínimas en los de categoría D.

La evaluación del impacto de cada uno de los parámetros del blastocisto como variables independientes encuentra que la morfología del TE es el mejor indicador para predecir implan-

tación y el nacimiento de un niño, lo cual no es sorprendente ya que el criterio ASEBIR prioriza la morfología del TE frente a la morfología de la MCI. Este resultado concuerda con otros estudios publicados (Ahlström et al., 2011; Hill et al., 2013; Thompson et al., 2013) aunque no es un hallazgo corroborado por otros autores (Van den Abbeel et al., 2013; Irani et al., 2017). Esta escasez de consenso entre autores es debida, en parte, al sesgo generado en la selección del blastocisto según el criterio usado por cada autor.

Con respecto a la morfología de la MCI, se observa una tendencia a encontrar tasas de implantación y nacido vivo inferiores en blastocistos con MCI C. Aunque estas diferencias no sean estadísticamente significativas, sí lo son desde el punto de vista clínico. Las diferencias en la tasa de implantación se encuentran entre un 6 y un 9% respecto a los blastocistos con MCI A o B. Las diferencias en la tasa de nacido vivo son aún mayores, con una disminución alrededor del 10% respecto a los blastocistos con MCI A o B, lo cual indica una tendencia de los blastocistos con MCI C a mayores tasas de aborto.

El estudio confirma la influencia positiva de la calidad embrionaria en estadios tempranos sobre la calidad del blastocisto generado pero descarta cualquier influencia sobre la tasa de nacido vivo. Por lo tanto, en el momento de seleccionar un blastocisto para transferir se debe priorizar la calidad del blastocisto frente a la calidad de ese embrión en estadios tempranos ya que solo la calidad del blastocisto es capaz de predecir la implantación o el nacimiento de un niño vivo. Otros autores encuentran resultados similares (Herbemont et al., 2017).

En cuanto a las características no incluidas en la clasificación ASEBIR, los resultados indican que la exclusión celular debe considerarse parámetro negativo y la presencia de hilos podría considerarse parámetro favorable.

Este estudio se caracteriza por ser un estudio multicéntrico, con un gran número de blastocistos analizados y con un test de concordancia previo a la recogida de datos lo que da gran fortaleza a los resultados.

## AGRADECIMIENTOS

A los respectivos centros por la colaboración en la obtención de los datos.

A Luís Martínez Granados y Sandra García por la asistencia en el análisis estadístico.

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

## BIBLIOGRAFÍA

Ahlström A, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod [Internet]* 2011;26:3289–3296.

Cuevas I, Pons Gatell MC, Cuadros Vargas M, Delgado Mendive A, Rives Enedáguila N, Moragas Solanes M, Carrasco Canal B, Teruel López J, Busquets Bonet A, Hurtado de Mendoza Acosta MV. The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Med Reprod Embriología Clínica* 2018;5:42–54.

Herbement C, Sarandi S, Boujenah J, Cedrin-Durnerin I, Sermondade N, Vivot A, Poncelet C, Grynberg M, Sifer C. Should we consider day-2 and day-3 embryo morphology before day-5 transfer when blastocysts reach a similar good quality? *Reprod Biomed Online* 2017;35:521–528.

Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, Levens ED. Trophoctoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril [Internet]* 2013;99:1283–1289.e1. Elsevier.

Irani M, Reichman D, Robles A, Melnick A, Davis O, Zaninovic N, Xu K, Rosenwaks Z. Morphologic grading of euploid blastocysts influences implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril* 2017;107:664–670.

Pons MC, Santos MJ de los, Múgica A, Vilches MÁ, Arroyo G, González B, Moragas M, García-Cerrudo E, Figueroa MJ, Prados F, et al. Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR: estudio multicéntrico para la validación del criterio ASEBIR de valoración morfológica de embriones tempranos en día +3 y su asociación con la tasa de nacido vivo. *Med Reprod Embriología Clínica* 2014;1:50–55.

Thompson SM, Onwubalili N, Brown K, Jindal SK, McGovern PG. Blastocyst expansion score and trophoctoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): a national study. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1577–1581.

Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJG, Klein BM, Helmgaard L, Arce J-C. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online* 2013;27:353–361.

## TABLAS

**Tabla I.** Tasa de implantación y tasa de nacido vivo según la categoría de los embriones en día 5 clasificados según el criterio ASEBIR

	Blastocistos Transferidos (n)	Blastocistos Implantados (n)	Tasa Implantación (%)	Nacidos vivos (n)	Tasa Nacido vivo (%)
<b>A</b>	197	140	71.1%	120	60.9%
<b>B</b>	596	399	66.9%	335	56.2%
<b>C</b>	246	115	46.8%	95	38.6%

Chi-cuadrado  $p < 0.001$

**Tabla II.** Probabilidad de implantación y nacido vivo de los embriones de categoría A y B con respecto a la categoría C

Categoría	Implantación			Nacido vivo		
	OR	IC 95%		OR	IC 95%	
<b>A</b>	2.78	1.87	4.13	2.49	1.7	3.67
<b>B</b>	2.32	1.72	3.15	2.09	1.54	2.83

OR: odd ratio; IC: intervalo de confianza.

Los valores de OR indican el factor por el que se incrementa la probabilidad de implantación y de nacido vivo de cada categoría en comparación con la categoría C.

# SESIÓN DE EMBRIOLOGÍA

**Tabla III.** Modelo de regresión logística multivariable para los parámetros morfológicos del blastocisto (TE, MCI, GE)

Parámetro	Categoría	Implantación			Nacido Vivo				
		p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%		
TE	A	0.001	2,17	1.38	3.39	0.003	1.95	1.26	3.0
	B	0.001	1.96	1.39	2.76	0.002	1.71	1.22	2.4
	vs C								
MCI	A	0.675	1.1	0.71	1.69	0.274	1.26	0.83	1.93
	B	0.385	1.21	0.79	1.86	0.111	1.4	0.92	2.14
	vs C								
GE	1	0.138	3.07	0.7	13.49	0.122	3.64	0.71	18.7
	2	0.121	3.23	0.73	14.25	0.125	3.61	0.70	18.6
	3	0.467	1.73	0.39	7.56	0.29	2.42	0.47	12.4
	vs 4								

OR: odd ratio; IC: intervalo de confianza

GE 1: blastocisto eclosionado + blastocisto eclosionando

GE 2: blastocisto expandido

GE 3: blastocisto en expansión

GE 4: blastocito temprano + cavitando

**Tabla IV.** Distribución de los blastocistos según la categoría de la MCI y del TE (n=990)

Categoría MCI	Categoría TE			
	A n, %	B n, %	C n, %	total n, %
A	140	293	46	479
	29.2%	61.2%	9.6%	100%
B	46	239	105	390
	11.8%	61.3%	26.9%	100%
C	11	64	46	121
	9.1%	52.9%	38.0%	100%
total	197	596	197	990

#: porcentaje de blastocistos dentro de cada categoría de MCI

**Tabla V.** Tasa de implantación según la categoría de la MCI y del TE (n=990)

MCI	Blastocistos implantados, n			
	Tasa Implantación, %			
	A	TE B	C	total
A	99	198	22	319
	70.7%	67.6%	47.8%	66.6%
B	34	161	51	246
	73.9%	67.4%	48.6%	63.1%
C	7	40	22	69
	63.6%	62.5%	47.8%	57.0%
total	140	399	95	634
	71.1%	67%	48.2%	64.0%

**Tabla VI.** Tasa de nacido vivo según la categoría de la MCI y del TE (n=990)

MCI	Nacidos vivos, n			
	Tasa nacido vivo, %			
	A	TE B	C	total
A	87	164	19	270
	62.1%	56.0%	41.3%	56.4%
B	29	138	44	211
	63.0%	57.7%	41.9%	54.1%
C	4	33	17	54
	36.4%	51.6%	37.0%	44.6%
total	120	335	80	535
	60.9%	56.2%	40.6%	54.0%

Con el Seguro de Responsabilidad Civil  
 Profesional de Segurmec puedes contratar  
 un capital asegurado de hasta  
**1 200 000 €**

Incluye coberturas específicas para nuestro colectivo tales como la  
 Garantía de Gametos y Preembriones y la posibilidad de asegurar a las  
 Sociedades Profesionales sin coste añadido

Llama ahora  
 al **944 354 600**  
 e infórmate

Teléfono exclusivo para asociadas  
 y asociados comercializado por  
 la Correduría de Seguros del  
 Colegio de Médicos  
 de Bizkaia

Nº Registro DGSFP J-1,281. Concertado Seguro de R.C. y de Caución conforme a la Ley 24/2006

**Hay un antes...**  
**a.Z.**  
 antes de Zurich  
 Te mejoran el precio  
 de tus seguros

**y un después**  
**d.Z.**  
 después de Zurich  
 Te mejoramos el precio  
 de tus nuevos seguros  
 y llévate hasta...  
**80€\***

Estimada asociada o asociado, ¿has oído que siempre hay un antes y un después?

El momento de descubrirlo ha llegado de la mano de Zurich con una oferta que no te dejará indiferente.

**Por pertenecer a ASEBIR te mejoramos el precio de tus nuevos seguros y además te llevas hasta 80€ de bienvenida\* al contratar.**

Vente a Zurich y empieza a ahorrar.

**Infórmate**



AUTO



MOTO



HOGAR



NEGOCIO



\*La mejora de precio será de, hasta un 5% respecto al precio de renovación presentado a Zurich. Promoción válida para nuevas contrataciones realizadas entre el 1 de febrero y el 30 de junio de 2021 para pólizas de Auto, Moto, Hogar y Negocios. Adicionalmente el cliente recibirá hasta 80€ para nuevas contrataciones de los productos y en las condiciones que constan en las bases de esta promoción, realizadas entre el 1 de febrero y el 31 de diciembre de 2021. El abono de esta promoción se realizará a través de una transferencia bancaria al cliente en el plazo de 90 días desde la contratación y en la misma cuenta con la que hubiera realizado el pago. Con independencia del número total de pólizas nuevas contratadas y de la modalidad, el importe máximo a reintegrar a un mismo tomador (NIF) será 250€. Para ampliar el conocimiento sobre la mecánica, condiciones y promociones para otras modalidades/productos, consulta las bases en <http://colectivos.zurich.es/promocion2021>. Estos productos pertenecen a Zurich Insurance plc, Sucursal en España. Producto intermediado por SegurMec Correduría de Seguros, S.L. DGSFP J1281. El corredor recomienda estos productos sobre la base del análisis objetivo previsto en la Ley de Mediación de seguros y reaseguros privados.

# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

## EL RNA ESPERMÁTICO: UN CAMPO EMERGENTE EN LA BÚSQUDA DE BIOMARCADORES DE FERTILIDAD MASCULINA

**Joan Blanco, Celia Corral-Vázquez, Francesca Vidal, Zaida Sarrate, Ester Anton**

Genetics of Male Fertility Group, Unitat de Biologia Cel·lular (Facultat de Biociències), Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain.

Joan.blanco@uab.cat / 935 813 728

El seminograma es la herramienta de análisis más común para la evaluación de la infertilidad masculina en el ámbito clínico. Las muestras de semen que presentan parámetros que se desvían de los rangos de normalidad se consideran alteradas y, por lo tanto, se relacionan con el deterioro reproductivo observado en los pacientes. No obstante, el potencial diagnóstico del seminograma presenta algunas limitaciones debido a la existencia de correlaciones inciertas entre las variables seminales analizadas y las tasas de éxito de los ciclos de reproducción asistida (Wang y Swerdloff 2014; Tomlinson 2016). Además, el seminograma no aporta ningún beneficio diagnóstico en pacientes infértiles con valores seminales normales. Esto sugiere que las causas de la infertilidad no siempre pueden detectarse mediante esta prueba diagnóstica. En consecuencia, son necesarios nuevos procedimientos que permitan predecir el potencial fértil de los pacientes más allá de sus características seminales.

En este sentido, el desarrollo y la aplicación en medicina reproductiva de las tecnologías ómicas ha permitido analizar hasta límites insospechados la carga molecular de los espermatozoides fecundantes y sus funciones asociadas. Entre las distintas posibilidades de análisis, el análisis del transcriptoma espermático ha sido una de las más estudiadas al integrar, en un solo estudio, información relativa a la secuencia de DNA e información relacionada con las marcas epigenéticas de control de la expresión génica. Así pues, el conocimiento que tenemos en la actualidad del RNA espermático permite contemplar su análisis como una herramienta complementaria o incluso sustitutoria del seminograma para el diagnóstico de la infertilidad masculina. Una situación que abre la posibilidad de utilizar este tipo de moléculas como marcadores de fertilidad masculina en distintas situaciones.

### Tipos y funciones del RNA espermático

Los espermatozoides eyaculados presentan una población compleja de moléculas de RNA que en su conjunto constituyen el transcriptoma espermático. Esta población está formada por RNA codificante (mRNA) y por RNA no codificante. Estos últimos se dividen en RNA pequeños no codificantes (small non-coding RNA o sncRNA) y RNA largos no codificantes (long non-coding RNA o lncRNA). A su vez, los sncRNAs se clasifican principalmente en microRNAs (miRNAs), RNAs asociados a PIWI (PIWI-interacting RNAs o piRNAs), RNAs pequeños de interferencia (small interfering RNAs o siRNAs) y siRNAs endógenos (endogenous siRNAs o endo-siRNA) (Corral-Vázquez et al., 2017). Este conjunto de moléculas, lejos de ser un residuo de las olas transcripcionales que se producen durante la espermatogénesis, presenta una amplia gama de implicaciones funcionales relacionadas con la función espermática y con el desarrollo embrionario temprano (Salas-Huetos et al. 2014; Corral-Vázquez et al. 2021).

En cuanto a los mRNA, éstos se pueden dividir en tres grupos principales atendiendo a su procedencia y función. El primer grupo englobaría los transcritos expresados específicamente en los espermatozoides y espermátidas que han ido permaneciendo de forma residual en las células germinales hasta su diferenciación final en espermatozoides (Boerke et al. 2007). El ejemplo más significativo de este grupo lo constituirían los transcritos de protamina 2 (PRM2), expresados específicamente en espermátidas y cuya función está directamente relacionada con la condensación de la cromatina espermática (Miller y Ostermeier, 2006). A pesar de que la mayoría de las moléculas que constituyen este grupo se interpretan como un residuo de acontecimientos previos de la espermatogénesis, su presencia en los espermatozoides eyaculados puede ser in-

# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

terpretado como un marcador molecular de la corrección de la espermatogénesis, es decir, una alteración de la expresión indicaría que alguno de los procesos previos no se ha producido adecuadamente.

En el segundo grupo incluiría los mRNAs sintetizados de forma específica en las espermátidas y que sí mostrarían una función asociada al desarrollo del cigoto. Esta población de mRNAs se mantiene estable al menos hasta la activación del genoma embrionario, codificando proteínas involucradas en procesos de respuesta al estrés, embriogénesis, morfogénesis e implantación (Boerke et al. 2007). El mRNA AKAP-4 (A-kinase anchoring protein 4) sería un ejemplo a incluir en este grupo; esta molécula codifica para una proteína involucrada en la activación del ovocito después de la fecundación (Appert-collin et al. 2006; Boerke et al. 2007). PLC-Z (Phospholipase c-zeta), cuyo mensajero es específico de las espermátidas, ejerce un papel clave en la embriogénesis temprana al desencadenar un incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el ovocito fecundado, causando con ello que complete la meiosis y se produzca la activación del cigoto (Saunders et al. 2007).

El tercer grupo abarca los mRNAs que no son sintetizados dentro de las células germinales, sino que son incorporados al interior del espermatozoide a través de entidades extracelulares (Boerke et al. 2007). El plasma seminal contiene una alta concentración de RNA extracelular encapsulado en microvesículas provenientes del epidídimo y la próstata (Li et al. 2012). Existen hipótesis que sostienen que las microvesículas pueden transferir moléculas de RNA al interior del espermatozoide durante su tránsito a través del epidídimo y los conductos eyaculatorios (Valadi et al. 2007). El ejemplo más conocido es el de la clusterina o SGP-2 involucrada con la maduración espermática (Boerke et al. 2007).

Además del conjunto de mRNAs, diversos estudios también demuestran la importancia de las moléculas de RNA no codificante en la funcionalidad del espermatozoide. Por ejemplo, se cree que los miRNAs y endo-siRNAs espermáticos, al igual que los mRNAs, son liberados en el ovocito y permanecen intactos hasta el comienzo de la activación del genoma embrionario (Boerke et al. 2007). En ovocitos de ratones en metafase II, se expresan diversos mRNA diana de miRNAs presentes exclusivamente en espermatozoides maduros (Amanai et al. 2006). Por otro lado, los perfiles de miRNAs espermático se han relacionado mediante herramientas de ontología génica con la embriogénesis y la espermatogénesis (Salas-Huetos et al. 2014). Además, los lncRNA espermáticos regulan un conjunto de genes diana que están relacionados con la adhesión celular y los procesos de desarrollo embrionario (Corral-Vázquez et al. 2021).

## Los RNA espermáticos como marcadores de infertilidad masculina

La información facilitada en la sección anterior pone de manifiesto la importancia de la carga del RNA espermático para la consecución de funciones esenciales de este tipo celular. Así pues, el análisis de variaciones de la expresión de determinados transcritos es, en la actualidad, un foco de atención en el estudio de la infertilidad masculina.

### Diagnóstico molecular de las alteraciones seminales

Ciertos RNA espermáticos presentan una expresión diferencial en poblaciones de individuos infértiles con alteraciones seminales. Muchos de estos estudios han permitido asociar variaciones de la expresión de RNAs específicos con alteraciones del recuento, movilidad o morfología espermática (Corral-Vázquez et al. 2017). Estos biomarcadores de RNA serían especialmente informativos en pacientes cuyos parámetros seminales están cerca de los valores umbral y, por lo tanto, la clasificación de la muestra presenta algunas dudas.

### Diagnóstico molecular de individuos normozoospermicos infértiles

Este grupo de pacientes representa alrededor del 30% de las consultas por infertilidad masculina. El manejo clínico de estos casos es especialmente complicado, sobre todo cuando no existen factores femeninos concomitantes. Así pues, la descripción de marcadores moleculares que permitan identificar estos pacientes sería de gran utilidad en el campo de la reproducción asistida. En este sentido, se han descrito algunos candidatos como son los mRNAs de la tripsina TRY1, la variante 3 del transcrito de la glutamiltransferasa GGT1, y el mRNA de la proteína CAB39L (calcium binding protein 39 like) (Garrido et al. 2009). Asimismo, en un estudio realizado sobre la fracción específica de miRNAs espermáticos, se identificaron perfiles de miRNAs homogéneos entre los individuos normozoospermicos infértiles que se diferenciaron claramente de los perfiles obtenidos en normozoospermicos fértiles (Salas-Huetos et al. 2016). Además, las diferencias observadas estaban asociadas a genes diana relacionados con el desarrollo embrionario.

### Predicción de la recuperación de espermatozoides testiculares mediante métodos no invasivos

La caracterización de transcritos libres presentes en el plasma seminal de pacientes con azoospermia secretora se ha realizado con la finalidad de identificar marcadores de RNA que permitan predecir la presencia de focos activos de espermatogénesis, y que, por lo tanto, indiquen la posibilidad de re-



# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

cuperar espermatozoides previo a la aplicación de biopsias o punciones testiculares. Aunque los resultados en este ámbito son limitados, se han descrito distintas moléculas candidatas como son TNP1 y PRM1 (Hashemi et al. 2020), DDX4 (Li et al. 2012; Yu et al. 2016), ESX1 (Pansa et al. 2014) o incluso el análisis de la expresión combinada de PRM1, PRM2, AKAP4, and DAZ (Aslani et al. 2011).

## Predicción de los resultados de los ciclos de reproducción asistida

Otros estudios de expresión en espermatozoides se han centrado en identificar biomarcadores específicos de parámetros relacionados con el éxito obtenido en los tratamientos de reproducción asistida como son la tasa de embarazo (García-Herrero et al. 2011), la tasa de fecundación y desarrollo embrionario (Depa-Martynów et al. 2007), o incluso con pérdidas de embarazo recurrentes (Rogenhofer et al. 2017).

Como acabamos de describir, disponemos de mucha información acerca de las alteraciones del transcriptoma de los espermatozoides que condicionan su funcionalidad y, en consecuencia, tenemos diferentes candidatos a biomarcadores de infertilidad masculina. No obstante, las evidencias científicas para las distintas moléculas candidatas son muy dispares. El desafío para el futuro cercano es el manejo y la organización de toda esta información con la finalidad de seleccionar las evidencias incuestionables. Esta labor permitirá valorar la posibilidad de transferir el análisis de RNA espermático a la práctica clínica con la finalidad de mejorar las estrategias diagnósticas, pronósticas y terapéuticas de los hombres infértiles.

## AGRADECIMIENTOS

Universitat Autònoma de Barcelona (CF-180034). Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya (2017/SGR-503)

## BIBLIOGRAFÍA

Amanai, M., Brahmajosyula, M., Perry, A., 2006. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol. Reprod.* 75, 877-884.

Appert-collin, A., Baisamy, L., Diviani, D., 2006. Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling by A-Kinase Anchoring Proteins Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling by A-Kinase Anchoring Proteins. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 26, 631-646.

Aslani, F., Modarresi, M.H., Soltanghorae, H., Akhondi, M.M., Shabani, A., Lakpour, N., Sadeghi, M.R., 2011. Seminal molecular markers as a non-invasive diagnostic tool for the evaluation of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 57,190-196.

Boerke, A., Dieleman, S., Gadella, B., 2007. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 68, 147-155.

Corral-Vázquez, C., Blanco, J., Anton, E., 2017. RNA espermático: ¿huella de eventos pasados o dote para el embrión? *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 4, 59-81.

Corral-Vázquez, C., Blanco, J., Aiese Cigliano, R., Sarrate, Z., Rivera-Egea R., Vidal, F., Garrido, N., Daub, C., Anton, E., 2021. The RNA content of human sperm reflects prior events in spermatogenesis and potential post-fertilization effects. *Mol. Hum. Reprod.* 27, gaab035.

Depa-Martynów, M., Kempisty, B., Lianeri, M., Jagodziński, P., Jedrzejczak, P., 2007. Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochem. Cytobiol.* 45, 79-85.

García-Herrero, S., Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Remohí, J., Pellicer, A., Meseguer, M.,

2011. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod. Biomed. Online* 22, 25-36.

Garrido, N., Martínez-Conejero, J.A., Jauregui, J., Horcajadas, J.A., Simón, C., Remohí, J., Meseguer, M., 2009. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil. Steril.* 91, 1307-1310.

Hashemi, M.S., Mozdarani, H., Ghaedi, K., Nasr-Esfahani, M.H., 2020. Could analysis of testis-specific genes, as biomarkers in seminal plasma, predict presence of focal spermatogenesis in non-obstructive azoospermia? *Andrologia* 52, e13483.

Li, H., Huang, S., Guo, C., Guan, H., Xiong, C., 2012. Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms. *PLoS One* 7, e34566.

# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

Miller, D., Ostermeier, G.C., 2006. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update* 12, 757-767.

Pansa, A., Sirchia, S.M., Melis, S., Giacchetta, D., Castiglioni, M., Colapietro, P., Fiori, S., Falcone, R., Paganini, L., Bonaparte, E., Colpi, G., Miozzo, M., Tabano, S., 2014. ESX1 mRNA expression in seminal fluid is an indicator of residual spermatogenesis in non-obstructive azoospermic men. *Hum. Reprod.* 29, 2620-2627.

Rogenhofer, N., Dansranjavin, T., Schorsch, M., Spiess, A., Wang, H., Von Schönfeldt, V., Cappallo-Obermann, H., Baukloh, V., Yang, H., Paradowska, A., Chen, B., Thaler, C.J., Weidner, W., Schuppe, H.C., Steger, K., 2013. The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Hum. Reprod.* 28, 969-978.

Salas-Huetos, A., Blanco, J., Vidal, F., Mercader, J.M., Garrido, N., Anton, E., 2014. New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 102, 213-222.

Salas-Huetos, A., Blanco, J., Vidal, F., Grossmann, M., Pons, M.C., Garrido, N., Anton, E., 2016. Sperm from normozoospermic fertile and infertile individuals convey a distinct miRNA cargo. *Andrology.*

Saunders, C., Swann, K., Lai, F., 2007. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem. Soc. Simp.* 74, 23-36.

Tomlinson, M.J., (2016). Uncertainty of measurement and clinical value of semen analysis: has standardisation through professional guidelines helped or hindered progress?. *Andrology*, 4: 763-770

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654-659.

Wang, C., Swerdloff, R., 2014. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil. Steril* 102, 1502-1507.

Yu Q, Gu Z, Shang X, Li H, Xiong C (2016) Discrimination and characterization of Sertoli cell-only syndrome in non-obstructive azoospermia using cell-free seminal DDX4. *Reprod Biomed Online* 33(2) 189-196

# ASEBIR

Asociación para el Estudio  
de la Biología de la Reproducción

¿Aún no disfrutas de las **ventajas ASEBIR?**

¡Hazte socio ahora y aprovéchalas!

- > Acceso a las becas Aula Joven y Bolsa de Viaje/estancia de formación
- > Asesoría jurídica gratuita
- > Seguro de Responsabilidad Civil bonificado
- > Precios especiales y acceso prioritario a la formación y el Control de Calidad ASEBIR
- > Posibilidad de formar parte de los Grupos de Interés
- > ¡Y mucho más!

Hazte socio ASEBIR por solo 50€/año\*

\*Descuentos especiales para menores de 30 años, estudiantes de doctorado o master o en situación de desempleo.

[www.asebir.com](http://www.asebir.com) / registrarse



## PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESENCIALES PARA LA FECUNDACIÓN. APLICACIÓN EN MICROESFERAS Y MODELOS TRIDIMENSIONALES

**María Jiménez-Movilla<sup>1,2,3</sup>, Julieta G. Hamze<sup>1,2,3</sup> and Raquel Romar<sup>2,3,4</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, España. <sup>2</sup>Instituto Murciano de Investigación Biomédica (IMIB-Arrixaca), Murcia, España, <sup>3</sup>"Campus Mare Nostrum" de Excelencia Internacional, Murcia, España, <sup>4</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia, España.

María Jiménez Movilla (mariajm@um.es / 868 889 432)

Julieta G. Hamzé Araujo (julietagabriela.hamze@um.es / 868 889 432)

Raquel Romar Andrés (rromar@um.es / 868 884 791)

### INTRODUCCIÓN

Para generar un individuo nuevo, único y diploide con la capacidad totipotente de desarrollarse como un organismo específico de la especie, dos células haploides altamente diferenciadas de cada progenitor, el óvulo y el espermatozoide, tienen que reconocerse, unirse y fusionarse. Este evento, denominado fecundación, da como resultado la generación de un cigoto e involucra varias etapas en las que diferentes procesos moleculares deben desencadenar la actividad celular de los gametos necesaria para cumplir este proceso. De modo que, una vez que el espermatozoide ha alcanzado al óvulo, el primer contacto para el reconocimiento de gametos está mediado por la matriz extracelular que los rodea, denominada zona pelúcida (ZP). El contacto inicial asegura el reconocimiento de gametos específicos de la especie y desencadena una cascada de reacciones en los espermatozoides necesarios para penetrar a través de ZP y alcanzar así el espacio perivitelino para encontrarse con la membrana del óvulo, conocida como oolema. Para unirse y fusionarse, las membranas de ambos gametos deben adherirse, y las proteínas de la membrana en cada una de las células deben interactuar adecuadamente entre sí. Finalmente, deben ocurrir una serie de eventos moleculares en la membrana para que las dos células se fusionen y compartan su contenido celular. Todos estos fenómenos requieren la participación de moléculas específicas y la activación de cascadas moleculares que coordinan adecuadamente todos los procesos celulares que implican el reconocimiento y la fusión de gametos.

A pesar de que la señalización celular es un proceso biológico fundamental que ha sido bien estudiado en muchos tipos celulares de un solo organismo (Waters and Bassler, 2005; Mathieu et al., 2019), en los mamíferos, la mayoría de las moléculas específicas involucradas en la fecundación, y los mecanismos subyacentes detrás del reconocimiento y fusión de las

membranas de los gametos, siguen siendo en gran parte desconocidos. Esto en parte es debido a que la investigación en el campo de la reproducción, y más concretamente la centrada en estudios de fecundación, tiene varios inconvenientes y limitaciones. Por ejemplo, la recuperación de óvulos y su uso en investigación tiene fuertes implicaciones bioéticas; los estudios con óvulos implican, en muchos casos, una intervención quirúrgica o sacrificio de animales; y el número de muestras obtenidas es insuficiente para realizar estudios bioquímicos y moleculares profundos y detallados. Por otro lado, el espermatozoide fecundante es el que se encuentra en el espacio perivitelino por lo que recuperarlo para su análisis y caracterización es muy complicado. En los últimos años, la extrapolación de los resultados obtenidos en el proceso de fecundación en especies donde los enfoques y diseños experimentales son más simples, ha proporcionado interesantes candidatos en el proceso de fecundación (Carlisle and Swanson, 2020). Sin embargo, las secuencias de proteínas reproductivas tienden a ser muy divergentes en especies estrechamente relacionadas y, a menudo, muestran regiones de selección darwiniana positiva (Swanson et al., 2001a; Swanson et al., 2001b; Swanson and Vacquier, 2002; Clark and Swanson, 2005; Clark et al., 2006; Grayson, 2015), lo que dificulta la extrapolación de proteínas potencialmente candidatas entre especies. Además, en los mamíferos, el proceso de fusión celular ocurre entre un número limitado de tipos celulares, como, espermatozoides y ovocitos durante la fecundación, trofoblastos durante la formación de la placenta, macrófagos que forman células gigantes, y formación de osteoclastos y mioblastos en la generación de miofibras y miotubos (Horsley and Pavlath, 2004). De manera que las bases moleculares de la fusión celular parecen ser muy específicas para un pequeño grupo de tipos celulares, lo que también ha contribuido al hecho de que actualmente solo unas pocas proteínas se hayan confirmado como esenciales en el proceso de fecundación en mamíferos.

# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

Existen buenas razones para profundizar en el conocimiento de las moléculas involucradas en el proceso de fecundación, ya que probablemente desempeñan papeles importantes en procesos biológicos fundamentales como la especie-especificidad del proceso de fecundación, el autorreconocimiento para evitar la endogamia y la prevención de la polispermia, pero también porque su estudio podría conducir a comprender algunos de los mecanismos fisiopatológicos que causan la infertilidad femenina o masculina. Además, las proteínas receptoras presentes en las regiones extracelulares de los gametos son directamente accesibles a posibles terapias administradas sistémicamente, por lo que pueden usarse más fácilmente como diana para desarrollar nuevas terapias anti-conceptivas para, por ejemplo, prevenir la fecundación o por el contrario ayudar en el control de poblaciones en ciertas especies.

Como se mencionó anteriormente, el reconocimiento de gametos implica un primer contacto y unión de los espermatozoides con los receptores ZP que rodean al óvulo. La ZP es una matriz glicoproteica de aproximadamente 15-20  $\mu\text{m}$  de grosor formada por tres o cuatro glicoproteínas (ZP1-ZP4) en mamíferos euterios (Wassarman, 2008; Moros-Nicolas et al., 2021). Aunque ha habido cierta controversia sobre la actividad molecular de cada una de estas proteínas durante el reconocimiento de la zona pelúcida por parte de los espermatozoides, los resultados más recientes y concluyentes con ratones editados genéticamente indican que el éxito de la unión de los espermatozoides a la cubierta del óvulo depende de la proteína ZP2. En ratones, los espermatozoides reconocen y se adhieren al dominio de unión ZP251-149 ubicado en el extremo amino de ZP2 antes de penetrar la ZP (Avella et al., 2013) y las ratonas que producen ovocitos con una ZP que carece de proteína ZP2 son estériles (Avella et al., 2014). Además, el dominio ZP2 requerido para la unión de los espermatozoides regula el reconocimiento de gametos especie-específico, ya que los espermatozoides humanos no pueden unirse a los óvulos de ratonas pero las ratonas transgénicas con ovocitos expresan ZP2 humana sí tienen la capacidad de unir espermatozoides humanos perdiendo su capacidad de unir espermatozoides de ratón (Avella et al., 2014). Este reconocimiento, impulsado por el extremo N-terminal de ZP2, no depende de la glicosilación de esta proteína, como se ha mostrado recientemente (Tokuhiro and Dean, 2018; Gabriela Hamze et al., 2020).

## PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESENCIALES PARA LA FECUNDACIÓN

Una vez que los espermatozoides atraviesan la ZP y entran en el espacio entre la matriz y la membrana del ovocito, conocido como espacio perivitelino, se enfrentan a las moléculas

responsables de la unión y fusión de las membranas para dar lugar a la fecundación. La primera proteína de membrana que se describió como esencial para el proceso de fecundación fue CD9 (Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000), una proteína de superficie celular perteneciente a la superfamilia de las tetraspaninas que participa en la migración, adhesión, proliferación, diferenciación y transducción de señales celulares. Una investigación exhaustiva usando ratones deficientes en CD9 mostró que la forma y distribución de las microvellosidades de la membrana del ovocito se encuentra alterada (Runge et al., 2007), lo que sugiere que esta proteína estaría involucrada en la organización de la arquitectura del oolema y de otras proteínas integradas en ella (Ziyyat et al., 2006; Jégou et al., 2011). En 2005 se identificó IZUMO1, una proteína de la superficie espermática, como esencial para la fertilidad masculina (Inoue et al., 2005). Los autores generaron animales deficientes en IZUMO1 (IZUMO1<sup>-/-</sup>) para evaluar su papel en la fecundación de manera que las hembras que carecían de la proteína eran fenotípicamente normales y fértiles. Por el contrario, aunque los machos IZUMO1<sup>-/-</sup> eran fenotípicamente normales, y sus espermatozoides también normales en morfología y motilidad, eran completamente infértiles. En este estudio se corroboró que los espermatozoides IZUMO1<sup>-/-</sup> podrían llegar a los óvulos in vivo, no presentaban una reducción en su capacidad de unirse y penetrar la ZP in vitro y, una vez en el espacio perivitelino, podían unirse a la membrana plasmática del óvulo. Sin embargo, ni un solo espermatozoide IZUMO1<sup>-/-</sup> se fusionó con el oolema. Los autores atribuyen esta incapacidad de fusión directamente a la falta de IZUMO1, puesto que la expresión de esta proteína en machos IZUMO1<sup>-/-</sup> restauró su capacidad fecundante. Finalmente, observaron que inyectando espermatozoides IZUMO1<sup>-/-</sup> en los óvulos, evitando de esta manera los procesos de unión y fusión de membranas, se lograba la activación de los óvulos y el desarrollo a término del cigoto (Inoue et al., 2005).

En 2014, más de una década después del descubrimiento de CD9, se identificó JUNO como receptor de IZUMO1 en la membrana del óvulo (Bianchi et al., 2014). Estas dos proteínas forman un par receptor-ligando que es esencial para la adhesión espermatozoide-óvulo y su expresión y unión ha sido confirmadas en gametos humanos (Jean et al., 2019) y animales (Xing et al., 2011; Bianchi and Wright, 2015), lo que sugiere que su función se conserva entre los mamíferos. JUNO es una proteína pequeña, de unos 240 aminoácidos, anclada a la membrana del ovocito mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Bianchi et al., 2014). Esta proteína, codificada por el gen *Folr4*, se conocía como receptor de folato 4 debido a su supuesta función en la captación de folato. La expresión de JUNO en linfocitos T de ratones, así como su función como mediador de las respuestas al folato dietético y su uso en terapia antitumoral, habían sido ampliamente estudiados, pero su presencia

# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

y función en ovocitos de mamíferos era desconocida. En su estudio, Bianchi y colaboradores (Bianchi et al., 2014) demostraron que la proteína Folr4 no podía unirse al folato, pero era esencial para la fecundación, por lo que los autores cambiaron el nombre de esta proteína a "JUNO", en honor a la diosa romana de la fertilidad y el matrimonio. Estos autores identificaron JUNO como un receptor de IZUMO1 mediante estudios in vitro y dedujeron su papel al observar que al inseminar óvulos sin ZP que habían sido preincubados 10 minutos con un anticuerpo anti-JUNO no se producía la fecundación. Además, generaron ratonas deficientes en JUNO (JUNO<sup>-/-</sup>) observando que eran totalmente infértiles aunque no existían diferencias en la morfología de los ovocitos ni en el número de ovocitos ovulados en comparación con las ratonas de tipo salvaje. Sin embargo, los óvulos de las ratonas JUNO<sup>-/-</sup> no fueron fecundados después del apareamiento natural ni de ser usados en fecundación in vitro (FIV). Los mismos resultados se observaron tras la FIV de óvulos sin ZP obtenidos de ratonas JUNO<sup>-/-</sup>. Todos estos hallazgos confirmaron la participación de JUNO en el proceso de unión espermatozoide-óvulo (Bianchi et al., 2014). Otra observación interesante del estudio de Bianchi y Wright (Bianchi et al., 2014) fue que JUNO parece estar involucrado en el bloqueo de la polispermia que ocurre después de la fecundación debido a su liberación del oolema dentro de los 40 minutos posteriores a la penetración del espermatozoide al interior del ooplasma.

El uso de tecnologías CRISPR ha favorecido que durante los últimos dos años se hayan identificado nuevas proteínas en espermatozoides esenciales para el proceso de fecundación en los mamíferos; SPerm ACrosoma proteína asociada a la membrana (SPACA6), proteína de membrana que influye en la fecundación (FIMP), proteína requerida para la fusión de espermatozoides y ovocitos (SOF1), la proteína TransMEMbrane 95 (TMEM95) y muy recientemente las proteínas DendroCyte expressed Seven Transmembrane domain-containing 1 y 2 (DCST1/DCST2) (Barboux et al., 2020; Fujihara et al., 2020; Lamas-Toranzo et al., 2020; Noda et al., 2020; Inoue et al., 2021). En concreto, TMEM95 es una proteína pequeña de 176 aminoácidos cuyo análisis de plegamiento in silico muestra que contiene un solo dominio transmembrana y su estructura secundaria en la región extracelular es notablemente similar a la que se encuentra en la proteína IZUMO1, concretamente la región que ha sido denominada como "Dominio IZUMO1". Por otro lado, el hecho de que se haya demostrado que los espermatozoides de toros portadores de dos alelos parcialmente truncados en Tmem95 presenten un descenso severo en las tasas de fecundación in vitro, debido a una reducción dramática en la penetración del óvulo pero con valores normales de motilidad espermática (Fernandez-Fuertes et al., 2017), sugieren que TMEM95 podría estar involucrada en el momento de la fecundación. En efecto, la ablación de TMEM95 en ratones

causó una infertilidad completa en los mismos (Lamas-Toranzo et al., 2020). Mientras que los espermatozoides que carecen de esta proteína eran morfológicamente normales, exhibiendo motilidad normal, y con capacidad de penetrar la ZP y unirse al oolema, una vez unidos no lograron fusionarse con la membrana del óvulo ni penetrar en el ooplasma, por lo que la fecundación solo se pudo lograr mediante la microinyección espermática. Estos datos demuestran que TMEM95 es esencial para la fecundación de mamíferos, aunque los experimentos realizados hasta la fecha no han mostrado que TMEM95 interactuara con JUNO ni con IZUMO (Lamas-Toranzo et al., 2020). De manera similar a IZUMO1, SPACA6 es una proteína transmembrana de tipo I con un extremo C-terminal citoplásmico corto y un dominio similar a inmunoglobulina (Ig) en medio de su región extracelular. FIMP y SOF1 son proteínas pequeñas, de menos de 200 aminoácidos, que se expresan altamente en los testículos. Los ratones que carecen de cualquiera de estas dos proteínas presentan un fenotipo similar a los machos deficientes en IZUMO1 y TMEM95; producen espermatozoides de morfología y motilidad normales capaces de traspasar la ZP y unirse al oolema de manera similar a los espermatozoides de ratones salvajes pero incapaces de fusionarse con el óvulo. Una gran diferencia entre IZUMO1 y estas 4 nuevas proteínas (SPACA6, FIMP, SOF1 y TMEM95), sin embargo, es que las células heterólogas que sobre expresan IZUMO1 son capaces de adherirse eficientemente a los óvulos, una propiedad que no comparte ninguno de los nuevos candidatos (Bianchi and Wright, 2020), demostrando que el par JUNO-IZUMO1 sigue siendo hasta la fecha el tándem de moléculas responsables de la unión óvulo-espermatozoide y son necesarios estudios más detallados para determinar el papel y los receptores de estas nuevas proteínas descritas recientemente.

## APLICACIÓN EN MICROESFERAS Y MODELOS TRIDIMENSIONALES

A pesar de la extensa investigación molecular que se está llevando a cabo en los últimos años, la información sobre la identidad y presencia de los receptores de membrana sigue siendo ambigua y nuestra comprensión de los mecanismos exactos que median en la unión y fusión de los gametos es incompleta, debido principalmente a la propia naturaleza transitoria del evento de unión y a un mecanismo de fusión altamente orquestado y dinámico. Por ello, el uso combinado de diferentes métodos en los estudios de interacción entre gametos nos ayudaría a comprender mejor el papel que tiene una molécula específica involucrada en la fecundación. Hasta la fecha los métodos empleados pueden clasificarse en 1) modelos in vivo, es decir, animales editados genéticamente; y 2) modelos in vitro, es decir, proteínas solubilizadas, purificadas y recombinantes (Caballero-Campo et al., 2006; Chiu et al., 2008; Bhandari et al., 2010), y anticuerpos contra la proteína de

## SESIÓN DE ANDROLOGÍA

interés (Jankovicova et al., 2019). Sin lugar a dudas, los ratones editados genéticamente han sido de suma importancia para revelar nuevas moléculas involucradas en las diferentes etapas de fecundación. Sin embargo, esta tecnología es costosa, requiere equipamiento especializado y personal formado, precisa mucho tiempo y no se puede transferir fácilmente a especies diferentes al modelo murino. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevas estrategias alternativas para lograr el estudio del proceso de fecundación a nivel molecular. Anticipamos que, en los próximos años, pueden surgir numerosos candidatos gracias al desarrollo de nuevas estrategias de detección de alta sensibilidad, como la proteómica de alta sensibilidad (Virant-Klun et al., 2016), cribados genéticos mediante "screening" de mutagénesis a gran escala y el análisis de homología de proteínas de diversos taxones. De manera que el número de moléculas para analizar puede ser elevado y se deben aplicar diseños experimentos eficientes y que consuman poco tiempo con el objetivo de optimizar las condiciones experimentales que mejor reproduzcan los procesos de unión y fusión de gametos.

En este sentido, las microesferas recubiertas por la proteína de interés son una herramienta extremadamente valiosa para recrear tridimensionalmente (3D) el tamaño, la forma y la superficie del ovocito. Por ejemplo, en ratones, se han usado microesferas de agarosa recubiertas con péptido ZP2 recombinante para seleccionar espermatozoides humanos *in vitro*, y atraer espermatozoides de ratón *in vivo* logrando así una anticoncepción reversible (Avella et al., 2016). En los últimos años, nuestro grupo ha centrado sus esfuerzos en desarrollar un modelo 3D mediante el uso de microesferas conjugadas a proteínas recombinantes implicadas en el reconocimiento de gametos (ZP y JUNO), imitando el momento de la fecundación en un espacio tridimensional. Además, hemos escalado este modelo 3D añadiendo a las microesferas recubiertas con una capa interna de glicoproteínas ZP recombinantes, una segunda capa externa de células de cúmulus (Hamze et al., 2019). Este nuevo modelo 3D más completo y fisiológico podría ayudar a abordar algunas de las limitaciones derivadas de la escasez de ovocitos en algunas especies, las implicaciones éticas del uso de óvulos y el elevado coste de producir animales editados genéticamente. En concreto, nuestros estudios muestran que el modelo de microesferas conjugadas a las proteínas recombinantes de ZP (ZP2, ZP3 y ZP4) en la especie porcina, proporcionan una nueva técnica 3D para investigar el proceso de interacción óvulo-espermatozoide, convirtiéndose en una herramienta relevante como estudio y diagnóstico de la funcionalidad espermática (Hamze et al., 2019). Este modelo 3D permite cuantificar el número de espermatozoides adheridos a las microesferas y determinar su

estado fisiológico. De esta forma pudimos determinar que, en la especie porcina, ZP2 participa en el reconocimiento espermatozoide-zona pelúcida, mientras que ZP3 y ZP4 inducen la reacción acrosómica. Además, el modelo fue validado en un sistema de FIV donde los ovocitos fueron inseminados en presencia de microesferas conjugadas con ZP2. Con este procedimiento se obtuvo un aumento en la eficiencia del sistema gracias a que las fecundaciones monoespermáticas aumentaron. La presencia de las esferas en medio FIV moduló el número de espermatozoides fecundantes que se unen a los óvulos porcinos evitando así las altas tasas de poliespermia que presenta la FIV en esta especie (Gabriela Hamze et al., 2020). Igualmente, el mismo sistema, pero con microesferas conjugadas a la proteína JUNO recombinante, pudimos demostrar en la especie bovina que los espermatozoides de toros con altas tasas de fertilidad *in vivo* se unen en mayor número al modelo 3D que los espermatozoides de toros con bajas tasas de fertilidad. De esta forma, validamos el modelo como una potencial herramienta para predecir *in vitro* la capacidad fecundante de una muestra seminal sin necesidad de utilizar ovocitos ni someterlos a maduración *in vitro* (Hamze et al., 2020).

Gracias a la capacidad del modelo 3D para atraer espermatozoides y poder estudiar su estado y características celulares creemos que se puede aplicar, de forma sencilla, en numerosos ensayos y métodos. Con los resultados publicados hasta el momento podemos justificar su aplicación en 1) estudiar el perfil proteico de aquellos espermatozoides con mayores capacidades fecundantes y de esta manera detectar aquellas proteínas que se encuentran expuestas en el momento de fecundación; 2) podría utilizarse como una nueva herramienta para, entre otros usos, seleccionar espermatozoides con alta capacidad fecundante para mejorar las tasas de eficiencia de las técnicas de fecundación *in vitro*; 3) como método para diagnosticar precozmente a los animales subfértiles en centros de cría y selección de ganado y de esta manera predecir la capacidad fecundante de una muestra seminal sin necesidad de emplear ovocitos nativos y 4) en estudios toxicológicos en muestras seminales para control y desarrollo de fármacos. El análisis de este método con muestras humanas es fundamental para poder conocer sus posibles aplicaciones, pero consideramos que, al igual que en las otras especies, puede suponer un método fundamental para profundizar en el estudio de las proteínas involucradas en fecundación y su aplicación como método de selección espermática o diagnóstico de fertilidad de estas muestras seminales. Consideramos imprescindible el estudio de las moléculas implicadas en el momento de la fecundación para trasladar este conocimiento a la mejora de las técnicas de reproducción asistida en la especie humana.

# SESIÓN DE ANDROLOGÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Avella, M. A., Baibakov, B. and Dean, J. (2014) 'A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans', *J Cell Biol*, 205(6), pp. 801-9.
- Avella, M. A., Baibakov, B. A., Jimenez-Movilla, M., Sadusky, A. B. and Dean, J. (2016) 'ZP2 peptide beads select human sperm in vitro, decoy mouse sperm in vivo, and provide reversible contraception', *Science Translational Medicine*, 8(336).
- Avella, M. A., Xiong, B. and Dean, J. (2013) 'The molecular basis of gamete recognition in mice and humans', *Molecular Human Reproduction*, 19(5), pp. 279-289.
- Barbaux, S., Ialy-Radio, C., Chalbi, M., Dybal, E., Homps-Legrand, M., Do Cruzeiro, M., Vaiman, D., Wolf, J.-P. and Ziyat, A. (2020) 'Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion', *Scientific Reports*, 10(1).
- Bhandari, B., Bansal, P., Talwar, P. and Gupta, S. K. (2010) 'Delimitation of downstream signalling components during acrosome reaction mediated by heat solubilized human zona pellucida', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, p. 9.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. and Wright, G. J. (2014) 'Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization', *Nature*, 508(7497), pp. 483-+.
- Bianchi, E. and Wright, G. J. (2015) 'Cross-species fertilization: the hamster egg receptor, Juno, binds the human sperm ligand, Izumo1', *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 370(1661).
- Bianchi, E. and Wright, G. J. (2020) 'Find and fuse: Unsolved mysteries in sperm-egg recognition', *PLoS Biol*, 18(11), p. e3000953.
- Caballero-Campo, P., Chirinos, M., Fan, X. J., Gonzalez-Gonzalez, M. E., Galicia-Chavarria, M., Larrea, F. and Gerton, G. L. (2006) 'Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function', *Biology of Reproduction*, 74(4), pp. 760-768.
- Carlisle, J. A. and Swanson, W. J. (2020) 'Molecular mechanisms and evolution of fertilization proteins', *J Exp Zool B Mol Dev Evol*.
- Chiu, P. C., Wong, B. S., Chung, M. K., Lam, K. K., Pang, R. T., Lee, K. F., Sumitro, S. B., Gupta, S. K. and Yeung, W. S. (2008) 'Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa', *Biol Reprod*, 79(5), pp. 869-77.
- Clark, N. L., Aagaard, J. E. and Swanson, W. J. (2006) 'Evolution of reproductive proteins from animals and plants', *Reproduction*, 131(1), pp. 11-22.
- Clark, N. L. and Swanson, W. J. (2005) 'Pervasive adaptive evolution in primate seminal proteins', *PLoS Genet*, 1(3), p. e35.
- Fernandez-Fuertes, B., Laguna-Barraza, R., Fernandez-Gonzalez, R., Gutierrez-Adan, A., Blanco-Fernandez, A., O'Doherty, A. M., Di Fenza, M., Kelly, A. K., Kolle, S. and Lonergan, P. (2017) 'Subfertility in bulls carrying a nonsense mutation in transmembrane protein 95 is due to failure to interact with the oocyte vestments', *Biology of Reproduction*, 97(1), pp. 50-60.
- Fujihara, Y., Lu, Y., Noda, T., Oji, A., Larasati, T., Kojima-Kita, K., Yu, Z., Matzuk, R. M., Matzuk, M. M. and Ikawa, M. (2020) 'Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(17), pp. 9393-9400.
- Gabriela Hamze, J., Jiménez-Movilla, M. and Romar, R. (2020) 'Sperm binding to ZP2-coated beads improve the efficiency of porcine in vitro fertilisation', *Reproduction*, 160(5), pp. 725-735.
- Grayson, P. (2015) 'Izumo1 and Juno: the evolutionary origins and coevolution of essential sperm-egg binding partners', *R Soc Open Sci*, 2(12), p. 150296.
- Hamze, J. G., Canha-Gouveia, A., Algarra, B., Gómez-Torres, M. J., Olivares, M. C., Romar, R. and Jiménez-Movilla, M. (2019) 'Mammalian spermatozoa and cumulus cells bind to a 3D model generated by recombinant zona pellucida protein-coated beads', *Sci Rep*, 9(1), p. 17989.
- Hamze, J. G., Sánchez, J. M., O'Callaghan, E., McDonald, M., Bermejo-Álvarez, P., Romar, R., Lonergan, P. and Jiménez-Movilla, M. (2020) 'JUNO protein coated beads: A potential tool to predict bovine sperm fertilizing ability', *Theriogenology*, 155, pp. 168-175.
- Horsley, V. and Pavlath, G. K. (2004) 'Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion', *Cells Tissues Organs*, 176(1-3), pp. 67-78.
- Inoue, N., Hagihara, Y. and Wada, I. (2021) 'Evolutionarily conserved sperm factors, DCST1 and DCST2, are required for gamete fusion', *Elife*, 10.

## SESIÓN DE ANDROLOGÍA

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. (2005) 'The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs', *Nature*, 434(7030), pp. 234-238.

Jankovicova, J., Secova, P., Manaskova-Postlerova, P., Simonik, O., Frolikova, M., Chmelikova, E., Horovska, L., Michalkova, K., Dvorakova-Hortova, K. and Antalikova, J. (2019) 'Detection of CD9 and CD81 tetraspanins in bovine and porcine oocytes and embryos', *Int J Biol Macromol*, 123, pp. 931-938.

Jean, C., Haghighirad, F., Zhu, Y., Chalbi, M., Ziyat, A., Rubinstein, E., Gourier, C., Yip, P., Wolf, J. P., Lee, J. E., Boucheix, C. and Barraud-Lange, V. (2019) 'JUNO, the receptor of sperm IZUMO1, is expressed by the human oocyte and is essential for human fertilisation', *Hum Reprod*, 34(1), pp. 118-126.

Jégou, A., Ziyat, A., Barraud-Lange, V., Perez, E., Wolf, J. P., Pincet, F. and Gourier, C. (2011) 'CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(27), pp. 10946-51.

Lamas-Toranzo, I., Hamze, J. G., Bianchi, E., Fernandez-Fuertes, B., Perez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., Fernandez-Gonzalez, R., Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A., Wright, G. J., Jimenez-Movilla, M. and Bermejo-Alvarez, P. (2020) 'TMEM95 is a sperm membrane protein essential for mammalian fertilization', *Elife*, 9.

Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. and Boucheix, C. (2000) 'Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice', *Science*, 287(5451), pp. 319-321.

Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. and Théry, C. (2019) 'Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication', *Nat Cell Biol*, 21(1), pp. 9-17.

Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M. and Mekada, E. (2000) 'Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization', *Science*, 287(5451), pp. 321-324.

Moros-Nicolas, C., Chevret, P., Jimenez-Movilla, M., Algarra, B., Cots-Rodriguez, P., Gonzalez-Brusi, L., Aviles, M. and Izquierdo-Rico, M. J. (2021) 'New Insights into the Mammalian Egg Zona Pellucida', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6).

Noda, T., Lu, Y., Fujihara, Y., Oura, S., Koyano, T., Kobayashi, S., Matzuk, M. M. and Ikawa, M. (2020) 'Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21), pp. 11493-11502.

Runge, K. E., Evans, J. E., He, Z. Y., Gupta, S., McDonald, K. L., Stahlberg, H., Primakoff, P. and Myles, D. G. (2007) 'Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution', *Dev Biol*, 304(1), pp. 317-25.

Swanson, W. J., Clark, A. G., Waldrip-Dail, H. M., Wolfner, M. F. and Aquadro, C. F. (2001a) 'Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), pp. 7375-9.

Swanson, W. J. and Vacquier, V. D. (2002) 'The rapid evolution of reproductive proteins', *Nat Rev Genet*, 3(2), pp. 137-44.

Swanson, W. J., Zhang, Z. H., Wolfner, M. F. and Aquadro, C. F. (2001b) 'Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), pp. 2509-2514.

Tokuhiro, K. and Dean, J. (2018) 'Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy', *Dev Cell*, 46(5), pp. 627-640.e5.

Virant-Klun, I., Leicht, S., Hughes, C. and Krijgsveld, J. (2016) 'Identification of Maturation-Specific Proteins by Single-Cell Proteomics of Human Oocytes', *Mol Cell Proteomics*, 15(8), pp. 2616-27.

Wassarman, P. M. (2008) 'Zona pellucida glycoproteins', *J.Biol. Chem.*, (Journal Article).

Waters, C. M. and Bassler, B. L. (2005) 'Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, pp. 319-46.

Xing, W.-J., Han, B.-D., Wu, Q., Zhao, L., Bao, X.-H. and Bou, S. (2011) 'Molecular cloning and characterization of Izumo1 gene from sheep and cashmere goat reveal alternative splicing', *Molecular Biology Reports*, 38(3), pp. 1995-2006.

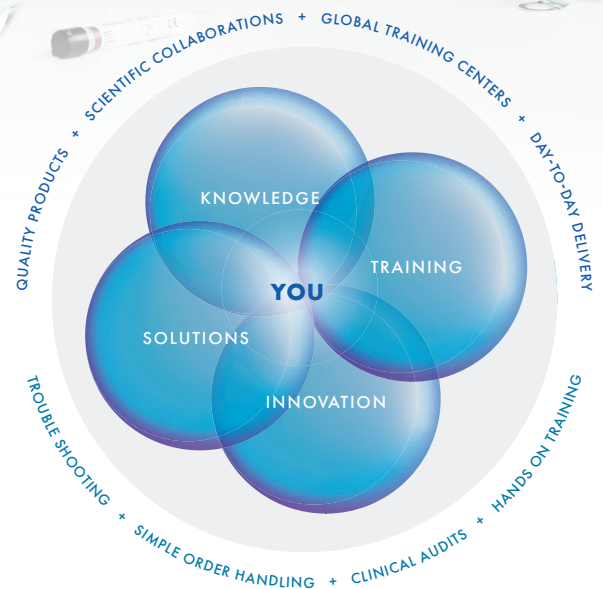
Ziyat, A., Rubinstein, E., Monier-Gavelle, F., Barraud, V., Kulski, O., Prenant, M., Boucheix, C., Bomsel, M. and Wolf, J. P. (2006) 'CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion', *J Cell Sci*, 119(Pt 3), pp. 416-24.





# A solution as unique as your business

At CooperSurgical, we partner  
with you to drive clinical efficiency



ORIGIO · SAGE · Humagen · TPC · K-Systems · RI · Wallace · LifeGlobal · CooperGenomics

# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

## BLASTOCISTOS HUMANOS PROCEDENTES DE CIGOTOS UNIPRONUCLEARES: UN MODELO BIOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LA PLOIDÍA, EUPLOIDÍA, TOPOGRAFÍA Y PARENTALIDAD CROMOSÓMICAS

**Xavier Vendrell<sup>1</sup>, Rosa Bautista-Llàcer<sup>1</sup>, Raquel Tena<sup>1</sup>, Paloma Ferrer<sup>1</sup>, Núria Soler<sup>2</sup>, Ana González<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> José Escribà<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia

<sup>2</sup> IVIRMA-Valencia, Valencia

xavier.vendrell@sistemasgenomicos.com / 687 756 054

### INTRODUCCIÓN

La condición de “fecundación anormal” se establece cuando el cigoto exhibe un número de pronúcleos o corpúsculos polares distinto de dos, a las 16-20 horas después de la inseminación. Los cigotos anormalmente fecundados generalmente no se emplean con fines reproductivos. A pesar de que, en algunos casos, evolucionan in vitro e incluso pueden llegar a implantar, se considera que estos cigotos tienen un mal pronóstico reproductivo. En el caso particular de los cigotos monopronucleados (MN), se estima una prevalencia entre el 1,6-7,7% para los ovocitos microinyectados por ICSI (Sultan et al., 1995; Macas et al., 1996; Staessen et al., 1997; Porter et al., 2003; Otsu et al., 2004; Campos et al., 2007; Lee et al., 2013; Azevedo et al., 2014; Itoi et al., 2015; Capalbo et al., 2017; Destouni et al., 2018). Se ha sugerido que la génesis de esta anomalía puede estar en la partenogénesis, la ginocogénesis y la androgenesis (Palermo et al., 1995; Sultan et al., 1995; Plachot, 1997). Algunos autores han propuesto rescatar estos cigotos MN con fines reproductivos, bajo la premisa de que la evaluación microscópica no es definitiva y que pueden tener la capacidad de derivar en blastocistos viables (Balakier et al., 1993; Lim et al., 2000). El eventual “rescate” de los cigotos MN se basa en: i) se ha demostrado su capacidad de desarrollo in vitro hasta blastocisto en ciclo de FIV (Balakier et al., 1993; Gras y Trounson, 1999; Otsu et al., 2004; Noyes et al., 2008; Liao et al., 2009; Itoi et al., 2015; Escribà et al., 2016; Xu et al., 2016; Yin et al., 2016; Bradley et al., 2017; Araki et al., 2018; Kai et al., 2018; Lim y Lee 2019) e ICSI (Otsu et al., 2004; Campos et al., 2007; Liao et al., 2009; Mateo et al., 2013; Itoi et al., 2015; Yao et al., 2016; Bradley et al., 2017; Capalbo et al., 2017; Mateo et al., 2017a; Mateo et al., 2017b; Araki et al., 2018; Destouni et al., 2018; Xie et al., 2018; Lim y Lee, 2019); ii) el comportamiento morfocinético es comparable al de los cigotos correctamente fecundados (Mateo et al., 2020); iii) se han registrado embarazos y nacidos vivos varones normales después de la trans-

ferencia de embriones derivados de cigotos MN en FIV con (Staessen et al., 1993; Sultan et al., 1995; Bradley et al., 2017) y sin (Gras et al., 1999; Dasig et al., 2004; Itoi et al., 2015) análisis cromosómicos, y también después de ICSI (Bradley et al., 2017; Capalbo et al., 2017; Mateo et al., 2017a; Destouni et al., 2018; Xie et al., 2018; Lim et al., 2019); y iv) la derivación de células madre partenogénéticas humanas (46, XX) procedentes de cigotos MN (Suss-Toby et al., 2004; Lin et al., 2007). En cualquier caso, antes de contemplar el uso reproductivo de blastocistos derivados de cigotos MN (BMN) es esencial determinar la ploidía, la euploidía/aneuploidía y el origen parental de los cromosomas.

Por otro lado, los BMN podrían considerarse un modelo atractivo para el estudio de la distribución de las células euploides/aneuploides en los tejidos del blastocisto. Los modelos biológicos son necesarios para la investigación traslacional. Ontológicamente, los modelos biológicos son sistemas experimentales que recrean aspectos de la función fisiológica o patológica de un tejido determinado, o un organismo completo. En consecuencia, los BMN podrían considerarse como un modelo. Recrean completamente el desarrollo in vitro y es una alternativa a los embriones creados artificialmente (Zhang et al., 2020) o al uso de modelos animales (Rhrissorrakrai et al., 2015). Con este modelo evitamos la generación in vitro de embriones con fines de investigación y la desagregación ulterior para obtener muestras representativas específicas de los tejidos, lo que resulta éticamente inaceptable y supone una grave limitación para la investigación en este campo. En este contexto, y empleando los BMN como modelo, proponemos el término “topografía cromosómica” para referirnos a la distribución cromosómica en el blastocisto humano. En el día 5 o 6 después de la fecundación, el blastocisto es una estructura relativamente simple formada por dos tipos celulares morfológicamente distinguibles y diferenciados: el trofotodermo (TE) y la masa celular interna (MCI). El grado de equivalencia

# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

cromosómica inter e intra tejido en el blastocisto ha sido analizado recientemente (Capalbo y Rienzi, 2017; Chuang et al., 2018; Victor et al., 2019; Navratil et al., 2020). Sin embargo, la investigación que explora la distribución topográfica de los cromosomas en ambos compartimentos del embrión es escasa (Huang et al., 2017; Victor et al., 2019). En la actualidad, la importancia biológica y clínica de estos descubrimientos están centrando el debate científico en el campo de la PGT-A (Navratil et al., 2020; Popovic et al., 2020). En este escenario, los BMN podrían ser un modelo alternativo excelente con el cual analizar embriones clínicos explorando anomalías cromosómicas/subcromosómicas en el blastocisto humano.

En este contexto, proponemos explorar el rescate reproductivo de los BMN mediante el análisis conjunto de la ploidía, la constitución cromosómica y el origen parental de los cromosomas, combinando metodologías citogenéticas clásicas, tales como hibridación in situ fluorescente (FISH), con las técnicas de NGS (next generation sequencing) y las técnicas basadas en arrays de SNP (single nucleotide polymorphisms).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El reclutamiento de los ovocitos MN se llevó a cabo entre junio de 2016 y diciembre de 2018 en el laboratorio de embriología de IVIRMA-Valencia, y el estudio genético de los BMN se realizó en los laboratorios de la Unidad de Genética Reproductiva de Sistemas Genómicos. En total, se clasificaron como cigotos MN un total de 2831, representando un 3.3%, que fueron donados por las parejas que recibieron la información detallada del proyecto y firmaron el consentimiento informado. El trabajo fue aprobado por el comité ético del IVIRMA-Valencia (número de referencia: 1603-VLC-022-ME).

Los protocolos de estimulación ovárica, la preparación del semen, la recuperación de ovocitos, la ICSI y el cultivo de embriones se describen en (Rubio et al., 2007). Un total de 1.128 cigotos MN se cultivaron en una incubadora time-lapse (Embryoscope®-Vitrolife, Dinamarca) en 25 µl de medio Continuous Single Culture (Irvine Scientific, EEUU) a 37 °C, en 6% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub> atmosférico hasta el día 5-6 de desarrollo. El escrutinio de las grabaciones reveló 44 cigotos "falsos" MN que exhibieron un segundo pronúcleo más tarde de lo esperado (4,1%). Debido a su dinámica pronuclear asíncrona fueron retirados del estudio y rescatados con fines reproductivos. De esta manera, 1.084 cigotos MN fueron finalmente incluidos en el estudio. Ciento noventa y nueve embriones alcanzaron la etapa del blastocisto (18,4%; 199/1084). Los BMN fueron puntuados morfológicamente siguiendo el sistema de clasificación propuesto por Cuevas et al. (2018), y fueron asignados a la serie experimental como se describe a continuación.

## Diseño experimental

Se trata de un estudio experimental prospectivo dividido en tres series experimentales consecutivas (Figura 1). Serie 1, incluye 28 BMN que se fijaron para la determinación de ploidía por FISH (Figura 1a). Serie 2, incluye 35 BMN que fueron disgregados en tres fragmentos de forma que se estudió la ploidía y la constitución cromosómica en una sección del TE (TE1) y la MCI (Figura 1b), procesadas por NGS (24 cromosomas) y la segunda porción del TE (TE2) se fijó para el control de ploidía por FISH (cromosomas 18, X e Y). En la serie 3, quince BMN se diseccionaron en tres fragmentos (TE1, TE2 y MCI; Figura 1c), para estudiar la composición cromosómica dentro del trofotodermos (TE1 y TE2) y realizar un genotipado para determinar el origen parental de los cromosomas. EL TE1 se analizó por NGS y el TE2 por arrays de SNP (750K). La MCI se fijó para el control de la ploidía por FISH (cromosomas 18, X e Y). Con la intención de evitar una interpretación confusa de los resultados, únicamente se incluyeron en el estudio aquellos BMN con resultados concluyentes en las tres series de análisis, por lo que se excluyeron 11 BMN ya que al menos uno de los estudios genéticos no fue concluyente (6 fallaron para la ploidía, 2 para la NGS y 3 para SNP).a).

## Técnicas de micromanipulación

La micromanipulación de los BMN se realizó en los días 5 o 6 del desarrollo in vitro, mediante el uso del láser. La biopsia de la MCI se realizó siguiendo un procedimiento propio. Brevemente, se practicó un microorificio en la zona pelúcida y unos impactos en la zona de unión con el TE. Se accedió por la cavidad blastocélica utilizando micropipetas de biopsia de blastocistos (MBB-FP-SM-30, Origio; EEUU). Una vez alcanzada la MCI se aspiró suavemente una porción. En algunos casos, la hernia de la MCI fue evaginada y separada del resto haciendo uso de impactos del láser (Figura 2a). Las muestras del TE se obtuvieron por aspiración, la hernia biopsiada se separó del resto del TE después de aplicar varios impactos de láser (Figura 2b).

## Estudios cromosómicos

### Técnica de FISH (hibridación in situ fluorescente)

Los BMN completos o las biopsias obtenidas se fijaron siguiendo el protocolo publicado anteriormente, así como los criterios de interpretación de las señales (Vendrell et al., 2014). Para la hibridación se emplearon sondas centroméricas para los cromosomas X (verde del espectro; Vysis), Y (Spectrum Orange; Vysis), y 18 (Spectrum Aqua; Vysis), y sondas locus-específicas para los cromosomas 13 (Spectrum Orange) y 21 (Spectrum Green). Las muestras se analizaron con un microscopio de

# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

fluorescencia Imager Z2 (Zeiss, Alemania) equipado con un filtro de triple banda para isotiocianato 6 diamino-2-fenilindol/Rojo de Texas/fluoresceína (FITC) y filtros de paso de banda única para FITC, Texas Red y Aqua Blue. Las imágenes fueron grabadas con una cámara de vídeo Olympus DP-70. La ploidía se definió: haploide, cuando se identificó una señal por cromosoma; diploide, cuando se detectaron dos señales; triploide, cuando tres señales eran evidentes; y mosaico cuando al menos la mitad de las células contadas eran compatibles con una ploidía cromosómica y la mitad restante con otra.

## Técnica de NGS (next-generation sequencing)

La preparación e interpretación de las muestras se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos previamente validados (Vendrell et al., 2017). En resumen, se depositó un muestra en cada tubo de PCR de 0,2 ml que contenía 2,5  $\mu$ L de PBS (Cell Signaling Technology, MA, EEUU) en condiciones estériles, y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La amplificación del genoma completo, la preparación de las librerías, la secuenciación y el análisis de los datos se realizó siguiendo el pipeline desarrollado por Vendrell et al. (2017). Según los resultados de la NGS, las muestras fueron diagnosticadas como: (1) euploide; (2) aneuploidía de cromosoma entero, que afecta a un cromosoma (aneuploidía simple: monosomía o trisomía); (3) aneuploidía compleja/múltiple, cuando más de dos cromosomas fueron implicados; y (4) portadores de una aneuploidía segmental (AS), con o sin ninguna otra anomalía cromosómica.

## Técnica de arrays de SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Para determinar el origen parental de los cromosomas, se realizó un análisis en trío del ADN genómico del embrión (muestra de TE2) y de los padres (Figura 3a). En resumen, la muestra de TE2 biopsiada se lavó y se colocó en un solo tubo de 0,2 ml con PBS de 4  $\mu$ L (Cell Signaling Technology, MA, EEUU) en condiciones estériles y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La amplificación genómica se realizó con el kit Repli-g (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se purificaron 1:1 con microesferas AMPure XP SPRI (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) y se cuantificaron fluorométricamente con Qubit<sup>TM</sup> 2.0 (ThermoFisher). Para estudiar el ADN genómico de los padres, se obtuvieron 10 ml de muestras de sangre en EDTA y se realizó la extracción de ADN utilizando el sistema QIAcube (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado de los tríos se hibridó siguiendo el protocolo de ensayo CytoScan 750K. En resumen, las alícuotas de 250 ng de ADN genómico de cada muestra se digirieron con la enzima de restricción NspI. Los fragmentos de la restricción fueron ligados a los adaptadores y las secuencias genéricas que reconocían las secuencias

enzima-específicas del adaptador fueron utilizadas para amplificar la unión del ADN ligado al adaptador. La hibridación se realizó después de la incubación de noche (16-18 h) en un horno de hibridación de Affymetrix GeneChip. Finalmente, los arrays se escanearon con un escáner GeneChip Affymetrix 3000 7G Plus. Se habilitaron scripts de hardware y se realizó el procesamiento de imágenes utilizando el software GeneChip Command Console (Applied Biosystems) para generar los archivos CEL que incluían las señales de las sondas. Los archivos CEL se analizaron con el software ChAS v.4.0.0.385 (Applied Biosystems), el número de copia y los genotipos SNP de cada muestra se determinaron utilizando el algoritmo del Modelo oculto de Márkov (HMM) y el Modelo Lineal Robusto Bayesiano con el algoritmo clasificador de distancia Mahalanobis (BRLMM-P), respectivamente, normalizando las señales de la sonda con respecto a un archivo de referencia personalizado de 44 muestras. La secuencia de referencia del genoma humano fue NCB37 (hg19). Finalmente se realizó el análisis mendeliano de la comprobación de errores del dúo/del trío para confirmar el origen parental del complemento cromosómico, determinándose como uniparental o biparental. El genotipo SNP del genoma fue visualizado por un diagrama de diferencia alélica. Los alelos correspondientes al cambio de base de los nucleótidos fueron designados alelo A y alelo B (Figura 3b). Se observaron cuatro perfiles: un diagrama con tres líneas (AA homocigótica, AB heterocigótica, BB homocigótica) representando un embrión diploide con una herencia, a priori, biparental; un perfil con dos líneas (AA, BB) correspondientes a herencia uniparental y que distinguía entre herencia materna y paterna, pero no su ploidía; y un perfil con tres líneas, con herencia biparental (confirmada por el análisis del trío), pero diagnosticada como portadora de aneuploidía cromosómica, que también nos informaba sobre el origen parental de la aneuploidía. Además, un perfil con cuatro líneas correspondiente a un embrión triploide, y un perfil con cuatro líneas correspondiente a un embrión triploide (AAA, AAB, ABB, BBB).

## Análisis estadístico

Las diferencias entre las frecuencias fueron comparadas con el test Chi-cuadrado, con la corrección de continuidad de Yates. La significación fue definida cuando  $P < 0,05$ . Se utilizó el paquete estadístico SPSS v25.

## RESULTADOS

### Análisis cromosómico

Para evaluar el rescate reproductivo de los BMN estudiamos la constitución cromosómica, la ploidía y el origen parental de cromosomas. En la serie 1, el análisis mostró una proporción significativamente mayor de blastocistos diploides (64,3%;

# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

$P < 0,01$ ) que mosaicos o haploides (21,4% y 14,3%, respectivamente;  $P = 0,21$ ). En términos de composición de los cromosomas sexuales, se estableció una relación anormal XY:XX (4:24), los blastocistos haploides eran compatibles con una fórmula del cromosoma 23,X0 y los seis embriones mosaico eran compatibles con la fórmula 23,X0:46,XX. En la serie 2, el análisis de 34 muestras de TE reveló que 15 eran euploides (44,1%), 6 eran 46,XY (17,6%), y 9 eran 46,XX (26,5%). Además, 4 muestras demostraron ser portadoras de un AS (11,8%), y 15 fueron aneuploides (44,1%; diez muestras con monosomías o disomías y cinco mostraban monosomías o disomías combinados con AS). En la serie 3, el análisis de SNPa mostró que 11 BMN eran biparentales (73,3%, 11/15) y cuatro uniparentales (26,7%, 4/15). De los blastocistos biparentales, se detectó un embrión triploide por FISH (#15.3). Los 10 BMN biparentales restantes tenían perfiles compatibles con una condición diploide, confirmada por FISH. Además, los resultados de SNPa revelaron que seis eran euploides (cuatro XY y dos XX) y que los cuatro blastocistos uniparentales (26,7%), diagnosticados por NGS como embriones euploides femeninos, tenían carga exclusivamente maternal, sugiriendo un origen partenogenético o ginogenético. Además, el análisis de FISH sugirió que dos de éstos fueran haploides (23, X0) y los otros dos fueran diploides (46, XX).

En relación con las totalidad de las muestras analizadas por FISH, 76 fueron concluyentes. La población de BMN no era uniforme en términos de ploidía. Al igual que en la serie 1, hubo significativamente más blastocistos diploides (77,6%) que mosaico o haploides (13,2% y 7,9%;  $P = 0,23$ ). Además, se demostró una ratio sexual alterada (27:49), y los resultados de FISH revelaron que los seis BMN haploides eran compatibles con 23,X0 mientras que nueve eran 46, XX/23,X0. Además, se identificó un BMN 69,XXX. Respecto a las muestras de TE analizadas por NGS, la tasa euploidía fue del 49% (24/49), con un 18,4% (9/49) de 46,XY y un 30,6% (15/49) de 46,XX. Se observaron muestras de TE aneuploides en 25 muestras (51,0%), portadores de monosomías o disomías (16/49: 32,4%), o en asociación con AS (4/49: 8,2%). Además, el 10,2% de BMN presentaron AS (5/49). En resumen, el estudio de parentalidad y constitución cromosómica mostró que el 40% de los BMN fueron biparentales, euploides y diploides y, por lo tanto, rescatables para su potencial uso reproductivo. El estudio parcial de la FISH de una única biopsia mostró un 35,5% de embriones XY diploides. Por otro lado, cuando solo se tienen en cuenta los resultados de NGS, 9 de 49 XY blastocistos (18,4%) podrían considerarse con finalidad reproductiva. Después de combinar los resultados de FISH y NGS, al menos otros 12 embriones resultaron XX euploides (24%) son candidatos para su uso reproductivo a falta de determinar la herencia parental. En el caso de los resultados de SNPa, seis blastocistos euploides biparentales (4 XY, también identificados por análisis del NGS,

y 2 XX) fueron considerados útiles para la reproducción (una tasa del 40%).

## Análisis de la concordancia intra/inter-tejido en el modelo BMN

Para describir la distribución cromosómica entre la serie 2 y dentro de la serie 3 respecto a los tejidos de los BMN, comparamos la constitución cromosómica de acuerdo con: i) coincidencia euploide uniforme (EuEu); ii) coincidencia aneuploide uniforme (AnAn); o iii) sin coincidencia (EuAn; AnEu) (ver la Tabla 1). Treinta y tres blastocistos fueron estudiados para explorar la concordancia entre tejidos (TE vs MCI). Veintiséis de los 33 blastocistos coincidieron en su resultado (78,8%; EuEu o AnAn uniformes) y se observó una coincidencia cromosómica completa para 19 blastocistos (57,6%). Los catorce embriones restantes con fórmula no coincidente (42,2%) incluían tres discrepancias de EuAn, cuatro AnEu y siete AnAn. Para evaluar la fiabilidad de la estimación del número de copias cromosómicas, definimos verdaderos positivos (TP: TE y MCI aneuploides), verdaderos negativos (TN: TE y MCI euploides), falsos negativos (FN: TE euploide y MCI aneuploide) y falsos positivos (FP: TE aneuploide y MCI euploide). Según estos datos, la sensibilidad (TP/TP+FN) y la especificidad (TN/TN+FP) para representar a todo el grupo de BMN fue del 82,3% y 75%, respectivamente. Además, en cuatro de los siete BMN discordantes el origen de las discordancias fue la AS. Debido a la incertidumbre sobre su significación clínica, omitimos la AS en un nuevo análisis de los datos (Figura 3.2). En este nuevo análisis, se determinó una correlación cromosómica completa en el 75,8% y una diagnosis coincidente en el 84,6%. La sensibilidad y la especificidad fueron de 84,6% y 85%, respectivamente. En relación con la concordancia intra-tejido en TE, se estudiaron quince BMN. El estudio comparativo reveló una concordancia diagnóstica en 14 de 15 muestras (93,3%). El único BMN con un diagnóstico discordante fue un portador de AS (#12.3). Se detectó una coincidencia cromosómica completa en 11 casos (73,3%; 60% euploide uniforme; 13,3% aneuploide uniforme). Los tres BMN restantes tenían diferentes fórmulas aneuploides (el 20%). Si dejamos la AS fuera del análisis, se encontró que la concordancia del diagnóstico era del 100% y la concordancia en términos de uniformidad cromosómica del 80%.

## DISCUSIÓN

Los fecundación anómala se han registrado desde que se inició la verificación microscópica del estado pronuclear después de la inseminación. Es importante destacar que en el presente estudio analizamos específicamente los cigotos MN con extrusión del segundo corpúsculo polar (CP). Los cigotos MN con sólo el primer CP han sido revisados previamente por Feenan y Herbert (2006).

## PREMIO EMB-ASEBIR 2019

En nuestra serie de datos, el 18% de los cigotos MN alcanzaron el estadio de blastocisto, en consonancia con los datos previamente publicados (Bradley et al., 2017; Xie et al., 2018). El 80% de estos BMN demostraron ser diploides y el 48,6% euploides. Además, el 73,3% fueron heterocigotos para los SNPs informativos, confirmando así su biparentalidad. Todo parece indicar que estos cigotos presentan una cinética pronuclear aberrante que confunde la clasificación de la fecundación. La existencia de cigotos diploides MN con el segundo CP extruido sugiere la coexistencia temprana de los genomas parentales dentro de la misma envoltura pronuclear. Este fenómeno no se considera estrictamente una cariogamia pura. Levron y colaboradores (1995) especularon que esta única envoltura se forma cuando los espermatozoides se inyectan muy cerca de la placa metafásica del ovocito. En estas circunstancias, se forma una cubierta pronuclear común alrededor de los dos pronúcleos, generando un fenómeno conocido como "syngamy-like". Este evento fue confirmado por Tesarik y Mendoza (1996) en experimentos clínicos en los que inyectaron espermatozoides inmaduros. También podría explicar el desarrollo exitoso hasta blastocisto de estos cigotos, ya que de hecho serían diploides en origen. Esto también está en línea con la información registrada por los sistemas time-lapse, que no muestran diferencias claras en los patrones de división entre los BMN y los normalmente fecundados (Mateo et al., 2020). Por otra parte, otra línea de evidencia sugiere que los cigotos MN diploides también se originan por la detención del desarrollo de uno de los pronúcleos. En este sentido, la retención de la cabeza espermática condensada y el fracaso parcial o total de la descondensación de la cromatina masculina podrían explicar la ausencia del pronúcleo masculino (Flaherty et al., 1995; Payne et al., 1997). La condición diploide en estos casos podría ser reactivada por una contribución retrasada de los espermatozoides al desarrollo posterior del embrión, similar a la descrita anteriormente en ratones y hámsteres (Usui et al., 1976; Maleszewski et al., 1992). Este fenómeno está en línea con nuestras observaciones; el 4% de nuestros cigotos MN demostraron una aparición tardía de los dos pronúcleos. Además, Azevedo y sus colaboradores (Azevedo et al., 2014), sugirieron un tercer escenario cuando llamaron la atención sobre una desintegración (borrado) asincrónica y prematura de la envoltura pronuclear, generándose una sola estructura pronuclear.

Hemos observado que el 26,7% de los BMN eran uniparentales, presentando exclusivamente el genoma materno y una constitución cromosómica 46, XX cuando se evaluó por NGS. La mitad de éstos eran realmente haploides según los resultados de la FISH, lo cual evidencia la capacidad de los cigotos MN de progresar hasta la etapa de blastocisto incluso bajo

la condición haploide. A pesar de su ploidía, estos conceptos uniparentales pueden tener un origen partenogenético o ginogenético. La partenogénesis se define típicamente como "la producción de un embrión a partir de un gameto femenino sin ninguna contribución genética de un gameto masculino, con o sin eventual desarrollo en el adulto" (Mittwoch, 1978). Este inicio anormal del desarrollo temprano podría ser accionado espontáneamente por estímulos mecánicos, eléctricos o químicos. En humanos, la activación partenogenética espontánea es inusual, pero existe (de Carli, 2017). En nuestro diseño experimental, fue difícil detectar la activación partenogenética espontánea, ya que todos los ovocitos fueron microinyectados. La ginocogénesis es otro fenómeno que podría explicar el origen de los conceptos uniparentales maternos. En estos casos, la activación de los ovocitos es desencadenada por el espermatozoide, pero las etapas posteriores de desarrollo tienen lugar sin la intervención del genoma masculino.

Independientemente de la naturaleza de los estímulos que desencadenan la activación de los ovocitos, los conceptos uniparentales maternos haploides o diploides pueden ser producidos por varios mecanismos, dependiendo de si la ovogénesis concluye normalmente, o no (es decir, no tiene lugar la extrusión del segundo CP). En nuestro caso, todos los cigotos MN extruyeron el segundo CP, esto significa que los que eran diploides y uniparentales tenían un origen biológico diferente al de los BMN biparentales (discutidos anteriormente). Recientemente, se ha sugerido una hipotética tendencia intrínseca de los embriones haploides partenogenéticos hacia la auto-diploidización en condiciones de laboratorio (Leng et al., 2017), aunque el mecanismo biológico de esta estrategia de autocorrección no se ha dilucidado todavía. Sin embargo, gracias a los sistemas time-lapse, se han descrito cuatro mecanismos de comportamiento anormal durante las tres divisiones iniciales (Leng et al., 2017): i) citocinesis aberrante (la división comienza, pero el embrión vuelve al estadio de una célula); ii) endomitosis (la citocinesis no se inicia después de la replicación del núcleo, y algunas fases de mitosis tienen lugar dentro de la membrana nuclear sin formación del huso); iii) endociclamiento (el estado monopronuclear se extiende más allá de un ciclo celular); y iv) fusión de blastómeros (dos blastómeros se vuelven a fusionar después de un ciclo mitótico). Aparentemente, la citocinesis aberrante y la endomitosis están fuertemente correlacionados con la autodiploidización, particularmente en el caso de partenogenotas haploides. Es importante destacar que estos dos mecanismos pueden no afectar al ulterior desarrollo *in vitro*, lo que permite que los embriones se desarrollen hasta la etapa de blastocisto. Los embriones resultantes contienen un genoma digénico, como ocurrió en nuestro conjunto de datos.

# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

## Rescate de los BMN

Actualmente, no hay consenso sobre cómo proceder clínicamente con los embriones derivados de cigotos MN. De hecho, el uso clínico de los BMN ha constituido un dilema durante mucho tiempo (Manor et al., 1996). Como ya se ha comentado, la morfocinética y la capacidad de progresar hasta la etapa de blastocisto per se no son suficientes para seleccionar embriones euploides biparentales diploides. Por ahora, no es posible identificar BMN uni o biparental por métodos no invasivos. Los BMN están estrechamente relacionados con la generación de molas hidatiformes, anomalías cromosómicas y diploidías uniparentales (revisión Rosenbusch, 2014). Sin embargo, varios autores han argumentado a favor del valor reproductivo de estos embriones después de registrar nacimientos sanos (Hondo et al., 2019; Si et al., 2019). Los distintos trabajos describen el funcionamiento clínico, pero presentan claras limitaciones referentes a la información relacionada con la constitución cromosómica. De hecho, en la mayoría de los casos, no se investigó la constitución cromosómica de los BMN. En algunos casos, la ploidía de los BMN se dedujo en base a la pérdida de heterocigosidad de un conjunto de SNP, determinada mediante la comparación con la relación alélica de las células diploides/triploides (Capalbo et al., 2017). En otros casos, la uniparentalidad se extrapola mediante el análisis de unos pocos marcadores microsatélites en cromosomas concretos (Bradley et al., 2017). A su vez, Xie y colaboradores (2018) estudiaron el origen parental utilizando SNP array de baja resolución (262K), pero la tasa de disomía uniparental se estimó bioinformáticamente utilizando un modelo basado en la pérdida de heterocigosidad de SNPs y patrones de metilación, mientras que la tasa de híbridos se calculó dividiendo las formas AB/SNP. En este contexto, una de las novedades de nuestro trabajo es que introducimos, por primera vez, un análisis de la constitución parental de los BMN mediante arrays de SNP de alta resolución en todo el genoma (750.000 SNPs) en un formato de segregación trío (padre/madre/blastocisto). Este enfoque permite la trazabilidad cromosómica completa y el análisis adicional de euploidía/aneuploidía. La configuración de SNPs totalmente informativos nos permite distinguir claramente entre haploides/diploides uniparentales (conformaciones AA, BB), diploides biparentales (AA, AB, BB) y triploides (AAA, AAB, ABB, BBB). Además, en los casos de diploides biparentales aneuploides, es posible identificar no solo qué cromosoma ha sufrido la pérdida o ganancia de heterocigosidad, sino también su origen parental. En resumen, esta técnica permite confirmar que el 66,7% de nuestros BMN eran diploides biparentales (AA, AB, BB) y que cinco de estos eran euploides y, por lo tanto, recuperables para la transferencia. El resto de BMN fueron triploides (6,7%) o uniparentales (26,7%), y podemos concluir que todos estos eran ginogenotas o partenogenotas.

## “Topografía cromosómica” y representatividad entre compartimentos

Uno de los objetos de investigación en la actualidad es determinar el grado de representatividad de los tejidos del blastocisto en relación con su potencial reproductivo. Teniendo en cuenta nuestra reciente visión sobre el macrosistema reproductivo humano (Vendrell y Escribà, 2019), se hace necesario entender el valor de unas pocas células de TE para inferir el estado citogenético de un embrión. Esto ha sido cuestionado recientemente en el contexto del PGT-A (Esfandiari et al., 2016; Sermon et al., 2016; Gleicher et al., 2017). Por el contrario, otros investigadores han publicado tasas extremadamente altas de concordancia (cerca del 100%) entre TE/MCI y TE/blastocisto entero (revisado por Viotti, 2020). En este sentido, la distribución de las células aneuploides/euploides a lo largo de las estructuras del blastocisto (MCI y TE) es un foco de debate; nos referimos a esta distribución como “topografía cromosómica”. Por otro lado, el mosaicismo, generalmente definido como la coexistencia de líneas celulares con diferentes dosis cromosómicas en un mismo tejido, es otro aspecto relevante a la hora de seleccionar los blastocistos para su transferencia. En nuestro caso, la concordancia intra-tejido (TE1/TE2) se estableció en el 93,3% de las muestras cuando se consideró la euploidía o aneuploidía totales. Sin embargo, una coincidencia cromosómica completa entre dos muestras de TE del mismo blastocisto fue del 73,3% (el 60% para la euploidía y el 13,3% para la aneuploidía). El 20% restante exhibieron mosaicismo aneuploide/aneuploide, y un blastocisto (6,7%) mosaicismo euploide/aneuploide. La existencia de este mosaicismo intra-tejido se ha documentado previamente (Chuang et al., 2018; Victor et al., 2019; Navratil et al., 2020). En la línea de otros autores, la discordancia del intra-tejido se detectó cuando se analizó la AS.

Por otra parte, en relación con la concordancia del inter-tejido, observamos un 78,8% de concordancia aneuploide/euploide completa entre TE/MCI, y detectamos una coincidencia perfecta del cariotipo en el 57,6% de los casos. En siete blastocistos, un compartimento fue diagnosticado como euploide y el otro portador de una monosomía o, con mayor frecuencia, de una sola AS (cuatro blastocistos) o de una AS conjuntamente con otras aneuploidías cromosomas enteros (dos blastocistos). Así, tres de los cuatro blastocistos con AS en el TE concurren con un cariotipo euploide en la MCI. Por otra parte, una de las dos biopsias de MCI que presentaban AS demostraron ser euploides en el TE. Resultados similares fueron publicados por Victor y colaboradores (2019), que registraron blastocistos con una biopsia clínica del TE que contenía AS y MCI aneuploide en tres de siete casos (42,9%), mientras que el 57,1% restante era euploide.

# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

Actualmente, la aneuploidía segmentaria y el mosaicismo están en el centro del debate sobre la correlación inter/intra-tisular. En nuestro conjunto de datos, se calculó la razón de verosimilitud positiva (sensibilidad/1-especificidad), como novedad. Este factor mide la relevancia clínica de un procedimiento diagnóstico (verosimilitud), que es de gran utilidad para la toma de decisiones clínicas (Hayden y Brown, 1999). El análisis de los cromosomas enteros rinde un valor de 5.6 para la comparación inter-tejido, que representa un elevado rango de utilidad clínica. Además, los datos del análisis trío denotan un origen meiótico de las aneuploidías de cromosoma completo, proporcionando información sobre el origen parental de la aneuploidía. Por el contrario, cuando se tuvieron en cuenta las aneuploidías segmentales, la tasa de concordancia entre tejidos disminuyó a 3.43, observación que está totalmente en línea con las recientemente reportadas por otros autores (Navratil et al., 2020). En conjunto, estos datos apuntan a la AS como un evento fisiológico subyacente a la naturaleza específica de los embriones en estadio preimplantación. La frecuencia de la AS depende de los cromosomas y de su topografía. Además, su incidencia no está relacionada con factores clínicos o embriológicos, sino con la calidad del trofotodermo (Escribà et al., 2019). Al mismo tiempo, debemos destacar que la AS se ha identificado en una frecuencia comparable en ambos compartimentos de blastocisto (12% TE o MCI). De hecho, estos hallazgos están en línea con los de otros grupos que afirman que el desarrollo humano preimplantación es un proceso propenso a errores (Albertini, 2016) con un grado elevado de inestabilidad cromosómica. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el origen de la AS: la formación de husos duales (Reichmann et al., 2018) y tripolares (Albertini, 2016) en la mitosis; secuestro de segmentos cromosómicos y formación de micronúcleos (Kalatova et al., 2015; Daughtry et al., 2019); cromotripsis (Pellestor, 2014); y ausencia de puntos de control del ciclo celular (Harrison et al., 2000). En cualquier caso, el impacto real de la AS sobre los resultados clínicos está todavía por determinar. En este sentido, y de acuerdo con otros investigadores (Victor et al., 2019; Navratil et al., 2020), consideramos que la rebiopsia de los embriones con AS podría ayudar a mejorar la toma de decisiones en el contexto del asesoramiento genético reproductivo.

En resumen, parece claro que el seguimiento microscópico de embriones derivados de cigotos MN (con o sin sistemas de time-lapse) no es suficiente para inferir la ploidía/euploidía o el origen parental de los cromosomas de los blastocistos resultantes. El presente trabajo es el primero en analizar simultáneamente el desarrollo in vitro de cigotos monopronucleares hasta la etapa de blastocisto para trazar la contribución cromosómica parental y determinar la constitución cromosómica de los compartimentos del blastocisto derivado. Casi el 40% de nuestros BMN fueron diploides, biparentales y euploides, información que es vital para el asesoramiento genético previo a la transferencia en parejas con opciones limitadas, que pueden considerar el rescate de estos embriones con fines reproductivos. La estrategia del estudio en formato trío proporciona la información sobre el origen cromosómico y ploidía/euploidía en la misma muestra de biopsia. Además, el conocimiento del mecanismo biológico de adquisición de la competencia de desarrollo y la diploidización es clave para comprender el progreso de estos conceptos en las primeras etapas del desarrollo preimplantación. Por último, los estudios de concordancia inter/intra-tejido que hemos llevado a cabo muestran niveles elevados de concordancia y una razón de verosimilitud elevada, confirmando así la utilidad clínica de estas herramientas para seleccionar embriones euploides para su transferencia. Los nuevos datos que presentamos referentes a la AS parecen indicar que las tasas de AS son independientes del tejido (TE o MCI), extendiendo este fenómeno más allá del TE y de su cinética particular. El reanálisis de blastocistos nos podría ayudar a confirmar estas observaciones.

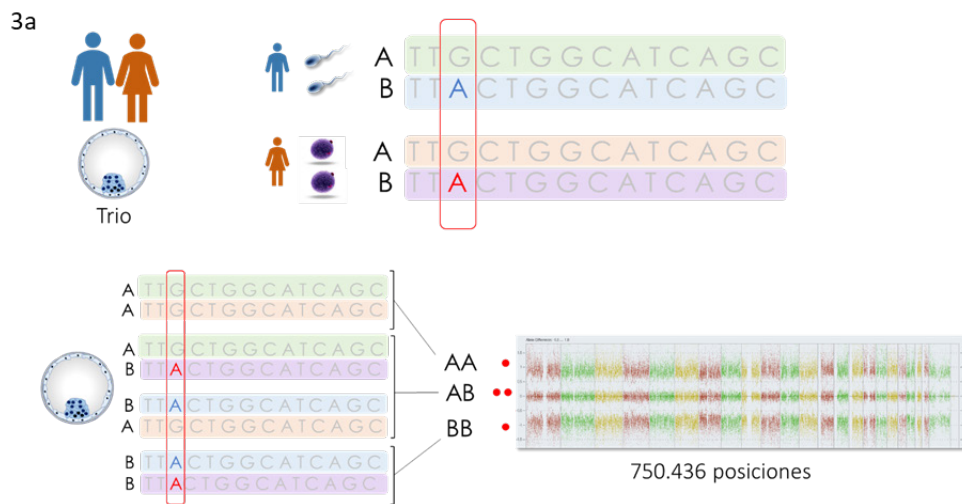
## FINANCIACIÓN

Este proyecto contó con el apoyo de fondos autonómicos del IVACE (Institut Valencià de la Competitivitat Empresarial) y PIDCOP-CV (Programa de I+D en Cooperació de la Comunitat Valenciana) (referencias: IMIDCA/2018/25 y ACIF/2018/076).

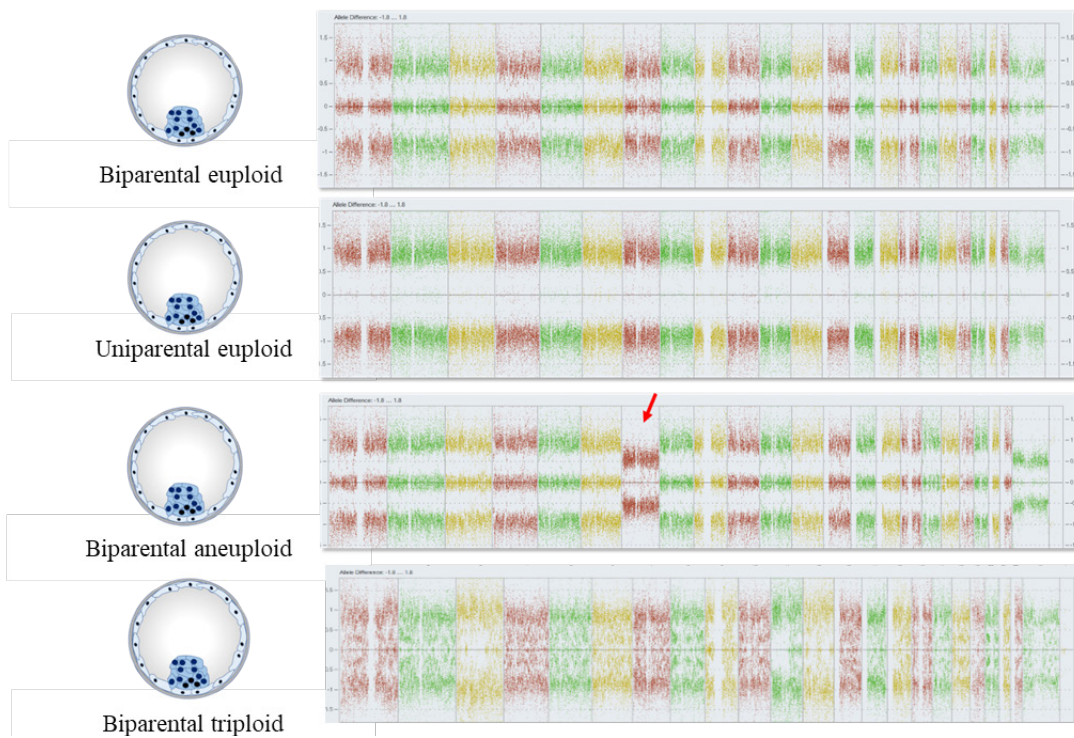


# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

Figura 1. Diseño experimental

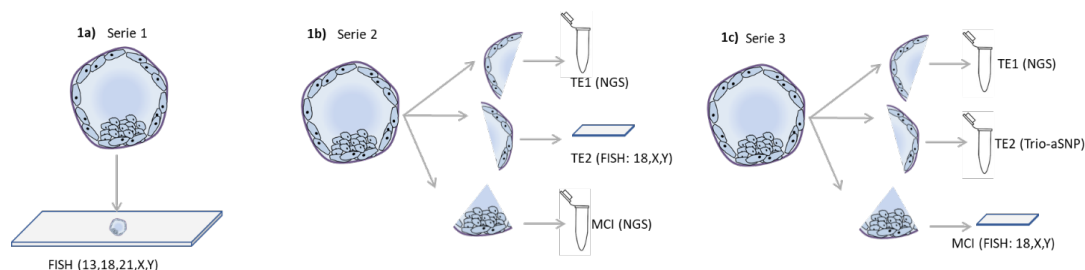


3b



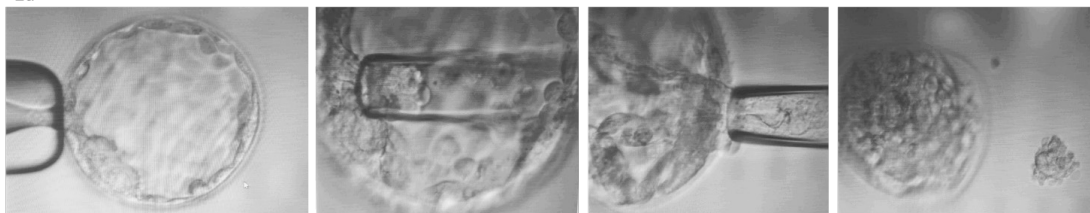
# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

**Figura 2.** Micromanipulación de los blastocistos derivados de cigotos monopronucleares.

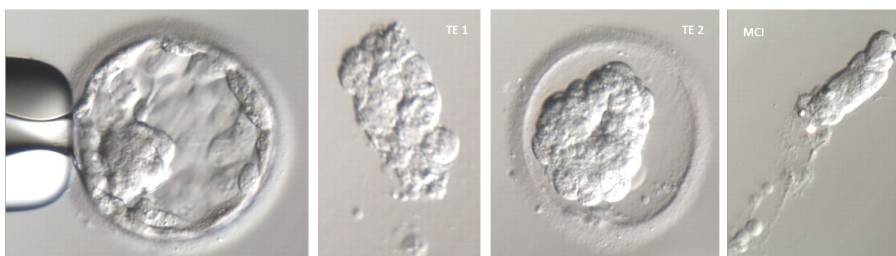


**Figura 3.** Análisis de arrays de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) en formato trio.

2a



2b



**Tabla 1.** Clasificación de los BMN en función de la correlación inter e intra-tejidos.

Correlación	Inter-tejido (TE vs MCI) (con AS)	Inter-tejido (TE vs MCI) (sin AS)	Intra-tejido (TE1 vs TE2) (con AS)	Intra-tejido (TE1 vs TE2) (sin AS)
Euploide-euploide	12/33 (36.4%)	17/33 (51.5%)	9/15 (60%)	10/15 (66.7%)
Aneuploide-aneuploide	7/33 (21.2%)	8/33 (24.1%)	2/15 (13.3%)	2/15 (13.3%)
Euploide-aneuploide	3/33 (9.1%)	2/33 (6.1%)	1/15 (6.7%)	-
Aneuploide-euploide	4/33 (12.1%)	3/33 (9.1%)	-	-
Aneuploide-aneuploide	7/33 (21.2%)	3/33 (9.1%)	3/15 (20%)	3/15 (20%)

# PREMIO EMB-ASEBIR 2019

## REFERENCIAS

- Albertini DF. On becoming accepting of the imperfections in mammalian embryogenesis. *J Assist Reprod Genet* 2016;33(8):969–70.
- Araki E, Itoi F, Honnma H, Asano Y, Oguri H, Nishikawa K. Correlation between the pronucleus size and the potential for human single pronucleus zygotes to develop into blastocysts: 1PN zygotes with large pronuclei can expect an embryo development to the blastocyst stage that is similar to the development of 2PN zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2018;35(5):817–23.
- Azevedo AR, Pinho MJ, Silva J, Sá R, Thorsteinsdóttir S, Barros A, et al. Molecular Cytogenetics of Human Single Pronucleated Zygotes. *Reprod Sci* 2014;21(12):1472–82.
- Babariya D, Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. The incidence and origin of segmental aneuploidy in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2017;32(12):2549–60.
- Balaker H, Squire J, Casper R.F. Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization. *Hum Reproduction* 1993;8(3):402–8.
- Bradley CK, Traversa M V., Hobson N, Gee AJ, McArthur SJ. Clinical use of monopronucleated zygotes following blastocyst culture and preimplantation genetic screening, including verification of biparental chromosome inheritance. *Reprod Biomed Online* 2017;34(6):567–74.
- Campos G, Parriego M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A. Análisis cromosómico y potencial de desarrollo de cigotos monopronucleares y apronucleares. *Rev Iberoam Fertil y Reprod Humana* 2007;24(1):29–34.
- Capalbo A, Rienzi L. Mosaicism between trophoctoderm and inner cell mass. *Fertil Steril* 2017;107(5):1098–106.
- Capalbo A, Treff N, Cimadomo D, Tao X, Ferrero S, Vaiarelli A, et al. Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2017;108(6):1007–15.e3.
- Chuang TH, Hsieh JY, Lee MJ, Lai HH, Hsieh CL, Wang HL, et al. Concordance between different trophoctoderm biopsy sites and the inner cell mass of chromosomal composition measured with a next-generation sequencing platform. *Mol Hum Reprod* 2018;24(12):593–601.
- Cuevas I, Pons MC, Cuadros M, Delgado A, Rives N, Moragas M, et al. The embryology interest group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Med Repr Embriol Clin* 2018;5:42–54.
- Dasig D, Lyon J, Behr B, Milki AA. Monozygotic twin birth after the transfer of a cleavage stage embryo resulting from a single pronucleated oocyte. *J Assist Reprod Genet* 2004;21(12):427–9.
- Daughtry BL, Rosenkrantz JL, Lazar NH, Fei SS, Redmayne N, Torkenczy KA, et al. Single-cell sequencing of primate preimplantation embryos reveals chromosome elimination via cellular fragmentation and blastomere exclusion. *Genome Res* 2019;29(3):367–82.
- de Carli G, Campos Pereira T. On human parthenogenesis. *Med Hypotheses*. 2017;106:57–60.
- Destouni A, Dimitriadou E, Masset H, Debrock S, Melotte C, Van Den Bogaert K, et al. Genome-wide haplotyping embryos developing from OPN and 1PN zygotes increases transferrable embryos in PGT-M. *Hum Reprod* 2018;33(12):2302–11.
- Escribá MJ, Escrich L, Galiana Y, Grau N, Galán A, Pellicer A. Kinetics of the early development of uniparental human haploid embryos. *Fertil Steril* 2016;105(5):1360–68.e1.
- Escribá MJ, Vendrell X, Peinado V. Segmental aneuploidy in human blastocysts: a qualitative and quantitative overview. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17(1):76.
- Esfandiari N, Bunnell ME, Casper RF. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *J Assist Reprod Genet* 2016;33(11):1439–44.
- Feenan K and Herbert M. Can 'abnormally' fertilized zygotes give rise to viable embryos? *Hum Fertil (Camb)* 2006;9(3):157–69.
- Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10(10):2623–9.
- Gleicher N, Metzger J, Croft G, Kushnir VA, Albertini DF, Barad DH. A single trophoctoderm biopsy at blastocyst stage is mathematically unable to determine embryo ploidy accurately enough for clinical use. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;15(1):33.

## PREMIO EMB-ASEBIR 2019

Gleicher N, Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res* 2017;10(1):21.

Gras L, Trounson AO. Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization. *Hum Reprod* 1999;14(7):1869–71.

Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM, et al. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994;9(4):721–4.

Harrison RH, Kuo H-C, Scriven PN, Handyside AH, Mackie Ogilvie C. Lack of cell cycle checkpoints in human cleavage stage embryos revealed by a clonal pattern of chromosomal mosaicism analysed by sequential multicolour FISH. *Zygote* 2000;8(3):217–24.

Hayden SR, Brown MD. Likelihood ratio: A powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decision making. *Ann Emerg Med* 1999;33(5):575–80.

Hondo S, Arichi A, Muramatsu H, Omura N, Ito K, Komine H, et al. Clinical outcomes of transfer of frozen and thawed single blastocysts derived from nonpronuclear and monopronuclear zygotes. *Reprod Med Biol* 2019;18(3):278–83.

Huang J, Yan L, Lu S, Zhao N, Qiao J. Re-analysis of aneuploidy blastocysts with an inner cell mass and different regional trophoblast cells. *J Assist Reprod Genet* 2017;34(4):487–93.

Itoi F, Asano Y, Shimizu M, Honnma H, Murata Y. Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(9):1401–7.

Kai Y, Moriwaki H, Yumoto K, Iwata K, Mio Y. Assessment of developmental potential of human single pronucleated zygotes derived from conventional in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2018;35(8):1377–84.

Kalatova B, Jesenska R, Hlinka D, Dudas M. Tripolar mitosis in human cells and embryos: occurrence, pathophysiology and medical implications. *Acta Histochem* 2015;117(1):111–25.

Lee C.S.S., Yap W.Y., Low S.Y., Lim Y.X. P-23 Euploidy rates for day 3 apronuclear (OPN) and unipronuclear (1PN) embryos. *Reprod Biomed Online* 2013;26 (suppl 1):S36.

Leng L, Ouyang Q, Kong X, Gong F, Lu C, Zhao L, et al. Self-diploidization of human haploid parthenogenetic embryos through the Rho pathway regulates endomitosis and failed cytokinesis. *Sci Rep* 2017;7(1):1–10(4242).

Levron J, Munné S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. *Biol Reprod* 1995;52(3):653–7.

Liao H, Zhang S, Cheng D, Ouyang Q, Lin G, Gu Y, et al. Cytogenetic analysis of human embryos and embryonic stem cells derived from monopronuclear zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2009;26(11–12):583–9.

Lim AST, Goh VHH, Su CL, Yu SL. Microscopic assessment of pronuclear embryos is not definitive. *Hum Genet* 2000;107(1):62–8.

Lim AYX, Lee CSS. Embryos arising from apronuclear (OPN) and unipronuclear (1PN) have similar euploidy rates with those from 2PN and should be considered for transfer. *Fertil Reprod* 2019;1(2):73–7.

Lin G, Ouyang Q, Zhou X, Gu Y, Yuan D, Li W, et al. A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following in vitro fertilization procedure. *Cell Res* 2007;17(12):999–1007.

Macas E, Imthurn B, Roselli M, Keller PJ. Chromosome analysis of single- and multipronucleated human zygotes proceeded after the intracytoplasmic sperm injection procedure. *J Assist Reprod Genet* 1996;13(4):345–50.

Maleszewski M. Behavior of sperm nuclei incorporated into parthenogenetic mouse eggs prior to the first cleavage division. *Mol Reprod Dev* 1992;33(2):215–21.

Manor D, Kol S, Lewit N, Lightman A, Stein D, Pillar M, Itskovitz-Eldor J. Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Human Reprod* 1996; 11 (11): 2502–6.

Mastenbroek S, Repping S. Preimplantation genetic screening: back to the future. *Hum Reprod* 2014;29(9):1846–50.

Mateo S, Vidal F, Carrasco B, Rodríguez I, Coroleu B, Veiga A, Boada M. Morphokinetics and in vitro Developmental Potential of Monopronucleated ICSI Zygotes Until the Blastocyst Stage. *Zygote* 2020; 28(3): 217–22.

## PREMIO EMB-ASEBIR 2019

Mateo S, Parriego M, Boada M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A. *In vitro* development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2013; 99(3).

Mateo S, Vidal F, Coll L, Veiga A, Boada M. Chromosomal analysis of blastocyst derived from monopronucleated ICSI zygotes: Approach by double trophoctoderm biopsy. *J Bras Reprod Assist* 2017b;21(3):203–7.

Mateo S, Vidal F, Parriego M, Rodríguez I, Montalvo V, Veiga A, et al. Could monopronucleated ICSI zygotes be considered for transfer? Analysis through time-lapse monitoring and PGS. *J Assist Reprod Genet* 2017a;34(7):905–11.

Mittwoch U. Parthenogenesis. *J Med Genet* 1978;15(3):165–81.

Navratil R, Horak J, Hornak M, Kubicek D, Balcova M, Tauwinklova G, et al. Concordance of various chromosomal errors among different parts of the embryo and the value of re-biopsy in embryos with segmental aneuploidies. *Mol Hum Reprod* 2020; 26(4):269–76.

Noyes N, Fino ME, Krey L, McCaffrey C, Adler A, Grifo J. Embryo biopsy: the fate of abnormal pronuclear embryos. *Reprod Biomed Online* 2008;17(6):782–8.

Otsu E, Sato A, Nagaki M, Araki Y, Utsunomiya T. Developmental potential and chromosomal constitution of embryos derived from larger single pronuclei of human zygotes used in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2004;81(3):723–4.

Palermo GD, Munné S, Colombero LT, Cohen J, Rosenwaks Z. Genetics of abnormal human fertilization. *Hum Reprod* 1995;10(suppl 1):120–7.

Patrizio P, Shoham G, Shoham Z, Leong M, Barad DH, Gleicher N. Worldwide live births following the transfer of chromosomally “Abnormal” embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(8):1599–1607.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;12(3):532–41.

Pellestor F, Gatinois V, Puechberty J, Geneviève D, Lefort G. Chromothripsis: potential origin in gametogenesis and preimplantation cell divisions. A review. *Fertil Steril* 2014;102(6):1785–96.

Plachot M. Chromosomal abnormalities in the human conceptus. In: CRC Press. *New Horizons in Reproductive Medicine*. Cou-tifaris C, Mastroianni L. 1997:459–64.

Popovic M, Dhaenens L, Boel A, Menten B, Heindryckx B. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma. *Hum Reprod Update* 2020; 26(3):313–34

Porter R, Han T, Tucker MJ, Graham J, Liebermann J, Sills ES. Estimation of second polar body retention rate after conventional insemination and intracytoplasmic sperm injection: *In vitro* observations from more than 5000 human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2003;20(9):371–6.

Reichmann J, Nijmeijer B, Julius Hossain M, Eguren M, Schneider I, Politi AZ, et al. Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science* 2018;361(6398):189–93.

Rhrissorakkrai K, Belcastro V, Bilal E, Norel R, Poussin C, Mathis C, Dulize R, Ivanov N, Alexopoulos L, Rice J, Peitsch M, Stolovitzky G, Meyer P, Hoeng J. Understanding the limits of animal models as predictors of human biology: lessons learned from the sbv IMPROVER Species Translation Challenge, *Bioinformatics*, 2015, 31(4):471–483

Rosenbusch B. The chromosomal constitution of embryos arising from monopronuclear oocytes in programmes of assisted reproduction. *Int J Reprod Med* 2014;2014:418198.

Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn* 2007;27(8):748–56.

Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, De Rycke M, De Vos A, et al. The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Mol Hum Reprod* 2016;22(8):845–57.

Si J, Zhu X, Lyu Q, Kuang Y. Obstetrical and neonatal outcomes after transfer of cleavage-stage and blastocyst-stage embryos derived from monopronuclear zygotes: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2019;112(3):527–33.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after *in-vitro* fertilization. *Hum Reproduction* 1993;8(2):221–3.

## PREMIO EMB-ASEBIR 2019

Staessen C, Van Steirteghem AC. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12(2):321–7.

Sultan KM, Munné S, Palermo GD, Alikani M, Cohen J. Chromosomal status of unipronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10(1):132–6.

Suss-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M, Manor D, Itskovitz-Eldor J. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. *Hum Reprod* 2004;19(3):670–5.

Tesarik J, Mendoza C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum Reprod* 1996;11(4):772–9.

Usui N, Yanagimachi R. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization, and early development. The appearance and disappearance of factors involved in sperm chromatin decondensation in egg cytoplasm. *J Ultrastruct Res* 1976;57(3):276–88.

Vendrell X, Escribà M J. The model of “genetic compartments”: a new insight into reproductive genetics. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(3):363–69.

Vendrell X, Fernández-Pedrosa V, Triviño JC, Bautista-Llácer R, Collado C, Rodríguez O, et al. New protocol based on massive parallel sequencing for aneuploidy screening of preimplantation human embryos. *Syst Biol Reprod Med* 2017;63(3):162–78.

Vendrell X, Ferrer M, García-Mengual E, Muñoz P, Triviño JC, Calatayud C, et al. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online* 2014;28(4):492–502.

Victor AR, Griffin DK, Brake AJ, Tyndall JC, Murphy AE, Lepkowsky LT, et al. Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophoctoderm biopsy and blastocyst. *Hum Reprod* 2019;34(1):181–92.

Viotti M. Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. *Genes (Basel)* 2020;11(6):602–38.

Xie PY, Tang Y, Hu L, Ouyang Q, Gu YF, Gong F, et al. Identification of biparental and diploid blastocysts from monopronuclear zygotes with the use of a single-nucleotide polymorphism array. *Fertil Steril* 2018;110(3):545–54.

Yao G, Xu J, Xin Z, Niu W, Shi S, Jin H, et al. Developmental potential of clinically discarded human embryos and associated chromosomal analysis. *Sci Rep* 2016;6(4):1–9.

Yin B-L, Hao H-Y, Zhang Y-N, Wei D, Zhang C-L. Good quality blastocyst from non-/mono-pronuclear zygote may be used for transfer during IVF. *Syst Biol Reprod Med* 2016;62(2):139–45.

Zhang P-Y, Fan Y, Tan T and Yu Y. Generation of Artificial Gamete and Embryo From Stem Cells in Reproductive Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol* 2020 8:781.

# SESIÓN DE GENÉTICA

## IMPORTANCIA DEL ASESORAMIENTO GENÉTICO EN MEDICINA REPRODUCTIVA

### Anna Abulí Vidal

Institut Universitari Dexeus, Barcelona, España  
aabuli@vhebron.net

Los avances tecnológicos en el campo de la genética y los que se prevén que tendrán lugar en un futuro próximo están encaminados a una medicina genómica que cada vez tendrá un papel más importante tanto en reproducción reproductiva, como en muchos otros ámbitos de la medicina. Actualmente, ya son evidentes los avances de la genómica en la práctica clínica diaria con la incorporación de las tecnologías NGS para el cribado de anomalías cromosómicas en los embriones o con la incorporación de los nuevos tests genéticos de cribado de portadores para un elevado número de enfermedades genéticas a nivel preconcepcional. Esta ponencia pretende dar una visión general de la importancia de la genética, la genómica y el asesoramiento genético en el ámbito de la medicina reproductiva.

Los nuevos retos que plantea el asesoramiento genético en un futuro inminente es la implementación de la secuenciación del exoma e incluso del genoma en muchos ámbitos de la medicina.

Las tecnologías NGS representan un gran reto debido a la complejidad de la información generada y la gran variedad de hallazgos que pueden revelarse. En medicina reproductiva, la implementación de la NGS en el diagnóstico de los embriones no sólo permitirá el cribado para aneuploidías cromosómicas sino para una gran variedad de enfermedades monogénicas. El dilema es la consecuencia del poder del cribado, que tiene el potencial para detectar mutaciones de susceptibilidad genética a múltiples enfermedades, variantes asociadas a fenotipos con expresividad variable y/o penetrancia incompleta. Si disponemos de los datos genómicos de un embrión, el umbral para cribar una enfermedad adicional será muy bajo, y será cuando nos plantearemos: ¿Qué hacemos con los embriones con enfermedades no 'suficientemente graves'? ¿Y los embriones con riesgo bajo de enfermedad? ¿Dónde pondremos el límite? Sin duda, la introducción de la genómica en la medicina reproductiva, depara muchas reflexiones éticas que deberán considerarse para un adecuado asesoramiento genético.

## IMPORTANCIA DEL CRIBADO POBLACIONAL EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

**Julio Martín, Pere Mir, Arantxa Hervás, Ana Cervero y Carlos Simón**

Igenomix R&D S.L., Valencia  
julio.martin@igenomix.com

### INTRODUCCIÓN

El papel de la variación genética en las enfermedades humanas es bien conocido. Cambios en el ADN (genotipo en el genoma) de las personas “explican” las enfermedades monogénicas, y contribuyen a su desarrollo, progreso y severidad; también de patologías o rasgos complejos, así como influyen en la respuesta de posibles tratamientos. Sin restarle valor a los estudios clásicos de genética molecular, la implementación de las tecnologías de secuenciación masiva del ADN en investigación biológica y en la práctica de la medicina clínica ha acelerado la detección tanto de cambios comunes [en la población] como los de baja o muy baja frecuencia, favoreciendo el progreso en la caracterización de un gran número de enfermedades genéticas. Junto al desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas de análisis de datos, igualmente se ha mejorado de forma significativa en la detección e interpretación de variantes. Todos estos avances no restan importancia a la evidencia de que todavía es necesario seguir trabajando para prevenir estas enfermedades y mejorar la vida de las personas afectadas.

Respecto a las enfermedades monogénicas, la detección de portadores mediante pruebas genéticas forma parte de la práctica clínica desde hace décadas. Inicialmente se analizaban patologías severas, gen a gen, en familias con historia clínica familiar a fin de identificar mutaciones en mujeres considerando un embarazo o ya embarazadas; el cribado genético poblacional se propuso también inicialmente a poblaciones de alto riesgo; ejemplos son la detección de portadores de enfermedad de Tay-Sachs en individuos de ascendencia judía asquenazí (AJ) y, el cribado de la fibrosis quística en población de ascendencia europea, caucásicos. Siguiendo esta práctica y junto a la detección de otras afecciones como anemia falciforme y las talasemias, la prevalencia de estas enfermedades disminuyó significativamente [1-4]. Actualmente, el objetivo real de programas de cribado es la prevención de enfermedades genéticas en las generaciones posteriores, haciendo uso de paneles que analizan simultáneamente cientos de genes

asociados a un número equivalente de patologías. Además, el continuo aumento de nuestro conocimiento genético ha permitido la decodificación de cerca de 6.000 trastornos con sospecha de herencia mendeliana, de los cuales aproximadamente 2.000 son enfermedades autosómicas recesivas o ligadas al cromosoma X (<https://www.omim.org/statistics/entry>; último acceso en septiembre 2021), lo que abre la posibilidad de un enfoque intensivo de pruebas de cribado preconcepcional y/o prenatal.

### La detección de portadores en la atención preconcepcional y prenatal.

La prevención de las enfermedades Mendelianas mediante el cribado genético es clínicamente pertinente. En su conjunto, estas condiciones representan alrededor del 20% de la mortalidad infantil y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas [5, 6]. Por tanto, identificar individuos o parejas a riesgo de tener hijos con enfermedades autosómicas recesivas o ligadas al cromosoma X permite informar de posibles opciones reproductivas. En 2013, el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) vinculó la utilidad de la detección de portadores con toma de decisiones reproductivas [7]. Esta toma de decisiones está intrínsecamente ligada a la gravedad de la patología que se esté evaluando. Sin embargo, puede existir cierta discrepancia a la hora de establecer consenso para definir la severidad de varias condiciones. En este punto, algunos estudios publicados han trabajado con expertos clínicos de forma colaborativa para categorizar severidad de ciertas enfermedades [8, 9].

Con la llegada de la secuenciación masiva o de nueva generación (NGS), de alto rendimiento, y junto a numerosos avances bioinformáticos, se extendió el uso de estas herramientas en investigaciones, pruebas de concepto y en la práctica clínica del cribado genético previo al embarazo [10-12]. No obstante, la diversidad de opciones tecnológicas y comerciales originaron que cada investigador, genetista, o equipo clínico determinará el enfoque apropiado para secuenciar el ADN de



# SESIÓN DE GENÉTICA

sus estudios. Estos trabajos demostraron que era factible el análisis simultáneo de múltiples genes de forma eficiente y asequible, detectando cantidad de variantes de ADN que una evaluación del historial familiar nunca detectaría. Como contrapartida, se puso en marcha una enorme fragmentación de la oferta o disponibilidad de pruebas, coexistiendo distintos contenidos de genes-enfermedades (Figura 1).

Esta fragmentación de la oferta no debe imputarse solo a intereses particulares de las distintas implementaciones realizadas por cada laboratorio; si bien el objetivo de las pruebas de cribado no ha cambiado esencialmente desde su implementación hace ya más de 4 décadas, si lo ha hecho y de forma radical la tecnología utilizada, permitiendo analizar un amplio contenido de genes, con un alto rendimiento de muestras y un tiempo de respuesta ajustado al manejo clínico de los resultados. La continua publicación de resultados de estas implementaciones [13-16] realizadas siguiendo las recomendaciones y guías publicadas por colegios profesionales [7, 17-19] -muchas previas a la explosión de la tecnológica mencionada-, evidencia que los tiempos de aparición de estas guías frente a los resultados obtenidos con el uso de las nuevas tecnologías no iban acompasados, y esto directamente ha favorecido la diversidad de contenido en las pruebas de cribado.

## Qué sabemos hoy a cerca de las pruebas de cribado de portadores

La detección de portadores o cribado genético denota pruebas genéticas realizadas en individuos asintomáticos, y por lo demás sanos, para determinar si tienen una o más mutaciones (variantes patogénicas o probable patogénicas) dentro de uno o más genes asociados con trastornos autosómicos recesivos; además, en mujeres se analizan genes ligados al cromosoma X. Actualmente se realizan para evaluar una gran cantidad de patologías simultáneamente. Estas pruebas identificarán la mayoría de las personas y parejas con riesgo de tener descendencia afectada. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que cualquier individuo que resulte negativo para un gen específico todavía tiene un riesgo residual (RR) de ser un verdadero portador. Este RR variará según la prevalencia de la enfermedad, la tasa de detección, la población de origen (o etnia), entre otras variables.

En definitiva, el objetivo de cribado es proporcionar información significativa de cara al riesgo en la descendencia, así como las distintas opciones reproductivas. La lista de enfermedades recomendados para ser incluidos en las pruebas de portadores no es definitiva, y como referencia se toman las recomendaciones y guías elaboradas por las Sociedades Profesionales [19, 20], basados según severidad, prevalencia, tasas de detección y RR. Recientemente se ha publicado una

actualización de una de las principales recomendaciones prácticas sobre cribado de enfermedades recesivas y ligadas al cromosoma X [21]. En esta actualización se pone de manifiesto que la elección de que enfermedades incluir en las pruebas de cribado puede verse limitada o afectada para varias patologías en caso de seguir conceptos como los de severidad, grupo social o étnico - incluyendo la propia auto asignación de ascendencia poblacional- entre otros criterios; se indica que es importante ir más allá de los grupos de riesgo e incluir diversas poblaciones. Igualmente se indica que, el precio de partida de estas pruebas es en general más asequible ahora permitiendo la oportunidad de llegar a prácticamente todos los pacientes.

Esta actualización va en consonancia con trabajos publicados en los que se muestran resultados apoyando que los análisis genéticos de cribado con un amplio contenido de genes y enfermedades son capaces de detectar más variantes patogénicas, y por ende más parejas a riesgo, las cuales no se identificarían siguiendo ciertos criterios previamente establecidos [12, 22-25].

Finalmente, si bien la mayoría de los trabajos y recomendaciones anteriores tienen un enfoque principal del uso de pruebas de cribado en población general, existen también recomendaciones respecto a la aplicación en reproducción asistida incluyendo programas con donación de gametos [20] y estudios demostrando la utilidad clínica en dichos programas [14, 16, 24].

## ¿Qué condiciones genéticas detectar?

Muchos estudios se han centrado en describir y / o determinar los criterios para la selección de condiciones genéticas, tal como hemos indicado en apartados anteriores; obviando aspectos ya comentados como grado de severidad y recomendaciones profesionales tempranas, las cuales contenían contenido limitado de enfermedades, el número de enfermedades a estudiar puede considerarse hoy día como un apartado aun no cerrado, dinámico, y mayoritariamente creciente; los cambios vendrán dado en base a los avances del conocimiento genético (genotipo-fenotipo-herencia), avances tecnológicos y actualizaciones de las recomendaciones profesionales, y actualizaciones de las bases de datos (Clinvar [26], HGMD [27], etc). Esta evolución tendrá que considerar como abordar ciertas contradicciones, para algunas de las patologías a incluir, que se puedan encontrar entre las distintas recomendaciones profesionales y adaptarse a las legislaciones vigentes en cada país en el que se haga uso de las pruebas genéticas. En definitiva, cerrar un listado de enfermedades puede ser algo comprometido y, teniendo en cuenta la evolución reciente, posiblemente limitado en el tiempo. No obstante, podemos tomar como referencia de partida amplia la última actualización de

# SESIÓN DE GENÉTICA

las recomendaciones realizadas por el Colegio Americano de Genética y Genómica Médica (ACMG) [21]. En el caso de cribado de donantes, y para España, la referencia de partida sería las recomendaciones propias [20].

## LIMITACIONES

Los pacientes con enfermedades genéticas constituyen una parte importante de la población mundial con necesidades especiales de atención sanitaria [6]. Junto con los avances en el conocimiento y las tecnologías genéticas, podemos asumir fácilmente que al proporcionar información sobre el estado de portador estamos ayudando a las personas, las familias y la sociedad en general. Sin embargo, todavía se necesitan estudios que aborden los resultados reproductivos después del uso de cribado genético, y demostrar la utilidad clínica de todos estos avances cuando se ofrecen a la población general. Además, debemos fomentar los estudios epidemiológicos a nivel mundial de los trastornos hereditarios, particularmente relevantes para los países en desarrollo con recursos limitados, ya que la mayoría de las investigaciones epidemiológicas se han realizado con individuos de Europa y América del Norte. Los hallazgos de esos nuevos estudios permitirán definir contenidos de genes de interés, tasas de portadores asociados y otras métricas relevantes para la implementación de programas de cribado generales o pan-étnicos. Otro ámbito de mejora está relacionado con los cálculos del riesgo residual o RR. Junto a los estudios anteriores, el cálculo preciso de la tasa de detección y su derivada, el riesgo residual, es fundamental para proporcionar una utilidad clínica adecuada y apoyo a las parejas mientras se toman decisiones sobre la reproducción. En este sentido trabajos recientes como el publicado por Leung y co-autores [28] resulta de gran importancia si se quiere ofrecer información transparente sobre la utilidad clínica de estas pruebas genéticas. Los autores sugieren un enfoque que implica que los laboratorios que realizan estas pruebas informen de cada evidencia y métodos utilizados, facilitando así las comparaciones objetivas entre tests de distintos laboratorios.

En los últimos años hemos visto un gran progreso en los nuevos desarrollos de herramientas bioinformáticas relacionadas con la búsqueda, agregación, análisis, etc., incluido el intercambio de conocimientos relacionados con la interpretación de variantes [29]; estas herramientas han tenido un impacto positivo en la comprensión de la variación del ADN humano. Sin embargo, todavía falta interpretación clínica para una parte significativa de la variación genética, especialmente asociada a fenotipos clínicamente variables o condiciones que muestran una penetrancia incompleta. Esto presenta una limitación o un desafío para el genetista y el médico respecto al asesoramiento y manejo clínico de un paciente o pareja; en un entorno de cribado debe evitarse encontrarse con re-

sultados no concluyentes. La interpretación de variantes entre diferentes estudios es una limitación para proporcionar estimaciones definitivas de la carga de portadores en un número significativo de genes humanos. El uso de recomendaciones profesionales de interpretación de variantes [30] es sin duda un avance significativo; existe un gran consenso en que las pruebas de cribado informen solo de detección de variantes patogénicas y probablemente patogénicas, dejando fuera de los informes las variantes inciertas. No obstante, las evidencias cambian en el tiempo y esto afecta a la interpretación de variantes, por tanto, aun es necesario continuar progresando. Una limitación actual es la acumulación de datos en bases de datos de variantes propias. Compartir evidencias, aunque complejo a nivel comercial resulta de vital importancia a la hora de clasificar ciertas variantes muy raras en la población.

Respecto al uso de cribado genético en reproducción asistida, especialmente con uso de donantes de gametos, se debe considerar que las personas donantes suelen ser individuos jóvenes que acuden a la clínica reproductiva con el propósito de donar, y es posible que no esperen que se les realicen pruebas para detectar trastornos genéticos. Incluso después de recibir asesoramiento previo a la prueba y dar su consentimiento para la prueba, la posibilidad de ser portador de una determinada mutación puede no estar en la mente de los candidatos. Por lo tanto, en el caso de un resultado positivo, el asesoramiento genético debe considerar el impacto sobre el individuo, especialmente si resulta excluido del programa de donación (por ejemplo, mujer donante portadora de gen ligado al X). En tales casos, el asesoramiento genético posterior a la prueba debe enfatizar que, por lo general, no existe riesgo clínico para el individuo examinado, pero al mismo tiempo debe indicar la relevancia clínica de la información para la planificación familiar propia futura.

## CONCLUSIONES

La detección de portadores es un componente importante de la atención médica previa al embarazo (preconcepcional) o de forma temprana en el mismo (prenatal). Su objetivo es identificar parejas o mujeres en riesgo de transmitir enfermedades genéticas a su descendencia. Hoy en día, los enfoques de secuenciación de alto rendimiento permiten la detección eficiente de muchas enfermedades simultáneamente. El contenido genético de estas pruebas, aun siguiendo recomendaciones profesionales, varía entre proveedores clínicos, comerciales. Queda pendiente llegar a consensos seguidos mayoritariamente, si bien esto resulta de difícil implementación debido a diferencias tanto en regulación como población en estudio (ausencia de estudios epidemiológicos para ciertas poblaciones), diferencias sociales, económicas, etc.

# SESIÓN DE GENÉTICA

El asesoramiento genético adecuado y preciso antes y después de la prueba es de suma importancia, e incluye una interpretación de variantes lo más precisa posible en base a las evidencias disponibles en cada momento. Los individuos y las parejas deben comprender el propósito de la prueba genética, los trastornos analizados y su gravedad, y el hecho de que, incluso para un resultado negativo de la prueba, permanece un riesgo residual. En general deben ser conocedores de las ventajas, pero también de las limitaciones de estas pruebas.

Respecto a reproducción asistida con uso de donantes de gametos, el asesoramiento genético debe considerar las particularidades de la población en estudio (personas generalmente jóvenes aun sin intención de planificación reproductiva propia/personal). Un resultado positivo, especialmente si conlleva la no inclusión en el programa de donación debe proveer de un asesoramiento genético adecuado enfatizando que si bien no existe riesgo clínico para el individuo existe relevancia clínica para la planificación familiar futura.

**Figura 1.** Comparativa 2 a 2 de test de cribados equivalentes; se representa la fragmentación de la oferta, mostrando grupos de genes: en común (círculos centrales) vs exclusivos A y C. (EU - España)



Grupo A y C: genes (número) exclusivos de cada uno de dos tests, en comparativa 2 a 2.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kaback M, Lim-Steele J, Dabholkar D, et al. Tay-Sachs disease--carrier screening, prenatal diagnosis, and the molecular era. An international perspective, 1970 to 1993. The International TSD Data Collection Network. *JAMA*. 1993 Nov 17;270(19):2307-15.
2. Genetic testing for cystic fibrosis. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on genetic testing for cystic fibrosis. *Arch Intern Med*. 1999 Jul 26;159(14):1529-39.
3. Castellani C, Picci L, Tamanini A, et al. Association between carrier screening and incidence of cystic fibrosis. *JAMA*. 2009;302:2573-2579.
4. Bozkurt G. Results from the North Cyprus Thalassaemia Prevention Program. *Hemoglobin*. 2007;31:257-264.
5. Costa T, Scriver CR, and Childs B. The effect of Mendelian disease on human health: A measurement. *Am J Med Genet*. 1985;21:243-255.
6. Kumar P, Radhakrishnan J, Chowdhary MA, et al. Prevalence and patterns of presentation of genetic disorders in a pediatric emergency department. *Mayo Clin Proc*. 2001;76:777-783.
7. Grody WW, Thompson BH, Gregg AR, et al. ACMG position statement on prenatal/preconception expanded carrier screening. *Genet. Med*. 2013;15:482-483.
8. Lazarin GA, Hawthorne F, Collins NS, et al., Systematic classification of disease severity for evaluation of expanded carrier screening panels. *PLoS One*. 2014;9, e114391.

## SESIÓN DE GENÉTICA

9. Arjunan A, Bellerose H, Torres R, et al. Evaluation and classification of severity for 176 genes on an expanded carrier screening panel. *Prenatal Diagnosis* 2020;40:1246-1257.
10. Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2011 Jan 12;3(65):65ra4.
11. Martin J, Cervero A, Mir P, et al. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril.* 2013 Mar 15;99(4):1054-1061.
12. Lizarin GA, Haque IS, Nazareth S, et al. An empirical estimate of carrier frequencies for 400+ causal Mendelian variants: Results from an ethnically diverse clinical sample of 23,453 individuals. *Genet Med.* 2013;15(3):178-186.
13. Umbarger MA, Kennedy CJ, Saunders P, et al. Next-generation carrier screening. *Genet Med.* 2014; 16(2):132-140.
14. Martin J, Asan, Yi Y, et al. Comprehensive carrier genetic test using next-generation deoxyribonucleic acid sequencing in infertile couples wishing to conceive through assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2015;104(5):1286-1293.
15. Haque IS, Lizarin GA, Kang HP, et al. Modeled Fetal Risk of Genetic Diseases Identified by Expanded Carrier Screening. *JAMA.* 2016;316(7):734-42.
16. Abulí A, Boada M, Rodríguez-Santiago B, et al. NGS-based assay for the identification of individuals carrying recessive genetic mutations in reproductive medicine. *Hum Mutat* 2016;37(6):516-523.
17. ACOG Committee on Genetics. Committee Opinion No. 690: Carrier screening in the age of genomic medicine. *American College of Obstetricians and Gynecologists. Obstet Gynecol.* 2017;129:e35-e40.
18. ACOG Committee on Genetics. Committee Opinion No. 691: Carrier screening for genetic conditions. *Obstet Gynecol.* 2017;129:e41-e55.
19. Edwards JG, Feldman G, Goldberg J, et al. Expanded carrier screening in reproductive medicine—Points to consider. A joint statement of the American College of Medical Genetics and Genomics, American College of Obstetricians and Gynecologists, National Society of Genetic Counselors, Perinatal Quality Foundation, and Society for Maternal-Fetal Medicine. *Obstet Gynecol* 2015;125(3):653-662.
20. Castilla JA, Abellán-García F, Alamá P et al. Cribado genético en donación de gametos. Madrid: Fase 20 SL; 2019.64p: Grupo de trabajo de Donación de Gametos y Embriones de la SEF, en colaboración con ASES, AEBM-ML, ASEBIR y AEGH.
21. Gregg AR, Aarabi M, Klugman S, et al. Screening for autosomal recessive and X-linked conditions during pregnancy and preconception: a practice resource of the ACMG. *Genet Med.* 2021; published online 20 July 2021.
22. Perreault-Micale C, Davie J, Breton B, et al. A rigorous approach for selection of optimal variant sets for carrier screening with demonstration of clinical utility. *Mol Genet Genom Med.* 2015;3(4):363-373.
23. Hallam S, Nelson H, Greger V, et al. Validation for clinical use of, and initial clinical experience with, a novel approach to population-based carrier screening using high-throughput, next-generation DNA sequencing. *J Mol Diagn.* 2014;16:180-189.
24. Capalbo A, Alonso R, Jimenez-Almazan J, et al. Optimizing Clinical exome design and parallel gene-testing for recessive genetic conditions in preconception carrier screening: translational research genomic data from 14,125 exomes. *Plos Genet* 2019;15(10):e1008409.
25. Westemeyer M, Saucier J, Wallace J, et al. Clinical experience with carrier screening in a general population: support for a comprehensive pan-ethnic approach. *Genet. Med.* 2020;22:1320-1328.
26. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D862-D868.
27. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al., The Human Gene Mutation Database: Towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136:665-677.
28. Leung ML, McAdoo S, Watson D, et al. A transparent approach to calculate detection rate and residual risk for carrier screening. *J Mol Diagn.* 2021;23(1):91-102.
29. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A et al., VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019;35(11):1978-1980.
30. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-423.

# SESIÓN DE CALIDAD

## PLANES DE CONTINGENCIA EN LAS UNIDADES DE REPRODUCCIÓN

### Empar Ferrer i Robles

CREA. Centro Médico de Reproducción Asistida. Valencia  
empar.ferrer@creavalencia.com / 963 525 942

### INTRODUCCIÓN

Si buscamos la definición de contingencia en el diccionario de la Real Academia Española, encontramos que es la Posibilidad de que algo suceda o no suceda, o Cosa que puede o no suceder y como tercera acepción citada es: Riesgo; por lo tanto, cuando trasladamos este concepto a los laboratorios de reproducción humana asistida (LRHA) encontramos que una larga lista de cosas nos podría suceder y ser un riesgo importante para la integridad de los gametos y embriones. Por medio de la implantación de medidas para que estos hechos o problemas no sucedan y en el caso de que sucediesen tener descrito un plan de acción para actuar de forma rápida y efectiva, para así minimizar los daños; estaríamos elaborando planes de contingencia, realizando una gestión de riesgos e implantando en el laboratorio pautas dentro de un sistema de control de calidad.

Existe muy escasa bibliografía sobre planes de contingencia en LRHA y la gran mayoría de lo publicado hace referencia a planes de emergencia, en situaciones como el huracán Katrina (Dickey et al., 2006), las recomendaciones para el desarrollo de planes de emergencia elaboradas por la ASRM en 2008 y posterior revisión (Pfeifer et al., 2016) o tras el huracán Sandy (Goldman et al., 2013). Actualmente, encontramos recomendaciones de estamentos gubernamentales sanitarios y sociedades científicas, de planes de contingencia para responder a la emergencia sanitaria por Covid-19. Recientemente se ha publicado una guía de buenas prácticas para la gestión de los laboratorios IVF en situaciones extraordinarias como pudiera ser una pandemia (Hickman et al., 2020).

Es muy frecuente que se confundan ambos términos emergencia y contingencia, pero no son lo mismo, sus principales diferencias son:

El plan de emergencia se establece para describir la planificación de cómo afrontar una situación de emergencia por parte de todo un centro o unidad. En este plan con infor-

mación más extensa sobre organización, políticas, recursos, responsabilidades, sistemas de comunicación, revisiones... Se consideran emergencias: incendios, desastres naturales, inundaciones, epidemias, guerras.

El plan de contingencia determina los procedimientos operacionales específicos a realizar ante una emergencia en particular. Forma parte del plan de emergencia.

Habitualmente, los planes de contingencia están relacionados a un "gran problema" asociado a una situación de emergencia como las descritas anteriormente (catástrofes naturales, incendios...), pero haciendo referencia a la propia definición del término en sí, es un riesgo que puede traer un daño, en los laboratorios deberíamos tener presente, no solo aquellos que son de gran magnitud para la sociedad, debemos tener presente las "pequeñas" contingencias que puedan suceder en el día a día, porque sus consecuencias pueden ser muy graves para los gametos/embriones y por ello, tenemos que actuar como la emergencia que son. Es por ello que se revisarán la gestión de estos tipos diferentes de contingencias.

### MATERIAL Y MÉTODOS

La calidad de la asistencia en los centros de reproducción está regulada por ley y obliga a la implantación de sistemas de calidad, en estos sistemas se debe abordar la gestión de los riesgos y contingencias. Gracias a estas prácticas habituales en los laboratorios permite realizar con seguridad y éxito las técnicas y procedimientos.

La gestión y control de la calidad puede realizarse mediante la implantación de normas de calidad, como la UNE EN ISO 9001:2015 Sistemas de Gestión de la calidad, donde observamos que uno de los principales cambios con la versión anterior (2008), es que se potencia la gestión del riesgo, es fundamental para una organización el control del riesgo como garantía de éxito. Abordar los riesgos establece una

# SESIÓN DE CALIDAD

base para aumentar la eficacia del sistema de gestión de la calidad, alcanzar mejores resultados y prevenir los efectos negativos. Debe por tanto planificar e implementar acciones para abordar los riesgos, estas deben ser proporcionales al impacto sobre los productos y servicios y se debe evaluar la eficacia de estas acciones. Las opciones para abordar los riesgos pueden incluir: evitar riesgos, asumir riesgos para perseguir una oportunidad, eliminar la fuente de riesgo, cambiar la probabilidad o las consecuencias, compartir el riesgo o mantener riesgos mediante decisiones tomadas. Aunque no establece como requisito la aplicación de una metodología concreta para su gestión, la organización es libre de emplear desde un análisis meramente cualitativo hasta la aplicación de técnicas para la gestión cuantitativa de los riesgos, analizando la probabilidad de que ocurran eventos potenciales y sus consecuencias.

La norma UNE 179007:2013 Sistemas de Gestión de la calidad en laboratorios de reproducción asistida, que está pendiente de actualización con la ISO 9001:2015, uno de los puntos pendientes de actualizar es la gestión del riesgo; pero a pesar que no se trate directamente el riesgo, sí que cita en la Preservación del producto (7.5.5): La organización debe disponer de un plan de contingencia para el tratamiento y en su caso traslado de las muestras si este fuera necesario.

Por lo que estamos viendo, el plan de Contingencia, puede ser una extensión natural de la gestión de riesgos, esta gestión significa:

- Identificar lo que puede o no, en algún momento futuro, afectar al laboratorio, ¿Qué puede salir mal, romperse, faltar...?
- Prepararse para hacer frente a estos efectos. Cómo actuaremos para evitar que se produzca el daño y si ocurre cómo lo resolveremos.

Como citan Mortimer and Mortimer (2015). Un beneficio importante de un programa de gestión de riesgos eficaz, en el que los riesgos se identifican, analizan y minimizan, mitigan o eliminan continuamente, es que los problemas se previenen antes de que ocurran: con toma de decisiones proactivas y una planificación.

A partir de eso, tenemos algunas posibilidades de acción, que pueden ser:

- Prevenir para eliminar la posibilidad de que ocurra el riesgo.
- Reducir la probabilidad de que suceda.
- Minimizar los efectos de ese riesgo.
- Aceptar que el riesgo puede suceder.

En el Plan de contingencia vamos a determinar las medidas que debemos adoptar, los recursos necesarios y las actuaciones con el objetivo principal de reducir los daños que se puedan producir.

Este plan entraría en “acción” cuando en una situación no sea posible eliminar el riesgo, por más que reduzca la probabilidad de que ocurra, siempre habrá una posibilidad de incidencia, aunque sea pequeña y esté controlada. De esta forma, incluso actuando preventivamente, hay que hacer más. Estos planes nos ayudarán en el momento a tomar las decisiones adecuadas, evitarán “sorpresas o sustos” y mejorarán las posibilidades de éxito minimizando los daños. Aportan tranquilidad al equipo del laboratorio ante la posibilidad del riesgo; por ello, es fundamental todos los conozcan, que tengan conciencia de su importancia, sean partícipes y capaces de ejecutarlos perfectamente. Los planes se deben revisar, actualizar y pueden hacerse simulacros o ejercicios, para tenerlos al día.

Todos los riesgos son importantes y deben ser gestionados, pero solo necesitarán planes de contingencia aquellos que puedan traer impactos muy severos y aun trabajando fuertemente en la prevención sea necesario tener un “plan B” en caso de que el riesgo incida. Sólo se debe hacer en caso de necesidad para garantizar la seguridad de los procesos, de los gametos y embriones.

Es habitual vincular los Planes de Contingencia a acontecimientos negativos, con grandes daños. Sin embargo, es posible tener la necesidad de crearlos para factores positivos también, como una entrada alta e inesperada de tratamientos o ciclos en el laboratorio.

De esta forma, podemos decir que un Plan de Contingencia se elabora para lidiar con las consecuencias de un riesgo. ¡Sea él una amenaza u oportunidad!

## ELABORACIÓN DE UN PLAN DE CONTINGENCIA

En cuanto a qué metodología seguir para elaborar el plan de contingencia, podemos implementar un ciclo de mejora continua basado en un modelo PDCA (plan-do-check-act) o PHVA (planificar- hacer- verificar-actuar), Figura 1. El plan está formado por una serie de medidas adicionales a las existentes de carácter organizativo, técnico y humano. Esta misma metodología se describe en los requisitos de la norma ISO 223001:2019, norma que hace referencia a Sistemas de la gestión y continuidad de negocio y pauta las directrices a nivel de empresa para que ante una contingencia actuar de

# SESIÓN DE CALIDAD

forma efectiva y adecuada para poder aumentar las posibilidades de continuidad.

## El ciclo de mejora continua es un proceso mediante el cual:

- Se reconoce un problema, se planifican y definen unos objetivos.
- Se identifica una solución, eligiendo los recursos necesarios.
- Se implementa lo planificado, se pone en práctica
- Se comprueba el resultado y se verifica que se ha resuelto el problema.

A continuación, se describirán las pautas para la elaboración de los planes diferenciando el tipo o magnitud de la contingencia, tal y como se había indicado anteriormente.

## PLAN DE CONTINGENCIA PARA RIESGOS ASOCIADOS AL CENTRO O LABORATORIO

Las contingencias o riesgos que pueden pasar son múltiples y serán diferentes para cada laboratorio, estos pueden estar relacionados con los recursos humanos, físicos, económicos, organizativos e incluso podemos encontrar asociados a la gestión de los propios riesgos. En la tabla I se detallan algunos de los posibles riesgos que podemos encontrar en los laboratorios, pero es importante, en el momento de realizar nuestros propios planes de contingencia, tener presente cuáles van a ser los recursos y limitaciones que tenemos en nuestro centro o unidad; porque va a ser muy probable que algunas de las acciones que pautemos ante la contingencia detectada tengan unos costes asociados y tengamos que gestionarlo con gerencia o dirección.

## Pasos para elaborar un plan de contingencia para el laboratorio:

- 1- Identifica los escenarios de riesgo.
- 2- Determina qué actividades críticas se van a ver afectadas.
- 3- Definir los objetivos del plan
- 4- Determina qué necesitas para que el laboratorio pueda continuar operando.
- 5- Selecciona al responsable de llevar a cabo el plan.
- 6- Establece las estrategias de protección antes del problema, las medidas de contingencia y mitigación necesarias después.
- 7- Respuesta al incidente: estabiliza la situación, elimina daños adicionales y problemas secundarios.
- 8- Considera dónde y cómo reanudarás operaciones lo antes posibles.

- 9- Haz simulacros y corrige errores para que funcione bien de ser necesario.
- 10- Revisa el plan periódicamente y ajústalo según sea necesario.
- 11- El centro debe tener una reserva económica para lidiar con posibles pérdidas.

## A continuación, se describen dos ejemplos simplificados de planes para contingencias del laboratorio.

### Ejemplo1:

- 1- Riesgo: rotura de un tubo de suministro de CO<sub>2</sub> de un incubador.
- 2- Los cultivos embrionarios que se estén realizando en este incubador podrían estar en peligro.
  - Si hay diferentes balsas y están interconectadas para que nunca pueda haber falta de suministro de gas, se puede perder todo el gas almacenado.
  - Si el suministro de gas del resto de incubadores está todo comunicado, no es individual, pueden estar en peligro todos los cultivos de todos los incubadores.
  - Si la fuga de gas está dentro del laboratorio, y no hay una adecuada ventilación del aire, y si no hay sensores ambientales de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> puede producir asfixia en el caso que alguien entrase en el laboratorio.
- 3- Objetivo: mantener las condiciones de cultivo adecuadas, sin poner en peligro la integridad de los embriones.
- 4- Necesitaríamos: Herramientas para eliminar la fuga. Gas para continuar ofreciendo suministro.
- 5- Cualquier embriólogo clínico del laboratorio debería poder solucionar este problema, ya que puede suceder en cualquier momento y su solución de debe aplicarse de inmediato.
- 6- Las estrategias:
  - Tener un control continuo monitorizado de las concentraciones de gases y con aviso telefónico las 24h de la concentración de los gases de los incubadores.
  - Tener siempre al menos una bala de cada tipo de gas que no esté conectada, de seguridad.
  - Fuera del horario laboral tener un embriólogo asignado, con posibilidad de acceso al centro y al laboratorio, al que avise el datalogger continuo y que acuda a solucionar el problema.
  - Sensores ambientales de niveles de CO<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub>.
- 7- Ante la detección de la fuga: del modo más rápido posible
  - 7.1. Eliminar la fuga
  - 7.2. En caso de que solo afectase a un incubador, trasladar los embriones a otro incubador.

# SESIÓN DE CALIDAD

Si afecta a todos los incubadores. Tener una bala de CO<sub>2</sub> de reserva que no esté conectada a la central de gases.

7.3. Conseguir de nuevo la concentración adecuada de gases del incubador/incubadores.

- 8- Una vez estabilizadas las concentraciones de gases. Reanudar los cultivos, si se valora adecuado, en su incubador inicial.
- 9- Anualmente se planifica un simulacro de fuga de gases.
- 10- Tras el simulacro, se valida de nuevo el plan o se modifica si se considera oportuno.
- 11- Hacer una valoración del coste "económico" que se hubiese podido producir ante la posible fuga, y porque se puede solucionar, en caso de no poderse solucionar la pérdida en los cultivos sería un problema de mayor envergadura.

## Ejemplo 2:

- 1- Riesgo: En el laboratorio solo hay un embriólogo y por fuerza mayor (accidente, enfermedad...) no puede acudir al laboratorio un día que hay dos punciones, un transfer y dos congelaciones.
- 2- No se podrán realizar las punciones, ni la transferencia, ni las congelaciones.
- 3- Objetivo: Que se pueda realizar la actividad del laboratorio y tratamientos.
- 4- Se necesita más de un embriólogo por laboratorio.
- 5- El responsable para evitar que esto suceda es la dirección del centro.

No haría falta describir los siguientes puntos, ya que se solucionaría con la acción descrita.

## Ejemplo 3:

- 1- Riesgo: por falta de organización se olvida inseminar unos ovocitos para FIV.
- 2- Hasta D+1 no se detecta el error, se plantea realizar un ICSI como intento de rescate, pero ese día por pauta del centro, ya se informa a los pacientes de la fecundación. Ante esta situación se debe informar a dirección del centro y tomar la resolución adecuada al error.
- 3- Objetivo: Que se realice la inseminación de los ovocitos en el momento adecuado.

Los siguientes puntos para evitar que esto nunca suceda es directamente en el punto 5: debe haber una organización del trabajo diario, con responsables de las tareas, con doble testigo en todas ellas. Debe estar protocolizado y descrito en el PNT correspondiente.

## PLAN DE CONTINGENCIA PARA RIESGOS O EMERGENCIAS EXTERNAS (DESASTRES O CATÁSTROFES)

Tal y como hemos descrito anteriormente, puede ser que, en un momento concreto, un centro se encuentre ante una situación de emergencia, esta podría deberse a un incendio, un desastre natural, inundación, epidemia... una situación infrecuente y que puede tener unas consecuencias muy graves. Por lo que es fundamental que se realice una adecuada gestión de calidad mediante la implementación de un plan de contingencia para poder conducir la situación, que el impacto sea mínimo y para agilizar la reanudación de la actividad en el menor tiempo posible.

Recordamos que un plan de contingencia forma parte un plan de emergencia y en este se debe intentar garantizar:

- La seguridad del personal y de los pacientes.
- La seguridad de los gametos, embriones y tejido tanto fresco como criopreservado.
- La seguridad de la información relativa a los ciclos de Fecundación in vitro/ criopreservación de material biológico y embriones.
- La seguridad de las instalaciones/equipos del laboratorio.

### Pasos para elaborar un plan de contingencia ante una emergencia externa:

1. Identificar y definir los escenarios de riesgo del centro.
2. Determinar las actividades críticas y prioritarias que se van a ver afectadas.
3. Definir los objetivos del plan.
4. Determinar qué necesitas para que el laboratorio pueda continuar operando y si no fuese posible, determinar procedimientos para asegurar la integridad de los gametos y embriones. Tener muy bien definida una hoja de ruta con las acciones a llevar a cabo:
  - 4.1. Emplear indicadores que marcarán el inicio del plan de contingencia.
  - 4.2. Secuencias de acciones que hay que llevar a cabo en el orden preciso.
  - 4.3. Indicadores que permiten considerar que la situación ha quedado normalizada.
5. Crear un equipo humano con responsabilidades asignadas y designar a un líder. Este equipo se encargará de ejecutar los procedimientos adecuados en el caso de que se produzca una situación crítica.
6. Establecer las estrategias de protección antes y después de la emergencia.



# SESIÓN DE CALIDAD

7. Determinación de los registros y documentación necesaria para dejar constancia por escrito de las acciones que se realizarán.
8. Considerar dónde y cómo se reanudará la actividad lo antes posibles.
9. Hacer simulacros y corrige errores para que funcione bien de ser necesario.
10. Revisar el plan periódicamente y modificarlo si fuese necesario.

Es importante tener presente que, en la elaboración de un plan de contingencia ante una emergencia, estamos hablando de que puede llegar a ser una situación grave, en la que puede peligrar la integridad física del centro y del laboratorio, por tanto, en el plan deben constar las acciones a realizar ante la posibilidad de tener que realizar un traslado de los gametos/embriones criopreservados a otro centro hasta que se pueda reanudar la actividad. Para ello, se deben realizar previamente, gestiones organizativas y plasmar mediante un contrato de colaboración con el otro centro por si sucediese una contingencia de esta magnitud.

## EJECUCIÓN Y FASES DEL PLAN

### Preparación: (Conocimientos)

Comprende documentar la amenaza existente y desarrollar los instrumentos para la adecuación y disponibilidad de recursos necesarios para responder.

Se deben seguir las recomendaciones de las autoridades gubernamentales y sanitarias competentes y de las sociedades científicas (SEF, ASEBIR, ESHRE, ASRM...).

Según haya sido la emergencia, en el caso de los recursos físicos se valorará y adecuará si fuese necesario la infraestructura del centro y laboratorio. Debe asegurarse el suministro continuo de electricidad, así como el suministro nitrógeno líquido a los bancos. Y en caso de que se requiriese equipos de protección individual (EPI)

En cuanto a recursos humanos se establecerá un plan de continuidad de la actividad implantando medidas con el objeto de velar por la seguridad de todos los miembros del equipo, teniendo presente la posibilidad de bajas del personal.

### Contención: (Reducción)

En caso de un problema de salud pública, comprende las acciones de identificación y respuesta a la introducción de la amenaza y los esfuerzos para contenerla y evitar su propagación de manera coordinada con otros sectores, incluye también medidas de prevención en la comunidad, individuales y colectivas.

### Mitigación: (Manejo)

Tras finalizar la etapa de contingencia e iniciarse la normalización de la situación, pero antes de la reapertura, el centro debe estar funcional y adaptado a la nueva situación. Se debe poner "a punto" el laboratorio, validando el correcto funcionamiento de los equipos, fundamentalmente los críticos, debe asegurarse el suministro de gases, medios y fungible para remprender el trabajo.

Un buen plan de contingencia permitirá retomar la actividad en un tiempo prudencial, en unos mínimos aceptables, antes que se produzcan pérdidas de consideración.

Es necesaria la obtención de datos de las acciones realizadas en durante el plan con el fin de actualizarse y mejorarse para incrementar su eficiencia en futuras ejecuciones.

**Ejemplo: Caso real: sábado 9 de enero de 2021, borrasca Filomena, Madrid.**

- 1- Riesgo: La llegada de una fuerte borrasca con aviso de alerta roja, deja una fuerte nevada, inmoviliza por completo la ciudad y no permite el acceso al centro en los siguientes días.
- 2- Los tratamientos pautados, punciones y transferencias no pueden realizarse por imposibilidad de acceso.  
Canceladas las entregas de pedidos: gases, nitrógeno líquido, medios...  
Cultivos embrionarios, valoración de fecundación, congelaciones, posibilidad de no poder valorar ni realizar.
- 3- Objetivo: Describir las pautas ante una situación de imposibilidad de acceso al centro.
- 4- Necesidades a cubrir:
  - a. Aviso a las pacientes de la cancelación de los tratamientos. Acceso remoto a la base de datos del centro.
  - b. Garantizar el suministro eléctrico al laboratorio.
  - c. Garantizar los niveles adecuados de nitrógeno líquido en los bancos.

# SESIÓN DE CALIDAD

d. Comprobar estado del laboratorio, suministro de gases y temperaturas. Control de equipos críticos: mediante sistema de control continuo 24h y aviso ante problemas.

En caso de no disponer, en caso de estar dentro de un hospital contactar con personal de mantenimiento para revisión del laboratorio.

- e. Terminar los cultivos en marcha congelando los embriones.
- 5- Dirección del centro junto con director del laboratorio, valoran la situación, ven necesidad de acudir al laboratorio por los cultivos en marcha y para garantizar la seguridad de los bancos; organizan el equipo de emergencia del laboratorio.
- 6- Turnos entre los embriólogos para acudir al laboratorio. Andando kilómetros a través de la nieve (dependiendo de la localización del centro hasta los transportes públicos que funcionaban); con riesgo de lesiones por caídas al resbalar con el hielo. Figura 2.
- 7- Todo quedo registrado
- 8- Reanudación de los ciclos a los 3-4 días cuando el transporte y movilidad ya funcionaba.

## DISCUSIÓN

Mediante la gestión completa de calidad en laboratorios de reproducción humana asistida debemos ofrecer a los pacientes, una garantía de calidad, tener un control continuo de todos procesos que realizamos, evaluándolos y aplicando pautas de mejora, para aumentar la eficacia y eficiencia, sin riesgos para la integridad de sus gametos y embriones. Por ello, es fundamental tener planes de contingencia tanto para las “pequeñas” contingencias que podamos tener en el laboratorio, como aquellas que están asociadas a una emergencia externa de gran magnitud, así cuando estos riesgos o contingencias no se puedan evitar, podremos continuar ofreciendo esa seguridad y garantía de calidad.

Concluyo, citando una frase muy cierta, de una excelente embrióloga “Todo lo que pueda pasar, nos pasará”.

## TABLAS Y FIGURAS

**Tabla I:** Áreas donde se pueden identificar factores de riesgo. Ampliación de las sugerencias de Mortimer and Mortimer (2015).

<b>RECURSOS HUMANOS</b>	Laboratorios con un único embriólogo.
	Personal insuficiente para la carga de trabajo habitual.
	Personal inexperto o mal capacitado.
	Exceso de trabajo, momentos puntuales.
<b>RECURSOS FÍSICOS</b>	Recursos insuficientes: sobrecarga incubadores, apertura neveras...
	Fallos/averías en equipos críticos: incubadores, bancos, neveras...
	Fallos/averías en equipos de los que solo tenemos una unidad.
	Averías o roturas en conductos suministro de gases: fugas
	Problema de suministro de gases, nitrógeno líquido.
	Problema de suministro de medios de cultivo y manipulación.
	Problema de suministro de fungible.
	Problemas informáticos, internet, caída de red interna del centro.
	Fallos/averías en el sistema de control continuo de parámetros (gases, temperaturas...) de equipos críticos.
	Cortes de energía. Problemas en la fuente de alimentación ininterrumpida, SAI, generador.
Uso de productos o equipos no aprobados, sin el marcado CE	
<b>ORGANIZACIÓN</b>	Falta de un doble testigo- Witness.
	Procedimientos normalizados de trabajo (PNT) incorrectos, no actualizados, inexistentes. Error en la realización de los procedimientos.
	Omisión de alguna tarea. Listado de tareas diarias y responsables.
	Cambios en los PNT sin autorización del director del laboratorio.
<b>GESTIÓN DE RIESGOS</b>	Documentación deficiente, Incompleta, registros imprecisos e incompletos
	Incidentes no reconocidos. Registro de todos los eventos adversos.

# SESIÓN DE CALIDAD

Figura 1: Plan de mejora continua

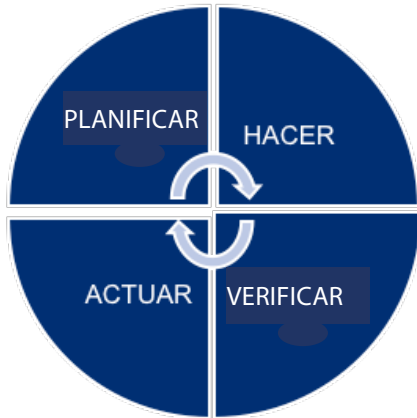


Figura 2: Acceso de una embrióloga al Hospital Universitario Quirónsalud Madrid, enero 2021, tras el paso de la borrasca Filomena.



## BIBLIOGRAFIA

Dickey RP, Lu PY, Sartor BM, Dunaway HE Jr, Pyrzak R, Klumpp AM. Steps taken to protect and rescue cryopreserved embryos during Hurricane Katrina. *Fertil Steril*. 2006 Sep; 86(3):732-4.

Hickman C, Rogers S, Huang G, MacArthur S, Meseguer M, Nogueira D, Portela R, Rienzi L, Sharp T, Ye H. Managing the IVF laboratory during a pandemic: international perspectives from laboratory managers. *Reprod Biomed Online*. 2020 Aug; 41(2):141-150.

Mortimer ST and Mortimer D. *Quality and risk management in the IVF laboratory*. Second Edition. 2015. Cambridge University Press.

Norma UNE 179007:2013. *Sistema de gestión de la calidad para laboratorios de reproducción asistida*. AENOR 2013.

Norma UNE-EN ISO 9001:2015: *Sistemas de gestión de la calidad*. AENOR 2015.

Norma ISO 22301:2019: *Sistemas de la gestión y continuidad de negocio*. 2019

Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. *Guidelines for development of an emergency plan for in vitro fertilization programs*. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5 Suppl): S131-3.

Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. *Recommendations for development of an emergency plan for in vitro fertilization programs: a committee opinion*. *Fertil Steril*. 2012 Jul; 98(1):e3-5.

## ACTUALIZACIÓN DE LOS RECURSOS HUMANO, RECURSOS FÍSICOS Y GESTIÓN DE LA CALIDAD EN EL LABORATORIO

**C. Olmedo<sup>1</sup>, E. Veiga<sup>2</sup>, E. Ferrer<sup>3</sup>, M. Fernández<sup>4</sup>, A. Mauri<sup>5</sup>, L. Sánchez<sup>6</sup>, N. Ortiz<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Hospital General Universitario de Valencia, Unidad de Medicina Reproductiva, Valencia, España.

<sup>2</sup>Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Servicio Gallego de Salud. Travesía da Choupana- s/n. 15706 Santiago de Compostela- España., Laboratorio Central/Unidad de Reproducción Humana Asistida, Santiago de Compostela, España.

<sup>3</sup>CREA. Centro Médico de Reproducción Asistida, Laboratorio de embriología, Valencia, España.

<sup>4</sup>Clínica Ergo, Laboratorio de embriología, Gijón, España.

<sup>5</sup>Procrear, Laboratorio de embriología, Reus, España.

<sup>6</sup>Hospital Universitario Central de Asturias, Unidad de Reproducción Asistida, Oviedo, España.

<sup>7</sup>Instituto Europeo de Fertilidad, Unidad de Reproducción Asistida, Madrid, España.

carla.olmedo@gmail.com / 685 904 093

### INTRODUCCIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

Es indudable que desde que se publicó la edición anterior del cuaderno ASEBIR de recursos humanos y físicos en 2008, hemos experimentado muchos cambios en las unidades de reproducción humana asistida. No tanto como nos gustaría en algunos aspectos, sobre todo a nivel profesional, pero sí en lo que respecta a los laboratorios, sus técnicas y la labor administrativa que requieren las técnicas de reproducción de hoy.

Los recursos humanos (RRHH), son uno de los temas más importantes y que menos han evolucionado en cuantía en los laboratorios de reproducción. Desde hace años se ha mantenido la cantidad de 150 ciclos año/embriólogo sin que se haya recalculado conforme a las necesidades actuales. Por ello, los objetivos que nos planteamos fueron la actualización, tan necesaria, del cuaderno ASEBIR de recursos humanos y físicos (RRFF), y la creación de una calculadora online de RRHH para los laboratorios a pesar de la dificultad de su estimación.

Para ello formamos un grupo de trabajo dentro del Grupo de Interés de Calidad (G.I.C) de ASEBIR de siete embriólogos clínicos con experiencia de más de 6 años en reproducción humana asistida, cuatro integrantes de centros privados y tres de centros públicos. El trabajo consistió en una revisión exhaustiva de toda la bibliografía disponible tanto nacional como internacional para crear un documento actualizado y completo que incluyese todos los temas de interés para un centro de reproducción. Para ello realizamos una comparativa de todas las guidelines disponibles nacionales e internacionales con la edición previa del cuaderno ASEBIR para ver todos aquellos aspectos que no se habían incluido en la edición pasada y que consideramos importantes.

El grupo tuvo su primera reunión en abril de 2019 y concluyó el trabajo con su reunión número 40 en agosto de 2020. A partir de este momento se inició el proceso de revisión.

Para realizar la calculadora también se revisó la bibliografía existente donde se analizó el número de embriólogos necesarios para cada laboratorio en base a su carga asistencial y a las técnicas realizadas.

### RESULTADOS

El cuaderno de RRHH y RRFF de 2008 estaba estructurado en 3 bloques:

- Un primer bloque de organización general, donde se incluyó la gestión de calidad, la ética e investigación, la seguridad y los riesgos laborales.
- En un segundo bloque se trató el tema de los RRHH hablando de las distintas figuras integrantes de una URHA.
- Y por último un tercer bloque dedicado a los RRFF donde se hablaba de los distintos espacios que conforman una URHA, así como el manejo de los medios de cultivo. Además, en los anexos se podía encontrar información adicional sobre RRHH, técnicas de reproducción asistida de pacientes infecciosos y plan de formación para nuevo personal.

La nueva edición del cuaderno se amplió y estructuró en cuatro bloques para dar cabida a todos los temas relacionados con la calidad y tratarlos ampliamente. El nuevo cuaderno queda estructurado de la siguiente forma:

- Bloque 1 Organización general - Bloque 2 RRHH.
- Bloque 3 RRFF - Bloque 4 Calidad.

# SESIÓN DE CALIDAD

En el bloque 1, Organización general, incluimos un resumen con todo lo que necesitamos saber para crear una unidad de reproducción humana asistida ajustándose a las recomendaciones existentes en la bibliografía. Además, se incluyeron los requerimientos mínimos acordados al Real Decreto 413/1996 y Real Decreto RD 1277/2003 y 9/2014.

En el bloque 2, RRHH, se describieron las responsabilidades y competencias de cada una de las figuras integrantes de un equipo en el laboratorio de RHA, que se citan a continuación:

- Director del laboratorio - Coordinador del laboratorio
- Embriólogo - Otro personal de apoyo

A pesar de que nuestra profesión, en la actualidad, se encuentra en un limbo administrativo hemos de trabajar para que los embriólogos tengan la formación necesaria para desarrollar su actividad. Para ello se ha incluido un capítulo que trata la formación, experiencia y certificación de ese mismo personal y de la importancia que tiene la acreditación continuada para nuestra profesión.

Estimar el número de profesionales que necesitamos en cada centro es una tarea difícil que podría ser resuelta gracias a la herramienta de cálculo de RRHH que hemos creado y que fue presentada en el pasado congreso de la ESHRE de 2021. La calculadora de recursos humanos, de nombre CassandRA, es una plataforma online con la que se pretende ayudar a los laboratorios, sea cual sea su volumen de trabajo, a realizar una estimación del personal que necesitarían para desarrollar su actividad de forma segura. Basa sus cálculos en los tiempos requeridos para llevar a cabo los distintos procedimientos del laboratorio de andrología, embriología, criobiología y los controles de calidad necesarios para el desarrollo de los mismos. Además, tiene en cuenta el convenio laboral, público o privado, horas destinadas a formación del personal y periodos de vacaciones o de descanso diarios.

En el bloque 3, RRF, se incluye el diseño de los diferentes espacios que integra una unidad de reproducción humana asistida, no sólo el laboratorio.

Hemos incluido un capítulo de ambiente y calidad del aire. Este tema ha experimentado recientes cambios debido a la publicación de la nueva norma UNE171340:2020 de validación y cualificación de salas de ambiente controlado y que tal y como se refleja en la misma aplica para laboratorios de RHA.

Y para finalizar el capítulo damos un repaso al manejo de los medios de cultivo y los aspectos a tener en cuenta como son el transporte y almacenamiento de los mismos, la preparación, manejo y la trazabilidad y el marcado CE que también ha experimentado recientemente importantes cambios.

Por último, el bloque 4, de Calidad, es uno de los bloques más completos e importantes. La calidad en nuestro campo es uno de los aspectos que más ha mejorado en los últimos años y por ello hemos querido dedicarle un bloque completo en esta edición.

Empezando por la gestión de la calidad y el empleo de indicadores como herramienta de mejora continua, continuamos con un capítulo para orientar en cómo realizar un Procedimiento Normalizado de Trabajo para el laboratorio, otro capítulo de suma importancia es el de la identificación y trazabilidad de nuestros pacientes y también la seguridad y evaluación del riesgo. Hemos añadido un capítulo de mantenimiento, limpieza y gestión de los residuos que tanta importancia ha cobrado durante la pandemia. La comunicación con el paciente, los registros de datos donde incluimos el registro SEF y el SIRHA y para finalizar un capítulo dedicado a la investigación, ética y buenas prácticas.

## DISCUSIÓN

El laboratorio de reproducción humana asistida, dada la rápida innovación en nuestro campo, está sometido a un proceso de mejora continua de la calidad. Por ello, las recomendaciones deben ser revisadas de manera periódica para adaptarse a los avances tecnológicos y legales. Con la publicación de esta revisión pretendemos crear un modelo con el que nuestros socios puedan implantar en sus centros protocolos de trabajo estandarizados, tan importantes para el desarrollo de nuestra actividad.

Con la ayuda de la calculadora de RRHH online, CassandRA, se podrá estimar de forma individualizada el personal óptimo para cada laboratorio, lo que ayudará a trabajar de forma segura, garantizar la continuidad y el correcto funcionamiento del mismo.

## AGRADECIMIENTOS

Al comité científico organizador del congreso por proponer esta comunicación.

A los miembros del grupo de trabajo de la edición previa de este cuaderno, pues ellos fueron los pioneros y abrieron camino al crear un documento de estas características y a la necesidad de seguir mejorándolo con el paso del tiempo.

A nuestra presidenta del G.I.C Miriam Iglesias por su apoyo en este camino largo y junto a Luis Martínez y Marisa López su revisión estival en tiempo récord.

A Abel Gallo y a Espira tecnologías (Alicante, España) por ayudarnos a convertir a CassandRA en una realidad.

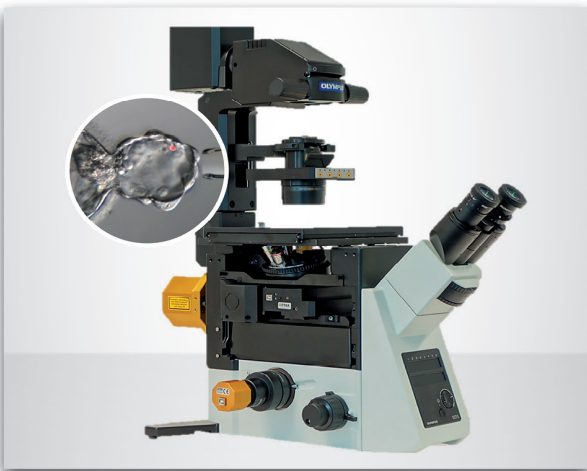
## GAS IN-LINE



Elimina COV's y partículas antes de entrar en el incubador.



## OCTAX NAVILASE



Para un perfecto control de la biopsia embrionaria con una mayor facilidad y eficacia.

Un nuevo láser con tecnología específica para PGS y DGP.



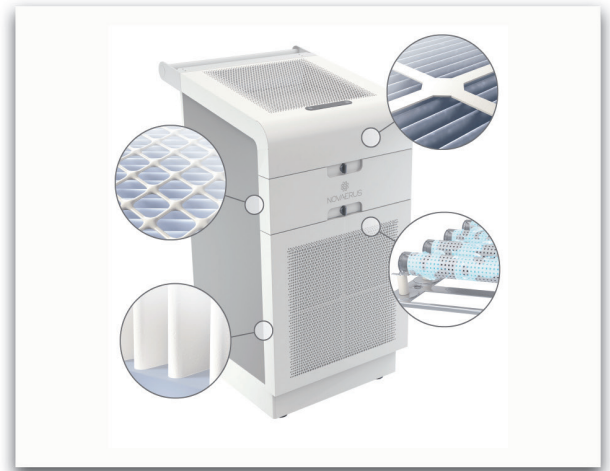
## CABINA FLUJO LAMINAR VERTICAL TERMOSTATIZADA



Con fuentes de iluminación OCC (tipo Hoffman).



## DEFEND 1050



El Defend 1050 y su tecnología NanoStrike® patentada por NOVAERUS es la solución más eficaz, rápida y segura para la desinfección y purificación continua del aire en Laboratorios de FIV.



## EMBRYOGLUE



Medio de transferencia más documentado que incrementa la tasa de nacido vivo.

**Vitrolife** 

## AGUJAS ASPIRACIÓN FOLICULAR VITROLIFE



Diseñadas para la recuperación ovocitaria. Optimizando el tiempo, el control en la aspiración y mejorando el confort de la paciente.

**Vitrolife** 

## LABWARE VITROLIFE



Para mejorar las condiciones de cultivo de los embriones. Con marcaje CE para IVF.

**Vitrolife** 

## MICROPIPETAS VITROLIFE



Micropipetas de alta precisión. Toda gama de tipos y angulaciones.

**Vitrolife** 



**COMUNICACIONES  
ORALES**



## ASSISTED HATCHING EN EMBRIONES CRIOPRESERVADOS. ESTUDIO PROSPECTIVO, RANDOMIZADO Y CON DOBLE CIEGO

**V. Montalvo Pallès, A. Farreras Ayestaran, J. Massó Hernández, A. García-Faura Cirera, B. Marquès López-Teijón, M. López-Teijón Pérez.**

Institut Marquès - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La vitrificación ha demostrado ser la técnica más eficiente para crioconservar embriones. Sin embargo, el proceso de vitrificación tiene consecuencias para los embriones, un ejemplo es el aumento de rigidez de la zona pelúcida (ZP). Es por este motivo que múltiples grupos han valorado la necesidad de perforar la ZP para facilitar la salida del embrión. No obstante, hay gran disparidad en los tamaños de los agujeros realizados y en el diseño de los estudios.

### OBJETIVO:

Determinar si el Assisted Hatching (AH) ayuda a mejorar las tasas de éxito en los tratamientos de criotransferencia y establecer si existe alguna diferencia entre los diferentes tipos de AH.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio prospectivo randomizado realizado en dos fases: la primera, entre octubre de 2019 y enero de 2020 para valorar el efecto de la perforación de 1/4 de la ZP; y la segunda fase, desde enero de 2021 a la actualidad, para valorar el efecto de 3 tipos diferentes de AH; 1/4 de la ZP (AHG), 10-15  $\mu\text{m}$  (AHP), y ZP thinning (AHT).

En ambas fases se realizó una randomización para decidir a qué embriones se realizaría el AH y que tipo. Ni el ginecólogo ni el embriólogo que realizaron la transferencia sabían si al embrión transferido se le había realizado AH. Se descartaron del estudio esos embriones con Hatching natural, embriones derivados del programa de PGT y esos embriones que después de la desvitrificación estaban completamente expandidos (trofoectodermo en contacto con la ZP).

Para realizar el AH se utilizaron disparos Laser (Hamilton Thorne) con el objetivo de perforar la ZP lejos de la MCI y sin dañar el trofoectodermo.

En la fase 1 entraron 353 criotransferencias de un único embrión, 71 fueron excluidos por expansión, 65 excluidos por PGT,

a 103 se les realizó el AH (AH+) y a 114 no se les realizó ninguna intervención (AH-).

En la fase 2 se incluyeron 122 criotransferencias de un único embrión, 34 fueron excluidos por expansión, 44 excluidos por PGT, y 44 entraron en la randomización; a 10 se les realizó el AH pequeño, a 14 se les realizó el AH grande, a 8 se les realizó el Zona thinning y a 12 no se les realizó ninguna intervención.

### RESULTADOS:

En la fase 1 no se encontraron diferencias entre grupos en la edad del ovocito, edad paterna, calidad embrionaria, ni grosor endometrial ( $p > 0,05$ ). Se evaluaron todos los parámetros clínicos relacionados con el éxito de los tratamientos de FIV. Las tasas de implantación y de aborto fueron equivalentes entre el grupo AH- (47,4%; 18,5%) y el grupo AH+ (40,9%; 20,5%).

Como resultado principal de la primera fase se evaluó la tasa de nacido vivo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (AH- = 38,6%; AH+ = 30,1%;  $p = 0,221$ ).

Los resultados preliminares de la fase 2 no muestran diferencias significativas en las tasas de implantación (AHG = 21,4%; AHP = 50,0%; AHT = 62,5%; Grupo control = 25,0%;  $p = 0,244$ )

### CONCLUSIONES:

En la primera fase del estudio no encontramos ninguna mejora en las tasas de éxito cuando se realizaba un agujero al 25% de la ZP sobre embriones previamente vitrificados. Estos resultados, aunque preliminares, parecen apuntar a que facilitar la salida de la ZP en embriones vitrificados no afecta los resultados clínicos. Decidimos realizar una segunda fase para ampliar los resultados y evaluar el efecto de diferentes tipos de AH. Con los resultados preliminares no encontramos mejoría en las tasas de éxito con ningún de los tres tipos de AH realizados.

En conclusión, necesitamos más datos para evaluar si algún tipo de AH ofrece alguna mejora sobre las tasas de éxito clínico.

## IMPACTO DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN LA SUPERVIVENCIA DE OVOCITOS VITRIFICADOS

**M. Poveda García (1), A. Aragonés Esteve (1), S. Sánchez Macho (2), R. López Sánchez (1), E. Moya Gutiérrez (1), JM. Moreno García (1), R. Núñez Calonge (3), JJ. López Gálvez (1)**

(1) Unidad de Reproducción Clínica Vistahermosa - Alicante (Alicante), (2) Unidad de Reproducción Montpellier - Zaragoza (Zaragoza), (3) Unidad de Reproducción Clínica Moncloa - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

La utilización de ovocitos vitrificados de donante es una técnica cada vez más utilizada en los laboratorios de embriología. Tener un banco de ovocitos propio ofrece seguridad en los programas de donación de ovocitos ya que permite disponer de un número determinado de ovocitos maduros de donante, evitando así las posibles cancelaciones del ciclo de las receptoras por no obtener ovocitos maduros tras la punción.

A pesar de que la vitrificación de ovocitos es una técnica eficaz, pueden existir factores que afectan a la tasa de supervivencia del ovocito.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es evaluar si existe alguna relación entre la tasa de supervivencia ovocitaria tras la vitrificación en donantes de ovocitos y las características del ciclo de estimulación.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio retrospectivo de 128 ciclos de donación de ovocitos en los que se vitrificaron y desvitrificaron ovocitos entre 2018 y 2019. En todos estos ciclos se utilizaron protocolos de estimulación con antagonistas de la GnRH y FSH recombinante y se desencadenó la ovulación con agonistas de la GnRH con el fin de evitar el riesgo de hiperestimulación de la donante.

Para la vitrificación/desvitrificación de ovocitos se utilizaron los medios de Kitazato® con soporte Cryotop®.

Considerando la Tasa de supervivencia (TS) post desvitrificación deseable del 80% (ASEBIR), los ciclos se clasificaron en 2 grupos: TS inferior al 80% y TS  $\geq$  80%.

En ambos grupos, se comparó: la edad media, media de días de estimulación, dosis media de FSH utilizada, media de ovocitos recuperados, media de MII y media de ovocitos desvitrificados por ciclo.

Se utilizó el test de U de Man Whitney al no presentar los datos una distribución normal.

### RESULTADOS:

En los resultados obtenidos en este estudio, no se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos respecto a la edad, ovocitos recuperados y madurez ovocitaria. Sin embargo, los días de estímulo, la dosis de FSHr utilizada y la media de ovocitos desvitrificados por ciclo son significativamente más altas en aquellos ciclos con TS < 80%.

### CONCLUSIONES:

A pesar de que no hay diferencias en la media de ovocitos recuperados entre los dos grupos, la tasa de supervivencia post desvitrificación es mayor cuando se emplea menos dosis de FSH y menos días de estimulación.

Habría que valorar si en aquellas donantes que se necesita más estímulo, es conveniente o no vitrificar ovocitos, ya que la eficiencia de la técnica es menor.

DONANTES			
	TS <80%	TS >80%	sig.*
ciclos	50	78	
Edad media de las donantes	25,2	25,38	0,769
Días estímulo	11,08	10,51	0,03
Dosis FSH media	3083	2626	0,000
Media de ovocitos recuperados	20,1	20,29	0,841
Media ovocitos MII	17,12	17,32	0,642
Tasa de madurez ovocitaria	85,7%	86,6%	0,786
Media ovocitos desv por ciclo	9,02	7,72	0,001

\*Se utiliza el test de U de Man Whitney al no presentar los datos una distribución normal

## CRYOTOP VS CRYOLOCK: ¿UN CAMBIO DE SOPORTE IMPLICA UN CAMBIO EN LAS TASAS?

**A. García Sifre, L Ortega López, Y Galiana Briones, A Bosch Villegas, J Aizpurua.**  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

En los últimos años, la vitrificación se ha convertido en la técnica de referencia para la crioconservación de ovocitos. Esta técnica, reporta unas tasas de éxito comparables al uso de ovocitos en fresco, lo que ha supuesto un aumento gradual de esta estrategia tanto por su valor en bancos de ovocitos como para su uso en pacientes que desean preservar la fertilidad.

El alcance de la técnica, ha conllevado la aparición de una gran variedad de soportes de vitrificación en el mercado. Muchos son los sistemas que se han ido incorporando a la práctica clínica en los últimos tiempos y consideramos necesario realizar la validación de los mismos dentro de nuestro propio laboratorio.

### OBJETIVO:

El objetivo del estudio es evaluar diferentes indicadores de éxito en el laboratorio como son la supervivencia ovocitaria, la tasa de fecundación, el rendimiento del ciclo y la tasa de euploidia tras utilizar dos soportes diferentes para la vitrificación de ovocitos de donante, en este caso Cryotop (CT) y Cryolock (CL).

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo que incluye un total de 27 pacientes de ovodonación, los 27 ciclos se realizaron entre octubre de 2020 y enero de 2021. A cada uno de los ciclos, se le asignaron ovocitos de donante vitrificados en ambos soportes (CT y CL) procedentes de la misma cohorte.

El proceso de vitrificación se realizó 2 horas post-punción. Los ovocitos se distribuyeron en dos grupos equitativos de manera aleatoria, se vitrificaron siguiendo el mismo protocolo a excepción del dispositivo empleado, siendo unos vitrificados en CT y otros en CL.

De un total de 374 ovocitos utilizados, 203 se habían vitrificado en CT y 171 en CL. La microinyección de los ovocitos se llevó a cabo 2 horas después de la desvitrificación. La comparativa entre las tasas de no-supervivencia tras desvitrificación, fecundación, degeneración post-ICSI llegada a blasto en día 5-6 de desarrollo, blasto útil y euploidia se presenta en el siguiente estudio.

### RESULTADOS:

Al comparar los resultados obtenidos, no se observan diferencias significativas entre ambos soportes en la no-supervivencia de los ovocitos tras su desvitrificación (7,4% CT vs 6,4%CL;  $P=0,717$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación (80,9% CT vs 75% CL) y degeneración post-ICSI (9,6% CT vs 11,9% CL) ( $P=0,605$ ).

El rendimiento del ciclo también fue analizado para ambos grupos de estudio (CT y CL) y se observó que la tasa de llegada a blasto no muestra diferencias significativas ( $P=0,773$ ) siendo 58,6% para CT y 60,3% para CL. Tampoco se ven diferencias significativas en la tasa de blasto útil 44,1% CT y 54,2% CL ( $P=0,098$ ).

En 10 de los 27 ciclos incluidos en el estudio se realizó análisis genético preimplantacional (PGT) a los blastos útiles obtenidos entre día 5y 6. Un total de 59 embriones fueron analizados. Las tasas de euploidia obtenidas no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (75% CT vs 81,5% CL  $P=0,550$ ).

### CONCLUSIONES:

En vista de los resultados obtenidos, al realizar la comparativa entre CT y CL, podemos decir que el tipo de soporte utilizado para la vitrificación ovocitaria no influye en las tasas de supervivencia, fecundación ni degeneración post-ICSI así como tampoco en el desarrollo embrionario. Por lo tanto, la elección de un soporte u otro no influirá en las tasas de éxito del laboratorio de reproducción humana asistida.

## IMPACTO DE LOS PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y DE DESARROLLO EMBRIONARIO SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN CON BLASTOCISTOS VITRIFICADOS

E. Sánchez Chiva, P. Campos Lozano, A. Coello Perles, MJ. De los Santos Molina, A. Cobo Cabal.

IVI Valencia - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

La necesidad de disponer de parámetros morfológicos que nos sirvan como herramienta en el laboratorio para seleccionar los embriones con mayor probabilidad de éxito tras la vitrificación, nos lleva a estudiar e identificar características predictivas de supervivencia e implantación en ciclos con blastocistos vitrificados/desvitrificados.

### OBJETIVO:

Evaluar la morfología embrionaria y día de desarrollo pre-vitrificación y su relación con las tasas de supervivencia e implantación con el fin de identificar parámetros predictivos de éxito.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo que incluyó 11936 blastocistos vitrificados-desvitrificados entre 2017-2018. Se excluyeron ciclos de PGT-A. Los parámetros pre-vitrificación analizados fueron: i) día de vitrificación (5 vs.6); ii) grado de expansión: Blastocisto cavitado (BC), expandido (BE) y eclosionando (Blastocisto hatching) (BHi); iii) calidad del trofoectodermo (TE) (categoría A, B y C); iv) calidad de la masa celular interna (MCI) (categorías A, B y C) según ASEBIR; y v) origen ovocitario (ovocitos de donante/ovocitos propios). Para el análisis se utilizó una regresión logística mostrando las Odds ratio (OR) con intervalo de confianza (IC) del 95%, ( $P < 0.05$ ).

### RESULTADOS:

El grado de expansión fue la variable más predictiva de supervivencia: La OR se duplicó en blastocistos BC respecto a los BHi (1,94; IC del 95%:1,41–2,67;  $P < 0,001$ ). Además, aumentó en los blastocistos vitrificados en día 5 vs día 6 (1,72; IC 95%:1,43–2,06;  $P < 0,001$ ) y disminuyó en blastocistos con trofoectodermo de categoría C (0,76; IC 95%:0,63–0,93;  $P < 0,01$ ; C vs A). La probabilidad de implantación aumentó en los blastocistos con trofoectodermo tipo A respecto a los de trofoectodermo de categoría C (2,00; IC 95%:1,73–2,33;  $P < 0,001$ ), y se redujo a la mitad en los blastocistos vitrificados en día 6 (0,49; IC 95%:0,44–0,55;  $P < 0,001$ ). También se incrementó en los BHi respecto a los BC (1,62; IC95%:1,40–1,876;  $P < 0,001$ ) y por la presencia de MCI de categoría tipo A (1,37; IC95%:1,16–1,63;  $P < 0,001$ ).

### CONCLUSIONES:

Los blastocistos vitrificados en día 5 con TE de mejor calidad deben ser seleccionados con prioridad para su desvitrificación. El grado de expansión pre- vitrificación está estrechamente relacionado con el éxito.

## LA CONGELACIÓN DE SEMEN NO AFECTA LA TASA DE NACIDO VIVO EN PACIENTES NORMOZOOSPÉRMICOS: RESULTADOS DE 6.594 CICLOS DE ICSI

M. Torra Massana, M. Tutusaus Arenas, D. García García, R. Vassena, A. Rodríguez Aranda.

Clínica Eugén - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La congelación lenta de semen es un procedimiento común en las clínicas de fertilidad. Una vez descongelados, los espermatozoides suelen presentar menor movilidad y vitalidad, aunque estas características generalmente se consideran adecuadas para la inseminación mediante ICSI. Sin embargo, la mayoría de los estudios que comparan los resultados reproductivos de ciclos con semen fresco o congelado incluyen pacientes con oligo- y/o astenozoospermia y, en estos casos, la calidad alterada de la muestra puede enmascarar parcialmente el efecto de la congelación de semen.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es determinar si los ciclos de ICSI utilizando semen fresco o congelado de pacientes normozoospermicos (en ausencia de un aparente factor masculino) resultan en tasas de fecundación, embarazo y nacido vivo similares.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo (2011-2019) que incluye 6.594 ciclos de ICSI electivo con semen normozoospermico de pareja (fresco o congelado). Se definieron 4 grupos de estudio: semen fresco con ovocitos de pareja (SFOP, n=1.878), semen congelado con ovocitos de pareja (SCOP, n=142), semen fresco con ovocitos de donante (SFOD, n=2.413), y semen congelado con ovocitos de donante (SFOD, n=2.161). Se realizó transferencia embrionaria en fresco en todos los ciclos, en estadio de células o de blastocisto. Para la congelación lenta de semen se utilizó el medio crioprotector GM501 SpermStore (Gynemed, Lensahn). El lavado seminal, capacitación y selección espermática se realizaron de la misma manera para muestras frescas y congeladas, utilizando pellet swim-up en medio IVF® (Vitrolife, Göteborg). Las tasas de fecundación, embarazo (bioquímico, clínico, y en curso) y nacido vivo fueron comparadas entre los pares de grupos de estudio mediante las pruebas Chi2 y T de Student. Los resultados con un valor  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### RESULTADOS:

Las medias de edad (masculina y femenina), concentración y movilidad espermática post-eyaculado y número de ovocitos inseminados fueron similares entre los grupos de estudio comparados (SFOP vs SCOP, SFOD vs SCOD). Como era de esperar, los ciclos de donación de ovocitos tuvieron una tasa de nacido vivo superior a la de los ciclos con ovocitos de pareja (30.0% vs 18.2%,  $p < 0.001$ ). En ciclos con ovocitos de pareja, al comparar semen fresco y congelado, no se observaron diferencias significativas en las tasas de fecundación, embarazo y nacido vivo ( $p > 0.05$  en todos los casos). Sin embargo, en ciclos con ovocitos de donante, la tasa de fecundación tras ICSI con semen congelado ( $73.6\% \pm 19.6\%$ ) fue más baja que la tasa de fecundación obtenida con semen fresco ( $75.1\% \pm 19.2\%$ ),  $p = 0.010$ . Del mismo modo, en ciclos con ovocitos de donante, la tasa de embarazo bioquímico fue significativamente más baja cuando se usó semen congelado (48.5% para SCOD vs. 52.3% para SFOD,  $p = 0.009$ ), aunque las tasas de embarazo clínico, en curso y nacido vivo fueron similares entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). En ciclos con ovocitos de donante, un subanálisis incluyendo solamente los ciclos de ICSI con transferencia en estadio de blastocisto (n=1.187 para SFOD, n=337 para SCOD) confirmó que la tasa de nacido es comparable entre semen fresco y congelado (34.7% vs 35.6% respectivamente,  $p = 0.76$ ), sin diferencias tampoco en las tasas de embarazo ( $p > 0.05$  en todos los casos).

### CONCLUSIONES:

La criopreservación de semen mediante congelación lenta no afecta las tasas de embarazo ni nacido vivo en pacientes normozoospermicos, aunque podría reducir levemente la tasa de fecundación tras ICSI. En línea con estudios previos que incluyen pacientes con factor masculino, nuestros resultados muestran que la congelación de semen es un procedimiento seguro y eficaz.

## EVALUACIÓN DE LA DEMANDA TEÓRICA Y REAL DE CRIOPRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD FEMENINA (CPF) EN UN SISTEMA PÚBLICO: LA NECESIDAD DE CONCIENCIAR A LOS PROFESIONALES.

**MJ. Lupiáñez Giner, A. Clavero Gilabert, MC. Gonzalvo López, S. Rodríguez Guirado, E. Fernández Sierra, A. Sola Leyva.**

Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada)

### INTRODUCCIÓN:

El Sistema Sanitario Público de nuestra comunidad incluyó en su cartera de servicios la CPF en 2009, designando nuestra Unidad de Reproducción como centro de referencia. En 2013, para aumentar la accesibilidad al programa, se estableció que se realizara en todas las provincias de nuestra comunidad.

### OBJETIVO:

Analizar la demanda teórica y real de la técnica de CPF en nuestra comunidad, para así evaluar la accesibilidad de los usuarios a la misma.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Los datos de demanda real se extrajeron de la base de datos de la Unidad. Se estimó la demanda teórica de CPF por parte de mujeres con cáncer de mama en 2013 (cuando había un único centro de referencia) y en 2019 (en todas las provincias de nuestra comunidad). Se partió del número de mujeres con cáncer de mama facilitado por el Observatorio de la AECC. También se tuvo en cuenta que 1 de cada 5 cánceres de mama tiene lugar en mujeres menores de 45 años y que según el INE 2018 un 80% de las mujeres españolas sin hijos desearán tener hijos en el futuro.

### RESULTADOS:

La demanda observada de esta técnica para mujeres con cáncer de mama en nuestro centro ha tenido diferentes etapas. Una etapa inicial de tres años de demanda estable y consolidación (2009-2011), con una media de 6.6 ciclos de CPF. A continuación, dos años con la máxima actividad, debido a que nuestra Unidad es nombrada centro de referencia para CPF (2012-2013), con una media de 11.5 ciclos por año. Y por último, un descenso tras la publicación a finales de 2013 de una

nueva edición de la Guía del SAS de TRHA en la que se facilita el acceso a esta técnica, autorizando su realización en todas las provincias, con una media de 5.8 ciclos (2014-2019). En cuanto a la demanda observada respecto a la esperada de CPF para cáncer de mama vimos que en el año 2013 en nuestra comunidad hubo una demanda de 1.3%, inferior a la encontrada en el año 2019 en nuestra provincia (4%). La incidencia de cáncer de mama en 2013 en nuestra comunidad fue de 5135 mujeres (1027 en edad reproductiva) frente a las 625 que hubo en nuestra provincia en 2019 (125 en edad reproductiva), de estas mujeres 821 y 100 respectivamente tendrían deseos reproductivos, de las cuales demandan la CPF 11 mujeres en el año 2013 y 4 mujeres en el 2019.

### CONCLUSIONES:

La demanda encontrada de CPF por cáncer de mama está muy alejada de la demanda teórica, ya sea durante el periodo como centro de referencia de nuestra comunidad (1,3%) o solo provincial (4%). Aunque se observa una mejoría no significativa, el porcentaje de demanda observada estaba muy alejado del esperado. Esto nos hace pensar que la proximidad geográfica al centro no parece ser el factor determinante de la escasa demanda de esta técnica. Estos datos apuntan a que muchas de estas mujeres no son bien informadas y/o aconsejadas por sus respectivos médicos, a que muchas de ellas tras ser informadas deciden no retrasar su tratamiento gonadotóxico porque pueden ver peligrar su salud, entre otras. Los resultados de la CPF demuestran su viabilidad y utilidad tras 10 años de funcionamiento. Por tanto, deben ser accesibles a las mujeres que van a recibir tratamientos gonadotóxicos en edad reproductiva. Es necesario concienciar a profesionales y pacientes de la existencia de estos programas y de sus características, con el objeto de aumentar su utilización, ya que en el año 2019 un 96% de las mujeres con deseos reproductivos no acudieron a solicitar la CPF.

## ALGORITMO KIDSCORED5™ V3 COMO HERRAMIENTA DE APOYO A LA DECISIÓN DE LOS EMBRIÓLOGOS: ASOCIACIÓN CON RIESGO DE ANEUPLOIDÍA Y POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN

A. Galán Rivas, L. Bori Arnal, F. Meseguer Estornell, MA. Valera Cerdá, L. Alegre Ferri, M. Meseguer Escrivá.  
IVIRMA Valencia - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

La tecnología time-lapse ha permitido desarrollar algoritmos de selección embrionaria basados en parámetros morfológicos y morfocinéticos. Los sistemas EmbryoScope (Vitrolife) incluyen un método de selección (KIDScoreD5™) que clasifica los blastocistos según su potencial de implantación. El algoritmo KIDScoreD5 versión 3 (KIDScoreD5v3) considera la regularidad de las divisiones embrionarias, la velocidad de desarrollo y la morfología del blastocisto. Se diseñó con un conjunto de datos multicéntrico utilizando más de 5.000 embriones de implantación conocida (KID) y su uso se recomienda para embriones originados por tratamientos convencionales de FIV o ICSI e incubados en condiciones de oxígeno reducido (4-6%).

### OBJETIVO:

Analizar tanto la correlación del algoritmo KIDScoreD5 v3 con la ploidía, como su capacidad para clasificar embriones según su potencial de implantación, garantizando el uso de esta puntuación como herramienta de apoyo a la decisión de los embriólogos.

### MATERIAL Y MÉTODO:

La puntuación KIDScore se calculó utilizando la estación de trabajo EmbryoViewer tras la anotación automática supervisada de los parámetros necesarios (t2, t3, t4, t5, tB, calidad de la masa celular interna y calidad del trofotodermo). Finalmente, se genera una puntuación lineal para cada embrión que oscila entre 1 y 9,9, de menor a mayor probabilidad de implantación. Se comparó la puntuación de 14.603 embriones con la calidad morfológica ASEBIR asignada por embriólogos senior, con el resultado del test genético de preimplantación para aneuploidías (PGT-A) en 1937 embriones biopsiados en día 5/6 y analizados con secuenciación de nueva generación (NGS), y con los resultados clínicos posteriores de 1.952 transferencias de blastocistos individuales. Además, cuantificamos la contribución del algoritmo al resultado de la implantación con un análisis de regresión logística multivariante en diferentes poblaciones de pacientes incluyendo la puntuación del embrión, el origen de los ovocitos

(donados/autólogos), PGT-A- (embriones testados frente a no testados), la edad de los ovocitos, el tipo de transferencia de embriones (frescos/desvitrificados) y la indicación del tratamiento de infertilidad. Se incluyeron las variables si el p valor correspondiente de la prueba de Wald era inferior a 0,05. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS y se proporcionaron las odds ratio (OR) con intervalos de confianza del 95%.

### RESULTADOS:

La media de la puntuación KIDScore del embrión fue significativamente diferente entre embriones euploides ( $5,25 \pm 1,87$ ;  $n=879$ ) y aneuploides ( $4,59 \pm 1,80$ ;  $n=1058$ )\*. La probabilidad de aneuploidía se redujo según aumentó la puntuación embrionaria\*: 66,2% para  $\leq 2,5$  ( $n=143$ ); 61,4% para 2,6-5,0 ( $n=462$ ); 47,6% para 5,1-7,5 ( $n=412$ ); y 40,2% para  $\geq 7,6$  ( $n=41$ ). La puntuación KIDScore también fue distinta entre los embriones de diferente categoría morfológica\*, entre embriones con resultado de  $\beta$ -hCG+/-\*, entre embriones implantados/no implantados\* y entre embriones con resultado de recién nacido vivo (RNV)+/-\*. A pesar de que la contribución de cada unidad incrementada de KIDScore a la implantación y RNV fue significativa para todos los tratamientos en general ( $n=1.952$ ;  $OR=1,29[1,21-1,36]$ \* para implantación y  $OR=1,29[1,22-1,36]$ \* para RNV), su odds ratio aumentó en tratamientos sin PGT-A ( $n=1.584$ ;  $OR=1,35[1,27-1,44]$ \* para implantación y  $OR=1,36[1,27-1,45]$ \* para RNV) y especialmente en ciclos de ICSI convencional con ovocitos propios y sin PGT-A ( $n=480$ ;  $OR=1,38[1,24-1,54]$ \* para implantación y  $OR=1,47[1,30-1,65]$ \* para RNV). Sin embargo, la puntuación no se asoció al resultado de implantación ni RNV en aquellos embriones transferidos analizados genéticamente, confirmando que la propia puntuación ya es informativa del riesgo de aneuploidía. \* $p < 0,05$

### CONCLUSIONES:

La puntuación del embrión proporcionada por el KIDScoreD5 v3 avisa del riesgo de aneuploidía y sirve como herramienta de apoyo en la selección embriones para transferir o vitrificar en la práctica diaria en tratamientos sin PGT-A.

## DIFERENCIAS DEL DESARROLLO IN VITRO ENTRE EMBRIONES EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES DETECTADAS POR VISIÓN COMPUTACIONAL: ¿PODRÍA LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL PREDECIR LA PLOIDÍA?

L. Bori Arnal (1), D. Beltrán Torregrosa (1), F. Meseguer Estornell (1), MA. Valera Cerdá (1), D. Gilboa (2), M. Meseguer Escrivá (1)

(1) IVI Valencia - Valencia (Valencia), (2) AIVF - Tel Aviv (Israel)

### INTRODUCCIÓN:

El test genético preimplantacional para aneuploidías (PGT-A) en embriones humanos fecundados in vitro revela que un 50% de los embriones analizados son cromosómicamente anormales. Aunque la monitorización continua del desarrollo embrionario ha permitido la búsqueda de parámetros morfocinéticos asociados con anomalías cromosómicas, la cantidad masiva de datos proporcionada por los sistemas time-lapse está actualmente infrautilizada. La inteligencia artificial y la visión computacional podrían explotar el contenido de las imágenes del desarrollo embrionario para distinguir entre embriones euploides y aneuploides de forma objetiva y no invasiva.

### OBJETIVO:

El objetivo fue descubrir variaciones en el desarrollo embrionario entre embriones con distinto contenido cromosómico susceptibles de ser detectadas y medidas con visión computacional e inteligencia artificial para predecir ploidía.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un análisis retrospectivo de las anotaciones automáticas supervisadas de los eventos claves del desarrollo embrionario en 2.500 embriones sometidos a PGT-A mediante secuenciación de nueva generación (NGS) en biopsias de trofoectodermo obtenidas en día 5/6 de desarrollo embrionario. Del mismo modo, se analizaron las imágenes de secuencias time-lapse de dichos embriones con distinto contenido cromosómico. A continuación, se calculó el riesgo relativo (RR) que tenían los embriones aneuploides de alcanzar ciertos estadios del desarrollo más tarde que los euploides. Asumimos que dicho retraso se reflejaría en una mayor actividad celular que podría determinarse con precisión utilizando la visión computacional y el aprendizaje automático para medir la longitud de los bordes celulares. Se identificaron los bordes celulares y se proporcionó una puntuación de certeza para cada borde, más alta cuando el algoritmo estaba más seguro de que se trataba de un borde celular (en contraposición al ruido en las imágenes). Finalmente, se desarrolló una herramienta para medir el diámetro del blastocisto de

forma automática, pudiendo detectar contracciones débiles de 8 micras ("bombeos") que fueron comparadas entre embriones euploides y aneuploides.

### RESULTADOS:

Los RR más elevados cuando comparamos la proporción de embriones aneuploides (n=1.500) con la proporción de embriones euploides (n=1.000), cuyo RR sería 1, se muestran a continuación. Para t2 y t4 los RR fueron 1,31 y 1,42 en embriones monosómicos, 1,50 y 1,54 en trisómicos y 2,43 y 3,07 en caóticos. Para t8 y para el momento de inicio de la blastulación 1,45 en los embriones monosómicos, 1,22 en los trisómicos y 2,74 en los caóticos. La actividad celular se muestra como la suma de las longitudes de los bordes ( $\mu\text{m}$ ) en promedio de 160 imágenes por embrión de buena calidad (fotogramas entre t2-t8). La longitud total de los bordes de las células aumentó de dos células ( $420 \pm 85 \mu\text{m}$ ) a ocho células ( $861 \pm 237 \mu\text{m}$ ), en línea con los eventos de mitosis. La media del borde total medido ( $450 \pm 162 \mu\text{m}$  para euploides y  $489 \pm 215 \mu\text{m}$  para aneuploides\*) y la media de la diferencia entre fotogramas consecutivos ( $135 \pm 47 \mu\text{m}$  para euploides y  $153 \pm 64 \mu\text{m}$  para aneuploides\*) fueron mayores para los embriones aneuploides. Un modelo de regresión logística basado en la actividad celular para diferenciar entre euploides/aneuploides consiguió un 73% de sensibilidad y especificidad. Además, los blastocistos aneuploides presentaron más eventos de bombeo: 13,5% de los embriones aneuploides y 6,1% de los euploides\*. Las contracciones se correlacionaron con la aneuploidía\*: con un odds ratio (OR) de 2,22 para al menos un evento de bombeo, y con OR de 2,11, 2,73 y 5,85 para al menos 2, 3 y 4 eventos de bombeo, respectivamente. \* $p < 0.01$

### CONCLUSIONES:

El desarrollo de embriones aneuploides fue diferente al de euploides, presentando un crecimiento más tardío, mayor actividad celular y más eventos de bombeo en estadio de blastocisto. Los algoritmos basados en visión computacional pueden identificar automáticamente y medir con precisión estas diferencias para determinar la ploidía a partir de imágenes time-lapse.



## EL USO DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTES DE BIOPSIA TESTICULAR EN CICLOS DE ICSI SE ASOCIA A UN DESARROLLO MÁS RÁPIDO DE LOS EMBRIONES

M. Petrolo, F. Zambelli, D. García García, M. Martínez, A. Rodríguez Aranda, R. Vassena

Clínica Eugén - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La calidad espermática es un parámetro que puede influir en la cinética preimplantacional y en la morfología de los embriones humanos tras ICSI. De hecho, se han reportado en la literatura científica alteraciones de los tiempos de desarrollo embrionario tras fecundación con espermatozoides testiculares y epididimarios. No obstante, en estos estudios se ha analizado mayoritariamente ciclos con ovocitos de mujeres infértiles, introduciendo así un factor de confusión.

El estudio de los parámetros morfocinéticos del desarrollo embrionario en ciclos de ICSI sin factor femenino, la desviación de los estándares considerados óptimos, la frecuencia con la que ocurren y su relación con el desarrollo preimplantacional puede proporcionar información acerca de efectos específicos del semen en el desarrollo embrionario.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de los parámetros de calidad espermática de muestras de semen de distinta procedencia sobre el desarrollo embrionario, comparando embriones derivados de ciclos de ICSI con ovocitos donados y espermatozoides de pacientes con oligoastenoteratozoospermia (Grupo OAT), espermatozoides de biopsia testicular (Grupo BT) o espermatozoides de donante (Grupo DD, referencia). El uso de ovocitos de donante permite controlar un posible factor femenino.

### MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio se incluyeron 728 embriones de 120 ciclos de ICSI de 119 pacientes; 63 embriones pertenecían al grupo BT, 326 al grupo OAT y 339 al grupo de referencia DD.

Todos los embriones se cultivaron en EmbryoScope™ (Vitrolife, Göteborg, Sweden). Los parámetros morfocinéticos se recogieron en EmbryoViewer™ (Vitrolife, Göteborg, Sweden) y fueron:

tPB2 (extrusión del segundo corpúsculo polar), tPNf (desvanecimiento de los pronúcleos), t2, t3, t4, t5, t8 (estadios de 2-3-4-5-8 blastómeros), tSB (inicio de la blastulación), tB (estadio de blastocisto). Un único operador realizó todas las anotaciones.

Se aplicó el modelo de riesgo proporcional de Cox, comparando los valores morfocinéticos derivados de los embriones de los grupos OAT y BT con los de los embriones del grupo DD.

También se realizó una regresión de Cox en el grupo OAT para detectar la existencia de una asociación entre los parámetros morfocinéticos y el porcentaje de espermatozoides con movilidad A+B. Un valor  $p < 0.05$  se considera estadísticamente significativo.

### RESULTADOS:

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre embriones del grupo BT y el grupo de referencia DD para tPB2 (3,00 vs. 3,08,  $p=0,018$ ), tPNf (21,07 vs. 22,34,  $p < 0,001$ ), t3 (33,56 vs. 35,76,  $p=0,006$ ), t5 (46,33 vs. 48,07,  $p=0,003$ ) y tSB (84,76 vs. 93,89,  $p=0,007$ ).

Ninguno de los tiempos de desarrollo comparados entre el grupo OAT y el grupo DD mostró diferencias estadísticamente significativas.

En la regresión de Cox del grupo OAT no se detectó ninguna asociación estadísticamente significativa entre los intervalos de tiempo examinados y la proporción de espermatozoides A+B.

### CONCLUSIONES:

El resultado más significativo de este estudio es que los embriones inseminados con espermatozoides procedentes de biopsia testicular muestran un desarrollo más rápido que el grupo de referencia. Hay que subrayar que los espermatozoides de diagnóstico parecido (OAT severa) que han podido madurar en el epidídimo y ser eyaculados, no se asocian a tiempos más rápidos.

# COMUNICACIONES ORALES

dos de desarrollo embrionarios. La maduración en el epidídimo produce cambios a nivel proteico y genético, así como morfológico en los espermatozoides. El diferente grado de compactación de la cromatina, de la distribución proteica y de la presencia de residuos citoplasmáticos son algunas de las características

que podrían influir en los tiempos de desarrollo preimplantacional. Este estudio aporta una nueva base para investigar los mecanismos moleculares que se ven modificados en la etapa final de maduración de los espermatozoides e invita a definir marcadores de calidad espermática funcional.

## ESTUDIO DEL POTENCIAL DEL ESTADO OXIDATIVO DEL MEDIO DE CULTIVO COMO BIOMARCADOR DE CALIDAD Y VIABILIDAD EMBRIONARIA

**MA. Valera Cerdá, A. Garg, L. Bori Arnal, F. Meseguer Estornell, T. Viloría Samochín, M. Meseguer Escrivá.**  
IVIRMA Valencia - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

Existen numerosos incubadores embrionarios con tecnología time-lapse en el mercado, tanto para cultivo individual como agrupado, que aportan unas condiciones óptimas para el desarrollo embrionario. En un sistema cerrado y estandarizado, como el interior de un incubador, la identificación de cambios en la oxidación de los componentes del medio de cultivo podría ser una medición indirecta del metabolismo embrionario, que podría darnos información adicional sobre su viabilidad, no reflejada en su morfología y morfocinética. La herramienta Fertissimo TCL Analyzer™ (Carmel Diagnostics, Israel) utiliza la TermoQuimioLuminiscencia (TCL: la medición de los fotones emitidos por segundo (fps) tras una reacción de oxidación catalizada por calor) para cuantificar el estado oxidativo del medio de cultivo, el cual es un potencial biomarcador no invasivo de viabilidad embrionaria.

### OBJETIVO:

Estudiar si la calidad embrionaria se ve reflejada en el estado oxidativo del medio de cultivo utilizado y si esta medición sirve para predecir la tasa de recién nacido vivo en casa (RNV).

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se analizó el estado oxidativo de 591 muestras de medio de cultivo único (Gems®, Genea Biomedx) tras ser utilizadas para

el cultivo embrionario hasta blastocisto en 461 ciclos ICSI. 112 medios pertenecen a embriones transferidos en fresco, cultivados individualmente en el incubador EmbryoScope® (ESD, Vitrolife), y seleccionados por criterios morfológicos de ASEBIR y morfocinéticos. Por otro lado, 479 son de cultivo agrupado en EmbryoScope+® (ESD+, Vitrolife, n=245) o Geri® (Genea Biomedx, n=111). Se midieron alícuotas de 14µl en el Fertissimo TCL Analyzer™, cuyos resultados se expresan en las variables H1, H2 y H3 (fps tras 55s, 155s y 255s de reacción respectivamente), sus variantes normalizadas (sm), el Ratio entre las mediciones y un valor promedio (TCL-Score). Se analizó la relación entre el nivel de oxidación y la cantidad y calidad de los embriones cultivados en grupo mediante el coeficiente de correlación de Pearson (CCP). Los valores medios de las variables de TCL fueron comparados entre aquellos embriones transferidos que dieron lugar a un RNV (RNV+) y los que no (RNV-) mediante test ANOVA, y la contribución del TCL al resultado de RNV fue cuantificada mediante una regresión logística multivariable (RLM).

### RESULTADOS:

En las muestras de ESD+ se encontró una correlación directa entre H3 y el número de MII (CCP= 0,122, P= 0,02) y de blastocistos (CCP= 0,139, P= 0,008) por gota, entre H1 y la tasa de desarrollo a blastocisto (CCP= 0,108, P= 0,038), y entre H2 y la proporción de blastocistos clasificados como A o B (CCP= 0,135, P= 0,011), aunque no se encontró una relación similar en muestras de Geri. Se encontró una correlación directa entre H2 y la proporción de

# COMUNICACIONES ORALES

embriones viables (transferidos o vitrificados), tanto en ESD+ (CCP= 0,105, P= 0,045), como en Geri (CCP= 0,201, P= 0,033). En las muestras de Geri de ciclos con PGT-A, el Ratio resultó directamente correlacionado con la tasa de euploidía (CCP= 0,412, P= 0,007). En las muestras de embriones transferidos los parámetros de TCL resultaron significativamente mayores en los medios de embriones RNV+: H1sm= 92,90 RNV+ vs 80,88 RNV- (P= 0,011); TCL-Score= 95,53 RNV+ vs 84,29 RNV- (P= 0,015). La RLM, incluyendo la edad y IMC de las pacientes y la clasificación ASEBIR de los embriones, corroboró el efecto de H1sm en el resultado de RNV (OR= 1,024 (95%CI= 1,003-1,045; P= 0,025).

## CONCLUSIONES:

La calidad embrionaria se ve reflejada en el nivel de oxidación del medio de cultivo. Los embriones con mayor potencial contribuyen en mayor medida a la oxidación, como reflejo de un metabolismo oxidativo más extenso. El nivel de oxidación conforma un biomarcador no invasivo con capacidad para predecir el potencial de los embriones de dar lugar a un RNV.

## EL ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA MASA CELULAR INTERNA REVELA NUEVOS ASPECTOS SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES MOSAICOS

**A. Martín Bastida (1), A. Mercader Bayarri (2), F. Insua (2), A. Tejera Pastor (2), N. Grau Grau (2), L. Escrich Albel-da (2), M. Nohales Corcoles (2), A. Delgado Mendibe (2), D. Beltrán Torregrosa (2), MJ. De los Santos Molina (2)**

(1) Fundación IM-HIS La Fe - Valencia (Valencia), (2) IM RMA - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

Los blastocistos diagnosticados como mosaicos en el test genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A) se asocian con una menor tasa de implantación y mayor tasa de aborto que los blastocistos euploides. Aunque el grado de mosaicismo en PGT-A parece estar relacionado con los resultados clínicos, los mecanismos de estos embriones para hacer frente a las aneuploidías y dar lugar a recién nacidos sanos siguen sin conocerse. Previamente, reportamos como fracciones de trofoectodermo (TE) de blastocistos con diferente grado de mosaicismo en PGT-A, poseen identidades transcriptómicas equivalentes, asociadas a una desregulación de rutas clave del desarrollo en comparación con embriones euploides. En este estudio, investigamos nuevas claves de competencia embrionaria mediante el análisis transcriptómico de la masa celular interna (MCI).

## OBJETIVO:

Determinar si el perfil transcriptómico de la MCI refleja la capacidad de desarrollo de los embriones mosaicos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio prospectivo comparando por RNA-seq el perfil transcriptómico de la MCI de blastocistos euploides (n=5), mosaicos de bajo grado (n=3), mosaicos de alto grado (n=4) y aneuploides (n=6). El mosaicismo cromosómico se definió en el rango 30%-<50% (bajo grado) y 50%-<70% (alto grado). El paquete bioinformático DESeq2 se utilizó para calcular los genes diferencialmente expresados (DEGs) [Benjamini-Hochberg (BH)-padj<0.01 & abs(log2FoldChange)>2 significativo]. El algoritmo Fgsea se utilizó para el análisis de enriquecimiento funcional según la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) y Ontología de Genes (GO) (BH-padj<0.01 significativo).

## RESULTADOS:

La MCI de los blastocistos euploides se estableció como referencia para las comparaciones. Se identificaron 19 DEGs en mosaicos de bajo grado, 39 en mosaicos de alto grado, y 27 en blastocistos aneuploides. Para analizar las implicaciones funcionales de las diferencias a nivel génico, se identificaron 12 procesos KEGG/GO alterados significativamente en mosaicos de bajo grado, 35 en mosaicos de alto grado, y 38 en blastocistos aneuploides.

# COMUNICACIONES ORALES

En la MCI de los blastocistos aneuploides se identificaron 9 procesos infrarrepresentados, relacionados con la actividad mitocondrial, el metabolismo de RNA y la biogénesis de ribosomas; y 19 procesos sobrerrepresentados, todos ellos implicados en la diferenciación celular. De hecho, la vimentina, un marcador clave en la transición epitelio-mesénquima que ocurre durante la gastrulación, estuvo entre los genes más sobrerrepresentados. En la MCI de los mosaicos de bajo y alto grado, se identificaron 6 procesos alterados en ambos grupos, relacionados con el transporte de proteínas al retículo endoplásmico. Sin embargo, en los mosaicos de alto grado, 22 procesos mitocondriales críticos para la función bioenergética celular se encontraron infrarrepresentados, mientras que, en los mosaicos de bajo grado, ninguno de dichos procesos se vio afectado.

## CONCLUSIONES:

La presencia de aneuploidías en PGT-A se relacionó con alteraciones transcriptómicas en la MCI. A diferencia de los mosaicos de bajo grado, los mosaicos de alto grado mostraron un déficit bioenergético causado por una alteración de procesos mitocondriales. Estos resultados son coherentes con el potencial evolutivo de los embriones mosaicos tras PGT-A, que podría depender del grado de mosaicismo y de sus repercusiones sobre el metabolismo bioenergético de las células. La diferenciación prematura de la MCI en blastocistos aneuploides podría ser un mecanismo de regulación de la supervivencia celular en respuesta a las aneuploidías, al igual que se ha descrito en células trofoblásticas.

## CO-012 ▶ APLICACIÓN DE LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL EN LA RUTINA CLÍNICA DEL LABORATORIO DE FIV: CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA Y PREDICCIÓN DE RESULTADOS CLÍNICOS.

**A. Tejera Pastor, L. Bori Arnal, MA. Valera Cerdá, F. Meseguer Estornell, A. Garg, M. Meseguer Escrivá.**  
IVI Valencia - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

Actualmente, la inteligencia artificial (IA) es la tecnología más novedosa para la elaboración de modelos de predicción en el ámbito de la embriología. La alimentación de estos modelos con imágenes del desarrollo embrionario in vitro puede crear herramientas capaces de automatizar procesos rutinarios del laboratorio de FIV e incluso, predecir resultados clínicos. La precisa identificación del embrión en la placa de cultivo, a pesar de haber desplazamientos dentro del pocillo, restos de granulosa o burbujas, es un paso crítico para el desarrollo de cualquier modelo basado en visión computacional.

## OBJETIVO:

Evaluar la capacidad de un sistema automatizado basado en inteligencia artificial para detectar embriones en el pocillo de la placa de cultivo, predecir la capacidad de blastulación, clasificar la calidad de los blastocistos y predecir su potencial de implantación.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Los embriones incluidos en el presente estudio retrospectivo se incubaron en sistemas time-lapse (EmbryoScope, Vitrolife) hasta el día 5/6 de desarrollo y fueron evaluados rutinariamente por embriólogos senior según los criterios ASBIR. Las imágenes captadas por los incubadores fueron exportadas para entrenar y testar los siguientes modelos. Se entrenó una red neuronal artificial o ANN (del inglés Artificial Neural Network) con 60.000 secuencias time-lapse de embriones viables para detectar su posición en el pocillo. Posteriormente, se entrenó otra ANN con 8.000 embriones para distinguir la calidad de los blastocistos viables, los cuales habían sido clasificados como A, B y C por 20 embriólogos. Dicho modelo fue testado con 2.000 embriones. Finalmente, se utilizaron algoritmos random forests basados en biocaracterísticas calculadas a partir de embriones transferidos en transferencias de un único blastocisto y datos del registro médico electrónico del centro para desarrollar los modelos de predicción de blastulación e implantación. Los dos últimos algoritmos fueron entrenados con 2.800 embriones y testados con 1.200. La capacidad predictiva del sistema y el rendimiento

# COMUNICACIONES ORALES

para cada modelo se evaluó utilizando valores de precisión, sensibilidad, especificidad y áreas bajo la curva Receiver Operating Characteristics (AUC-ROC).

## RESULTADOS:

Los valores de precisión, sensibilidad y especificidad del modelo para la detección de blastocistos dentro del pocillo fueron de 0,99, 0,98 y 0,99, respectivamente. El AUC correspondiente fue de 0,999. Los valores de precisión, sensibilidad y especificidad del modelo automatizado de clasificación de blastocistos (A, B, C) en comparación con la clasificación ASEBIR realizada por los embriólogos fueron de 0,92, 0,94 y 0,95, respectivamente. El modelo tuvo una precisión extremadamente alta para distinguir

entre los tres grados de blastocitos, con un AUC de 0,99 para A frente a B; 0,97 para B frente a C; y 0,98 para A frente a C. Tras analizar vídeos de 70 horas de desarrollo embrionario correspondientes a 240 fotogramas desde la fecundación, el modelo de predicción para la blastulación alcanzó una precisión de 0,85 y el AUC resultante fue de 0,89. La precisión de la predicción de implantación positiva en estadio de blastocisto fue de 0,72

## CONCLUSIONES:

Los modelos descritos utilizando imágenes de sistemas time-lapse e IA demostraron ser una herramienta prometedora y objetiva para la detección de embriones en la placa de cultivo, para distinguir entre blastocistos viables de distinta calidad y para predecir la capacidad de blastulación e implantación.

## CO-013 ▶ EMBRIONES QUE EXCLUYEN CÉLULAS MULTINUCLEADAS DURANTE LA FORMACIÓN DEL BLASTOCISTO PODRÍAN AUTOCORREGIR SU CONTENIDO GENÉTICO

A. Munuera Puigvert, V. Montalvo Pallès, J. Massó Hernández, A. García-Faura Cirera, B. Marquès López-Teijón, M. López-Teijón Pérez.

## INTRODUCCIÓN:

La multinucleación presente en embriones cultivados in vitro representa una de las características de mal pronóstico que se relaciona con un bajo grado de formación de blastocisto y bajas tasas de implantación.

Además, la presencia de blastómeros multinucleados también ha sido correlacionada con un aumento en la tasa de aneuploidías y anomalías cromosómicas aumentando así las tasas de aborto.

Estudios previos realizados en nuestro centro concluyen que aquellos embriones multinucleados que excluyen células multinucleadas durante la formación del blastocisto incrementan su potencial reproductivo llegando a tasas de nacido equivalentes a embriones sin multinucleación. Estos estudios valoraron la implicación clínica de embriones multinucleados en función de la morfocinética de los blastómeros multinucleados, sin tener en cuenta el estatus cromosómico de estos embriones.

Algunos estudios afirman que, al excluir blastómeros durante el proceso de compactación, el embrión podría reducir su potencial de llegar a formar un blastocisto normal, sin embargo, también es posible que este hecho sea un mecanismo de autocorrección que permita al embrión deshacerse de blastómeros con un contenido genético aberrante.

## OBJETIVO:

Comparar los resultados del test genético preimplantacional (PGT) de embriones multinucleados con la capacidad de exclusión o inclusión de los blastómeros que presentan multinucleación.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo en el que se incluyeron 158 ciclos de PGT con al menos un embrión multinucleado. Los embriones que no presentaron multinucleación formaron el Grupo Control

# COMUNICACIONES ORALES

(N=474) y los embriones que presentaban al menos un blastómero multinucleado en D+2 y/o D+3 representaron el grupo de estudio (N=204). Durante el análisis morfofocinético se registró el momento de aparición de la multinucleación y se realizó un seguimiento de la célula multinucleada obteniendo tres grupos: MNC-1 (N=87), no excluyen células; MNC-2 (N=31), excluyen células mononucleadas; MNC-3 (N=41), excluyen células multinucleadas. No se incluyeron en el estudio aquellos embriones en los que no se pudo realizar el seguimiento de la célula excluida (N=45).

Todos los blastocistos fueron clasificados según la gradación Gardner, cultivados hasta estadio de blastocisto en medio único e incubados con sistema de time-lapse. Se realizó el PGT-A mediante biopsia de trofotodermo con la técnica de análisis NGS en D+5 o D+6 de cultivo en embriones de buena calidad ( $\geq 3BB$ ).

## RESULTADOS:

Un 20,33% de los embriones del estudio mostraron multinucleación. Dentro de los tres grupos de embriones, multinucleados, el Grupo MNC-3 presentó la tasa de euploidía más elevada, siendo equivalente a la del Grupo Control ( $p=0,998$ ). En los Grupos MNC-1 y MNC-2 detectamos una tasa de euploidía menor que en los Grupos MNC-3 y GC (Gráfica I).

Las tasas de aneuploidía observadas en los embriones que, manteniendo su condición de multinucleados, expulsan células mononucleadas (MNC-2) fueron superiores a las del resto de grupos, siendo significativa respecto al Grupo Control y MNC-3 ( $p=0,0002$  y  $p=0,0049$ ; respectivamente).

La tasa de mosaicismo del grupo MNC-1 es significativamente más elevada que la del Grupo Control ( $p=0,0001$ ).

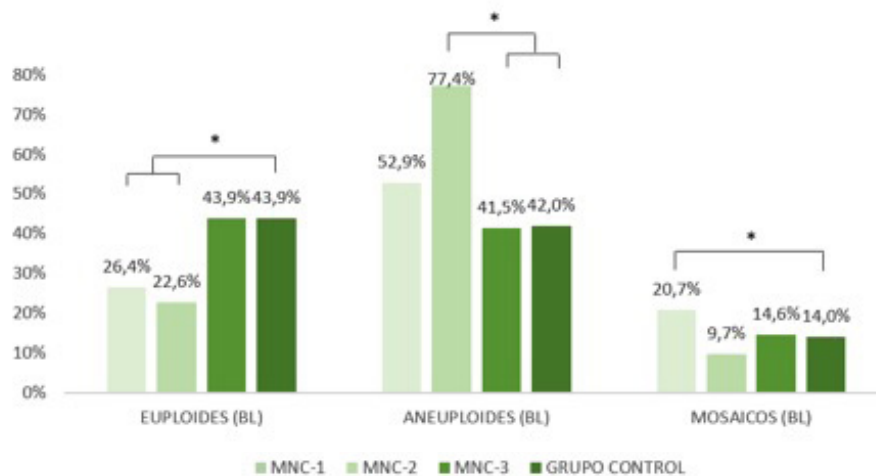
## CONCLUSIONES:

El time-lapse nos permite observar dinámicas embrionarias antes no contempladas, pudiendo estudiar en detalle eventos de mal pronóstico y llegando a relacionarlos con la dotación cromosómica del embrión. Nuestros resultados demuestran que se podrían subclassificar los embriones multinucleados en función de su capacidad para ubicar las células multinucleadas.

El grupo de embriones que excluyen células multinucleadas (MNC-3) alcanza valores de euploidía equivalentes a embriones sin multinucleación.

La elevada tasa de mosaicismo del grupo de embriones que no excluyen células (MNC-1) constata la existencia de líneas celulares diferentes dentro el blastocisto.

Estos resultados junto a los estudios realizados anteriormente sugieren una capacidad de autocorrección que les permitiría expulsar las células con contenido genético aneuploide.



**Gráfica I.** Resultado de ploidía en blastocistos (BL) en función de la inclusión o exclusión de células multinucleadas. El uso del asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p<0,05$ ).

## ¿ESTÁ EJERCENDO EL TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDÍAS (PGT-A) UN EFECTO EN LOS RESULTADOS PERINATALES?

**P. Muñoz Espert, L. Van os Galdos, L. Medrano López, J. Ballester Balaguer, J. Aizpurua**  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

Más de 8 millones de niños han nacido mediante técnicas de reproducción asistida (TRA) y una gran proporción de éstos han sido concebidos tras la transferencia de embriones vitrificados. Con la introducción del PGT-A, la biopsia embrionaria se convirtió en otra técnica de manipulación adicional, cuya influencia sobre los datos perinatales debe ser estudiada. En la actualidad, existen pocos estudios que analicen la influencia de la biopsia embrionaria de día 5-6 en los resultados perinatales, habiéndose realizado la mayoría de ellos en ovocitos autólogos.

### OBJETIVO:

Analizar el efecto de la técnica de biopsia embrionaria en el peso, longitud, tipo de parto y edad gestacional de los recién nacidos vivos (RNV) procedentes de ovocitos de donante.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo que recoge los datos de 147 criotransferencias procedentes de ciclos de ovodonación, realizadas desde enero de 2019 hasta marzo de 2020, que tuvieron como resultado un único recién nacido vivo. Se analizaron y compararon dos grupos poblacionales: nacimientos procedentes de criotransferencias de embriones de día 5-6 donde no se ha realizado PGT-A (N=65) y nacimientos procedentes de embriones euploides biopsiados en día 5-6 de desarrollo (N=82). Los datos perinatales estudiados fueron el peso, longitud, tipo de parto, edad gestacional, macrosomías (peso>4000 gr.) y si los bebés eran pequeños o grandes para su edad gestacional (SGA y LGA, respectivamente). Todos los análisis se realizaron usando el software SPSS y  $P<0,05$  fue considerada estadísticamente significativa. Los datos referentes al peso y altura de los donantes de gametos, el tipo de ovocito (fresco y/o vitrificado), la edad e índice de masa corporal de la gestante y las semanas de gestación, de ambos grupos poblacionales fueron recogidos y analizados, determinando que ambas poblaciones eran estadísticamente comparables ( $P>0,05$ ).

### RESULTADOS:

De los RNV con PGT-A y sin PGT-A el peso medio fue  $3140,32\pm 65,98$  vs  $3054\pm 69,04$ gr. ( $P=0,37$ ), la longitud media fue  $49,63\pm 0,46$  vs  $48,90\pm 0,65$ cm ( $P=0,34$ ) y la edad gestacional  $37,96\pm 0,23$  vs  $37,70\pm 0,26$  semanas ( $P=0,46$ ), respectivamente. La distribución del tipo de parto fue en PGT-A del 60,98% (50/82) para cesáreas y del 39,02% (32/82) para eutócicos y en el grupo sin PGT-A fue del 69,23% (45/65) y del 30,77% (20/65) respectivamente, no encontrándose diferencias entre las distribuciones de ambos grupos ( $P>0,05$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) en los partos pre-término (<37 semanas de gestación) dándose el 39,13% (9/23) en embriones con PGT-A y el 60,87% (14/23) sin PGT-A. Se obtuvieron un total de 18 nacimientos con SGA, de los cuales el 61,11% (11/18) procedían de PGT-A y 38,89% (7/18) sin PGT-A ( $P=0,65$ ). De los 15 nacimientos con LGA, el 80% (12/15) procedían de embriones con PGT-A y el 20% (3/15) sin PGT-A ( $P=0,05$ ); OR=3,49, 95% CI: 0,94-12,93. En el estudio de las macrosomías, solo se encontraron nacimientos con estas características en el grupo con PGT-A (6/82).

### CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos, a pesar de que el número de RNV incluidos en este estudio no es suficientemente extenso, indican que la realización de la técnica de biopsia embrionaria no afecta al peso ni a la altura de los mismos. Del mismo modo, tampoco se ve un efecto en lo referente al tipo de parto, nacimientos pre-término y SGA. Sí se ha observado una tendencia de un mayor número de casos de LGA y macrosomías en aquellos nacimientos procedentes de transferencias de embriones biopsiados. Por lo tanto, se recomendaría un mayor seguimiento y un continuo estudio de los datos perinatales de los RNV tras PGT-A para obtener resultados más consistentes sobre el efecto de dicha técnica.

## EFECTO DE TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN EMBRIONARIA EN LA INCIDENCIA DE GEMELACIÓN MONOZIGÓTICA EN CICLOS DE OVODONACIÓN

L. Van Os Galdós, P. Muñoz Espert, LL. Medrano López, A. Garcia Sifre, J. Aizpurua Sáenz  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

En los últimos años varios estudios han revelado distintos factores que aumentan o disminuyen la incidencia de gemelación monozigótica (GM). Entre ellos se incluyen la manipulación de la zona pelúcida (ZP), la edad materna, la transferencia de blastocistos y la transferencia de embriones en fresco frente a congelados [1].

### OBJETIVO:

Estudiar la influencia de los protocolos actuales de criopreservación y de manipulación de la ZP en el aumento de la incidencia de GM en tratamientos de ovodonación.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Este estudio retrospectivo incluye todos los embarazos clínicos resultantes de transferencias de un único blastocisto de ciclos de ICSI de donación de óvulos desde el 1 de enero de 2018 al 31 de enero de 2021. Los datos se dividen en tres grupos, según el tipo de manipulación que recibieron los embriones en cada grupo. El grupo 1 incluye criotransferencias de blastocistos euploides, donde la eclosión asistida (EA) se realizó en el día 3 del desarrollo embrionario, empleando para ello un láser multipulso con el cual se creó un pequeño canal en la ZP, antes de la vitrificación; El grupo 2 incluye criotransferencias de embriones sin prueba de PGT-A, donde la EA se realizó eliminando entre el 25 y el 30% de la ZP, en los días 5-6 de desarrollo embrionario, después de la desvitrificación (exceptuando los embriones que habían eclosionado naturalmente en los que no se realizó EA); El grupo 3 incluyó transferencias de embriones frescos, donde no se manipuló la ZP.

La EA se llevó a cabo utilizando un láser de diodo Lykos, de Hamilton Thorne, con una longitud de onda de 1460 nm y una potencia de 1 mW, con un ajuste de duración del pulso de 100 µs (Grupo 1) o 200 µs (Grupo 2).

Se compararon las incidencias de GM entre los diferentes grupos (1, 2 y 3). También se comparó la incidencia de GM entre las transferencias de embriones frescos y las transferencias de embriones congelados (1 + 2 versus 3). La magnitud del efecto se expresó como Odds Ratios y sus intervalos de confianza del 95%, derivados de regresión logística. Todos los datos se analizaron empleando el software Stata. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### RESULTADOS:

Se estudiaron un total de 353 gestaciones clínicas del grupo 1, 452 gestaciones clínicas del grupo 2 y 544 gestaciones clínicas del grupo 3. La incidencia de GM en cada grupo fue de 3,97% (14/353), 1,77% (8/452) y 0,37% (2/544) respectivamente, siendo significativamente mayor en el grupo 1 frente al 3 (OR 11,19, 95%CI: 2,52-49,54), también fue significativamente mayor en el grupo 2 frente al grupo 3 (OR 4,88, 95%CI: 1,03-23,11). Se observó una tendencia de aumento de incidencia en el grupo 1, frente al grupo 2, sin embargo, la diferencia no fue significativa (OR 0,44, 95%CI: 0,8-1,05). Se observan diferencias significativas al comparar el conjunto de las criotransferencias frente a transferencias en fresco (OR 7,61, 95%CI: 1,78-32,51).

### CONCLUSIONES:

La incidencia de GM tiene una incidencia mínima en transferencias en fresco de ovodonación, sin embargo, la incidencia es considerable en criotransferencias de ovodonación y más aún para transferencias de ovodonación con PGS con las técnicas de manipulación que se emplean de rutina. Atendiendo a los resultados obtenidos, es conveniente tenerlo en cuenta a la hora de asesorar y manipular los embriones de las pacientes que quieren realizar una transferencia de dos embriones.

### BIBLIOGRAFÍA:

[1] Busnelli A, Dallagiovanna C, Reschini M, Paffoni A, Fedele L, Somigliana E. Risk factors for monozygotic twinning after in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2019 Feb;111(2):302-317. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.025. PMID: 30691632.



## OVODONACIÓN: ¿EXISTEN DIFERENCIAS EN LOS RESULTADOS AL UTILIZAR OVOCITOS FRESCOS O VITRIFICADOS?

**A. García Sifre, L. Ortega López, L. Van Os Galdós, A. Parrella, M. Enciso Lorences, J. Aizpurua.**  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

En las últimas décadas, la vitrificación ovocitaria se ha convertido en un método eficiente que ofrece la posibilidad no solo de preservar la fertilidad de la mujer sino también de la creación de bancos de ovocitos. Este hecho permite la optimización de los recursos clínicos disponibles para aquellos pacientes que decidan realizar tratamientos de reproducción asistida. Aunque los beneficios de la vitrificación ovocitaria son ampliamente conocidos, diversos estudios muestran preocupación sobre las posibles alteraciones cromosómicas que este proceso puede acarrear, aumentando así el riesgo de aneuploidía y afectando las tasas de éxito. Por este motivo son necesarios estudios comparativos entre ovocitos fresco y vitrificados que determinen la viabilidad y desarrollo de los mismos.

### OBJETIVO:

El objetivo de nuestro trabajo es evaluar si existen diferencias en calidad embrionaria, tasa de euploidia y resultados clínicos en programas de ovodonación teniendo en cuenta el origen ovocitario.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Para ello se plantea un estudio retrospectivo incluyendo un total de 289 ciclos de ovodonación entre enero de 2019 y septiembre de 2020. 2795 ovocitos frescos y 1225 ovocitos vitrificados fueron incluidos en el estudio. Los protocolos de vitrificación y desvitrificación se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial. Todos los ovocitos fueron fecundados mediante ICSI y cultivados hasta el estadio de blastocisto en incubadores Time-Lapse. Se realizó estudio genético preimplantacional (PGT-A) en biopsias de trofoblasto mediante Next Generation Sequencing (NGS) a todos aquellos embriones que cumplieran con nuestros criterios de calidad teniendo en cuenta su morfología. Para comparar las diferentes variables entre grupos se utilizan los test de Chi cuadrado y Odd Ratio.

### RESULTADOS:

La tasa de fecundación fue similar en ambos grupos (75.9% y 75.2% respectivamente ( $P=0.6$ )). Vemos diferencias significativas en la tasa de formación de blasto, 71.7% y 62.5% (OR 1,519; 95% CI 1,290-1,789;  $p<0.001$ ) y en la calidad de estos, siendo la tasa de blasto de buena calidad superior en ovocitos frescos (56.6% vs 51%) (OR 1,249; 95% CI 1,031-1,514;  $P<0.02$ ). Sin embargo, los resultados de PGT-A no muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio con unas tasas de euploidia de 73.6% en frescos y 76.8% en vitrificados ( $P=0.2$ ). En cuanto al seguimiento clínico, los valores obtenidos entre los grupos fueron similares. Se realizaron un total de 322 transferencias embrionarias, 237 provenientes de ovocitos frescos y 85 de ovocitos vitrificados obteniéndose unas tasas de gestación clínica del 48.9% y 54% respectivamente ( $p=0.7$ ). La tasa de aborto se sitúa en 6.7% para el primer grupo y un 11.7% para el segundo ( $p=0.1$ ).

### CONCLUSIONES:

Las conclusiones obtenidas en este estudio apoyan el uso de manera rutinaria de ovocitos vitrificados en el laboratorio sin comprometer el éxito del tratamiento. A pesar de que la vitrificación de ovocitos puede influir en la calidad embrionaria y la tasa de llegada a blasto, no se observa impacto en la euploidía de dichos embriones ni en el desarrollo de los mismos ya que las tasas de gestación clínica y aborto son similares.

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CINÉTICA EMBRIONARIA EN CICLO NATURAL VS CICLO CON ESTIMULACIÓN OVÁRICA PARA FIV

**M. Guimerà Leal, M. Guimerà Leal, M. Méndez Justo, E. Vidal Sordé, Y. Cívico Vallejos, B. Hernández Dacruz, G. Casals Soler, F. Fabregues Gasol, D. Manau Trullàs, S Cívico Vallejos.**

Hospital Clínic de Barcelona - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La fecundación in vitro en ciclo natural (FIV-CN) consiste en el seguimiento de la foliculogénesis de un ciclo espontáneo hasta el desarrollo de un folículo dominante para la obtención de un ovocito, que una vez fecundado será transferido a la cavidad uterina. Los ciclos de FIV-CN representan una alternativa terapéutica útil en mujeres con baja respuesta ovárica tributarias de tratamientos de reproducción asistida. En los ciclos de FIV con estimulación ovárica controlada (FIV-EOC), la administración suprafisiológica de gonadotropinas permite el desarrollo simultáneo de múltiples folículos preovulatorios para la obtención de varios ovocitos, optimizando los resultados de la FIV en este grupo de pacientes. Sin embargo, el ovocito recuperado en un ciclo FIV-CN procede del folículo dominante seleccionado de forma fisiológica en un ciclo ovulatorio espontáneo, evitando la estimulación de los folículos ováricos y la manipulación del ciclo de la mujer. En este sentido, se ha sugerido que la mayor tasa de implantación asociada a la FIV-CN respecto a la FIV-EOC podría atribuirse a una mejor calidad del ovocito procedente del folículo seleccionado de forma natural. Así mismo, las diferencias en el ambiente endocrinológico intrafolicular entre ambos tratamientos podría tener un impacto en el desarrollo morfofocinético de los embriones resultantes.

### OBJETIVO:

Comparar la cinética embrionaria a partir de los ovocitos recuperados tras FIV-CN respecto a los embriones generados en un ciclo de FIV-EOC, en mujeres con baja respuesta ovárica.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo desde marzo 2014 hasta diciembre 2020, que incluye 121 ciclos de FIV-CN y 188 ciclos en pacientes con baja respuesta ovárica a las EOC (£ 3 ovocitos recuperados). Las características clínicas (edad, marcadores de reserva ovárica y causa de esterilidad) fueron comparables entre los dos grupos de estudio. La técnica de fecundación en los ciclos estudiados

fue ICSI. Un total de 430 embriones se cultivaron con medio único en un incubador con sistema time-lapse (Embryoscope, Vitrolife) hasta día D+3, momento en el que fueron o transferidos o criopreservados.

Las variables de cinética embrionaria analizadas incluyeron tPB2, tPNf, tPNa, t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9 y los intervalos entre ellas. Para cada variable cinética, se calculó la estadística descriptiva para comparar la distribución muestral de los embriones FIV-CN y los FIV-EOC. Para evaluar las posibles diferencias entre la variabilidad de los grupos, se realizó la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. De acuerdo con el resultado obtenido, y con el fin de probar las dos medias poblacionales, se realizó una t-test clásica o una t-test corregida para varianzas desiguales. Además, se aplicó el test U de Mann-Whitney para evaluar si los valores medianos en los tiempos exactos de los parámetros morfofocinéticos eran significativamente diferentes entre grupos.

### RESULTADOS:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables t2, t9, t8-t2, t7-t5, t7-t6, t5-t2 ( $p < 0.05$ ) y marginalmente significativas ( $p = 0.05-0.1$ ) en las variables cinéticas tPB2, tPNf, t8, t8-tPNa, t8-tPNf, t8-t7, tal y como se muestran en la Tabla 1.

### CONCLUSIONES:

Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en la cinética temprana de los embriones generados en una FIV-CN respecto a los procedentes de una FIV-EOC. Concretamente, se han objetivado diferencias en t2, que ha sido descrita como una variable robusta en la predicción de formación de blastocisto (1).

### BIBLIOGRAFÍA:

(1) Raquel Del Gallego, José Remohí, Marcos Meseguer, Time-lapse imaging: the state of the art, *Biology of Reproduction*, Volume 101, Issue 6, December 2019, Pages 1146–1154,

## COMUNICACIONES ORALES

	Levene's Test		T-test for Equality of Means	
	F	P	t	P
tPB2	3.770	0.053	1.703	0.089
tPNf	5.367	<b>0.021</b>	-1.861	0.064
t2	6.186	<b>0.013</b>	-2.218	<b>0.027</b>
t8	0.209	0.648	1.876	0.062
t9	1.465	0.228	3.125	<b>0.009</b>
t8-tPNa	1.990	0.159	1.720	0.086
t8-tPNf	0.259	0.611	1.733	0.084
t8-t2	0.052	0.819	2.405	<b>0.017</b>
t8-t7	5.978	<b>0.015</b>	1.715	0.088
t7-t5	10.944	<b>0.001</b>	-2.153	<b>0.032</b>
t7-t6	10.530	<b>0.001</b>	-2.110	<b>0.036</b>
t5-t2	10.662	<b>0.001</b>	1.776	0.077

**Tabla 1.** Resumen de los test estadísticos realizados. Se muestran las variables cinéticas con diferencias entre los embriones viables FIV-CN y FIV-EOC.

En negrita se muestran los resultados estadísticos significativos mientras en la cursiva son marginalmente significativos ( $p < 0.05$  /  $0.05-0.1$ ).

CO-018 ▶

### EL PERFIL METABOLÓMICO DEL SEMEN DIFIERE EN RELACIÓN CON LA CALIDAD SEMINAL

**NM. Molina (1), A. Sola Leyva (1), N. Morales (2), I. Pérez Prieto (1), E. Vargas (1), A. Yoldi (3), M. Molina (3), A. Vaquero (3), CM. Aguilera (4), SL Altmãe (1)**

(1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada; Instituto de Investigación Biosanitaria ibs - Granada (Granada), (2) Unidad Reproducción, UGC Laboratorio clínico y UGC Obstetricia y Ginecología. HU Virgen de las Nieves - Granada (Granada), (3) CEIFER Biobanco - NextClinics - Granada (Granada), (4) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos José Mataix, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada; CIBEROBN (Centro de Investigación - Granada (Granada))

# COMUNICACIONES ORALES

## INTRODUCCIÓN:

El semen contiene una amplia diversidad de metabolitos como ya se ha identificado en estudios que han analizado conjuntos de metabolitos candidatos. Sin embargo, se desconoce la composición completa de los metabolitos en el semen humano. La caracterización del perfil metabolómico completo en el semen y la evaluación de posibles diferencias entre la composición de metabolitos en relación con la calidad seminal podría mejorar nuestro conocimiento de los posibles factores involucrados en la reducción de la calidad del semen y la infertilidad masculina.

## OBJETIVO:

Describir el perfil metabolómico completo del semen humano y determinar si la composición de metabolitos difiere entre hombres con parámetros de calidad seminal superiores e inferiores a los valores de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio de caso-control con un total de 100 hombres (edad =  $29.73 \pm 8.9$  años) reclutados desde marzo de 2019 a marzo de 2020. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía. Se recolectaron muestras de semen de 69 hombres con parámetros de calidad seminal superiores a los valores de referencia de la OMS (World Health Organization, 2010) y de 31 hombres con oligozoospermia. El metaboloma completo de las muestras de semen no procesadas se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. La extracción de los datos brutos, la identificación de los picos y el procesamiento del control de calidad se llevó a cabo utilizando el hardware y software de Metabolon (metabolon.com). Además, se aplicó un modelo de regresión múltiple controlando por edad y centros de recogida de muestras utilizando el software R.

## RESULTADOS:

Se detectaron un total de 695 metabolitos diferentes en las muestras seminales, donde el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n3, PubChem ID 445580), la fosocolina (1014), el ácido di-homo- $\gamma$ -linolénico (20:3n3 o n6, 5280581), el ácido docosapentaenoico (DPA; 22:5n6, 6441454) y el adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPC, 6076) fueron los más prevalentes. Los perfiles metabolómicos seminales difirieron significativamente entre hombres con parámetros espermáticos superiores e inferiores a los valores de referencia de la OMS. Los metabolitos más abundantes en hombres con normozoospermia pertenecieron a la ruta metabólica de los lípidos, mientras que la ruta metabólica de los nucleótidos predominó en muestras de semen con baja calidad ( $p < 0.05$ ). En particular, la principal sub-ruta metabólica en hombres con normozoospermia fue la de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (n3 y n6), mientras que la sub-ruta del metabolismo de la purina y la pirimidina prevaleció en muestras de semen con baja calidad. El DHA y el AMPC dominaron en hombres con parámetros de calidad seminal por encima y por debajo de los valores de referencia, respectivamente ( $p < 0.05$  en todas las comparaciones).

## CONCLUSIONES:

Actualmente, los análisis de semen que se llevan a cabo en la clínica no evalúan el estado funcional de los espermatozoides, haciendo que las causas de infertilidad por factor masculino permanezcan a menudo desconocidas. Los resultados de nuestro estudio podrían ayudar a comprender el trasfondo molecular de la reducción de la calidad seminal y la infertilidad masculina, y conducir a la identificación de biomarcadores moleculares de espermatozoides funcionales.

## BIBLIOGRAFÍA:

World Health Organization. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th Edn)*. WHO Press.

## PRIMER NACIDO VIVO PROCEDENTE DE UNA MUESTRA SEMINAL CONGELADA EN CASA POR EL PROPIO PACIENTE.

**B. Pujal Bravo, V. Montalvo Palles, J. Massó Hernández, F. García José, A. García-Faura Cirera, B. Marquès López-Teijón, M. López-Teijón Perez**  
Institut Marquès - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La congelación de muestra seminal para propósitos reproductivos está indicada en diferentes situaciones: preservación de la fertilidad, antes de una vasectomía, en pacientes con disfunciones y problemas para obtener una muestra, y para esos pacientes que no pueden estar presentes en el momento de la punción. El paciente se ve presionado para obtener la muestra, en un ambiente clínico y en un momento exacto. Muchos viven esto como una situación estresante, que en algunos casos les obliga a viajar si viven lejos de la clínica.

Es por esto que en 2017 estudiamos la viabilidad de un proceso que ahorrase a los pacientes esta fuente de estrés. Validamos un protocolo de congelación de la muestra seminal por parte del paciente. Siguiendo unas sencillas instrucciones y aportando los materiales necesarios demostramos que era un método de congelación que tenía resultados similares a los de la congelación en la clínica por profesionales cualificados.

### OBJETIVO:

Evaluar la eficacia del método de congelación de la muestra seminal en casa por parte del mismo paciente.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio dividido en dos fases, fase piloto y fase de validación. En 2017 se validó el protocolo de congelación en casa por parte del mismo paciente, voluntarios obtuvieron la muestra en la clínica. Un biólogo congeló parte de la muestra, y la muestra restante la congeló el voluntario siguiendo las sencillas instrucciones aportadas. Una vez comprobado que la calidad de la muestra era la misma que si la congelaba un biólogo experto, empezamos a ofrecer esta técnica a nuestros pacientes en 2019.

En la prueba piloto participaron un total de 41 voluntarios. Se

evaluó la concentración, movilidad, morfología, vitalidad y fragmentación de ADN. Se utilizó el test estadístico "Wilcoxon signed-rank".

Hasta abril de 2021 un total de 21 pacientes han realizado el Kit de congelación en casa, 17 de ellos residentes en otros países de la UE, y 4 residentes en España, pero lejos de la clínica. Como grupo control utilizamos 416 ciclos de Donación de Ovocitos con muestra congelada.

### RESULTADOS:

Por lo que respecta a la prueba piloto no se encontraron diferencias entre las muestras congeladas por el biólogo y el voluntario por lo que respecta a movilidad ( $45,99 \pm 22,3\%$  vs  $44,52 \pm 22,3\%$ ), vitalidad ( $86 \pm 11,6\%$  vs  $79 \pm 12,9\%$ ), morfología ( $4 \pm 3,0\%$  vs  $5 \pm 4,0\%$ ) y fragmentación del ADN ( $9,14 \pm 8,5\%$  vs  $5,18 \pm 4,6\%$ ). Después de 24 horas no se encontró crecimiento bacteriano en ninguna muestra.

De las 21 muestras recibidas congeladas por el propio paciente, se han utilizado 9 para realizar un tratamiento de reproducción asistida. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a tasa de fecundación respecto al grupo control ( $76,4 \pm 15,1\%$  vs  $76,56 \pm 18,3\%$ ;  $p=0,369$ ), tasa de blastocisto utilizado ( $59,18\% \pm 10,5\%$  vs  $58,78 \pm 16,4\%$ ;  $p=0,259$ ) ni tasa de embarazo ( $42,8\%$  vs  $60,1\%$ ;  $p=0,621$ ).

El hecho de tener un nacido vivo de una muestra congelada por el propio paciente acaba de demostrar la seguridad y utilidad de este novedoso protocolo de congelación.

### CONCLUSIONES:

Estos resultados demuestran la utilidad clínica de este método de congelación para ciertos pacientes, donde viajar a la clínica puede ser un inconveniente.

## NOVEDOSO SISTEMA DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA BASADA EN MICROFLUÍDOS, EL CAMINO HACIA LA AUTOMATIZACIÓN DE LA SELECCIÓN DEL SEMEN

F. Meseguer Estornell, R. Rivera Egea, L. Bori Arnal, MA. Valera Cerdá, T. Viloria Samochín, M. Meseguer Escrivá  
IVIRMA Valencia - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

La infertilidad se define como la incapacidad para lograr un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin protección y el 20-30% de los casos de infertilidad se deben únicamente al factor masculino. Las clínicas de reproducción asistida para realizar tratamientos de fecundación in vitro, han desarrollado varias técnicas para la capacitación del semen, siendo el centrifugado por gradientes de densidad (CGD) una de las más utilizadas. No obstante, la capacitación es un procedimiento que requiere equipos voluminosos y costosos, largos tiempos de espera y técnicos capacitados. El Harvester es un dispositivo basado en la microfluidica, capaz de realizar la capacitación espermática superando los problemas de los otros sistemas de capacitación.

### OBJETIVO:

Comparar el nuevo sistema de capacitación basado en microfluidos, llamado Harvester, con la centrifugación por gradientes de densidad (CGD).

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio piloto prospectivo en el que se reclutaron 25 pacientes. Las muestras espermáticas en fresco y las muestras capacitadas de cada paciente se analizaron de acuerdo con los criterios de la OMS 2010 utilizando análisis automático de imágenes. La capacitación espermática se llevó a cabo utilizando el Harvester y CGD con la finalidad de aislar los espermatozoides basándose en la dinámica de fluidos y la motilidad celular. Se utilizó la tinción con azul de anilina para evaluar la retención excesiva de histonas tanto en muestras espermáticas en fresco como en muestras capacitadas mediante ambas técnicas, dicha retención excesiva indica una compactación defectuosa de la cromatina y, por consiguiente, un defecto en la maduración del ADN. Además, utilizando la técnica TUNEL, se analizó la fragmentación del ADN de muestras espermáticas frescas y capacitadas. Se analizaron al menos 20.000 espermatozoides mediante citometría de flujo. Finalmente, se realizó la prueba ANOVA para evaluar las diferencias estadísticas entre las variables a estudiar.

### RESULTADOS:

Se reclutaron 25 pacientes (edad media 34,7±8,7 años). Las muestras espermáticas en fresco se evaluaron mediante análisis automático de imagen, en promedio presentaban una concentración de 60,1±31,8x10<sup>6</sup>/mL. Del mismo modo, después de capacitar por CGD y por Harvester, la concentración de espermatozoides fue de 13,2±9,0 y 13,3±10,0x10<sup>6</sup>/mL, respectivamente. La motilidad de la muestra en fresco mejoró de 42,2±11,8% a 70,7±13,6% después de utilizar CGD y 74,9±12,7% después del Harvester (P<0,0001). Se obtuvieron tendencias similares cuando se analizó la morfología. El porcentaje de espermatozoides normales aumentó de 1,9±1,1%, para las muestras en fresco, a 3,4±1,5 y 4,1±1,2% para las muestras capacitadas con CGD y microfluidos, respectivamente (P<0,0001). Otro parámetro, que se benefició de la capacitación, fue la maduración del ADN. El porcentaje de maduración del ADN espermático aumentó de 65,3±7,4% a 72,5±7,3% cuando las muestras fueron procesadas utilizando CGD y 75,0±7,6% cuando se utilizó el Harvester (P<0,0001). Del mismo modo, el porcentaje de espermatozoides vivos aumentó de 74,0±7,9% y 77,8±8,1% para muestras en fresco y después de usar CGD, respectivamente, a 84,2±8,6% después de capacitar por Harvester (P<0,02). Aunque no hay diferencias significativas, se observó una disminución en la fragmentación del ADN de 17,0±11,9% en muestras capacitadas con CGD a 12,2±6,2% para muestras en fresco (P>0,05). Sin embargo, con el Harvester la fragmentación del ADN cayó a 8,2±7,3%, mostrando diferencias significativas entre ambos métodos de capacitación (P<0,006).

### CONCLUSIONES:

Si bien la movilidad, morfología y maduración del ADN de los espermatozoides mejoran significativamente con la capacitación, no se observaron diferencias significativas entre Harvester y CGD, debido al reducido tamaño muestral preliminar, aunque los valores presentaron una mejoría con el Harvester. Por el contrario, se observaron diferencias significativas entre ambas capacitaciones al analizar la vitalidad espermática y la fragmentación del ADN, mejorando al usar el Harvester. Por lo tanto, el Harvester se presenta como una nueva técnica capaz de automatizar el proceso de capacitación, minimizando la variabilidad entre laboratorios, el error humano y la carga de trabajo mejorando la calidad seminal.

## VALIDACIÓN PROSPECTIVA DEL PARÁMETRO ASHA (AVERAGE SPERM HEAD AREA) COMO FACTOR DE RIESGO DE ANEUPLOIDIA ESPERMÁTICA EN CASO DE INFERTILIDAD MASCULINA IDIOPÁTICA

JJ. Bataller Sánchez (1), A. Barberá Alberola (1), M. Ferrer Buitrago (1), V. Moliner Aguilar (1), X. Vendrell Montón (2), C. Calatayud Lliso (1), M. Ruiz Jorro (1)

(1) CREA - Valencia (Valencia), (2) Sistemas Genómicos - Paterna (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

El FISH en espermatozoides está indicado en pacientes con sospecha de fallo testicular (FT) con meiosis alterada, así como en fallo recurrente de implantación (RIF) o pérdida de embarazo (RPL). La incidencia de FISH alterado es de aproximadamente un 15% en no normozoospermicos, superando el 40% en pacientes con FT, RIF o RPL. Estudios retrospectivos previos evaluaron la utilidad del área media de la cabeza espermática (ASHA, average sperm head area) como herramienta de anticipación para la detección de aneuploidía espermática. Se necesitan datos prospectivos para validar la capacidad del ASHA para predecir aneuploidía espermática en pacientes sin sospecha de alteraciones meióticas.

### OBJETIVO:

Validación prospectiva del ASHA para la detección del aneuploidía espermática.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Inicialmente, se evaluó el valor del ASHA de forma retrospectiva en 250 pacientes con RIF, RPL o sospecha de fallo testicular, por presentar oligozoospermia con valores aumentados de FSH, a los que se hizo FISH en espermatozoides (Grupo 1). El valor de referencia se determinó a partir del percentil 95 del valor del ASHA en los 147 pacientes con FISH normal (Grupo Control), resultando en  $14,8 \mu\text{m}^2$ . La validación prospectiva del ASHA se realizó en 22 pacientes que no mostraron RIF, RPL o FT pero sí un ASHA igual o superior al valor de referencia (Grupo 2). El tamaño muestral se ajustó para detectar una diferencia superior al 30% respecto a la incidencia basal conocida del 15% de FISH alterado en pacientes dispérmicos, con una potencia del 95%. Los parámetros espermáticos como concentración, movilidad, morfología y ASHA se evaluaron mediante el software comercial ISAS de Proiser. El método de tinción fue Diff-Quick. El FISH se realizó utilizando el software Metafer-4. Todos los pacientes del

Grupo 2 presentaban cariotipo y función testicular normal, con valores de FSH inferiores a  $10 \text{ mUI/ml}$  ( $4,81 \pm 2,83$ ). Los parámetros espermáticos fueron: concentración  $20,79 \pm 26,47$  millones de espermatozoides/ml, movilidad progresiva  $44,95 \pm 14,58$  y morfología  $1,55 \pm 0,74\%$ .

### RESULTADOS:

La incidencia de FISH alterado en el grupo 1 (pacientes con RIF, RPL o FT) fue del 41,2%. El valor medio del ASHA en este grupo fue de  $12,93 \mu\text{m}^2 \pm 1,31$ . La incidencia de FISH alterado en el grupo 2 (pacientes sin RIF, RPL o FT pero con ASHA superior o igual a  $14,8 \mu\text{m}^2$ ) fue del 59,1%. El valor medio del ASHA en este grupo fue de  $15,22 \mu\text{m}^2 \pm 0,64$ . La incidencia de FISH alterado en los grupos 1 y 2 fue significativamente superior ( $p$  valor 0,0000 y 99% confianza) a la del grupo de referencia (pacientes con dispermia). Además, el ASHA mostró una menor variabilidad entre muestras que otros parámetros tradicionales como la concentración espermática, recuento total de espermatozoides o morfología ( $p < 0,002$ ). Asimismo, el valor predictivo positivo del ASHA para la detección de FISH alterado fue superior al del resto de parámetros (ASHA 73,9%, concentración espermática 56,5%, número total de espermatozoides 58,8% y morfología 46,7%).

### CONCLUSIONES:

Este estudio revela que pacientes con valores de ASHA  $\geq 14,8 \mu\text{m}^2$  muestran mayor incidencia de FISH alterado que la población general de hombres infértiles con semen alterado ( $p < 0,05$ ).

Un ASHA aumentado está asociado a presencia de aneuploidías espermáticas incluso en pacientes sin sospecha de fallo testicular o antecedentes de RIF o PRL.

El ASHA alerta del riesgo de aneuploidía espermática desde el primer análisis seminal y contribuye a reducir el tiempo necesario para aconsejar PGT-A en caso de FISH alterado.

# COMUNICACIONES ORALES

El presente estudio está realizado en un número reducido de pacientes. La validación clínica del ASHA debe ser confirmada con estudios más amplios y la interpretación del resultado debe tener en cuenta los diferentes factores que pueden influir en este valor.

## BIBLIOGRAFÍA:

Sarrate, Z., Vidal, F. & Blanco, J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertility Sterility* 93 (2010).

Ramasamy et al. Fluorescent in situ hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications. *Fertility Sterility* 102 (6) (2014).

Bataller-Sánchez, J. J., Barberà-Alberola, A., Vendrell-Montón,

X., Calatayud-Lliso, C. & Ruiz-Jorro, M. El área media de la cabeza espermática de una muestra de semen es más predictiva de FISH alterado que el recuento o la morfología espermática. *MEDRE* Vol. 22 (2017).

Ruiz-Jorro, M. et al. Área media de la cabeza espermática: un nuevo factor pronóstico en tratamientos de reproducción asistida. *MEDRE* Vol. 5 (2018).

Ruiz-Jorro, Miguel et al. Average sperm head area: a novel risk factor for sperm aneuploidy in idiopathic male infertility. *Abstr. 36th Ann. Meet. ESHRE, 5 to 8 July 2020 35, (2020).*

Ruiz-Jorro, Miguel et al. Increased average sperm head area (ASHA) is a novel sperm parameter associated with higher incidence of sperm aneuploidy. *Fertility Sterility* 114 ISSUE 3, E561 (2020).

CO-022 ▶

## A NOVEL ARTIFICIAL INTELLIGENCE SYSTEM TO ENHANCE THE ACCURACY OF SEMEN ANALYSIS

**A. Parrella NA, L. Ortega López, Y. Galiana Briones, I. Vilella Amorós, J. Aizpurua**  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCTION:

The current methods to perform semen analysis are via manual microscope and computer-assisted semen analysis system. However, these methods are either too expensive or not fully reliable. To overcome these limits, we evaluate and validate the accuracy of an Artificial Intelligence Semen Analysis system, Mojo AISA an Artificial Intelligence Semen Analysis system which relies on neural network classification based on neural network classification. This is designed for assessing the concentration and motility of the spermatozoa improving the objectiveness and the accuracy of semen parameters, minimizing human error. We also postulate that the AI microscope will learn to assess the morphology.

### OBJECTIVE:

To evaluate and validate the clinical performance of an artificial intelligence semen analysis system, Mojo AISA able to assess the concentration and motility of semen samples.

### MATERIAL AND METHOD:

In the last two months, semen parameters of 20 consenting men were assessed simultaneously by manual microscopy method (MM) and by Mojo AISA. During the development, Mojo AISA was trained and validated with 2 million sperm images according to WHO 5th Edition (2010) guidelines. The manual semen analysis was performed by two certified andrologists following the same guidelines. For the standard semen



# COMUNICACIONES ORALES

assessment, a minimum of 200 spermatozoa in duplicate were counted to analyze the sperm concentration ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) with Makler chamber. Sperm motility (%) was examined with phase-contrast optics and at least 200 spermatozoa in duplicate were counted. For Mojo AISA, 20  $\mu\text{l}$  of semen specimen was loaded on a glass slide. The time to deliver the results of the semen parameters was 4 minutes per sample. Samples with normal and abnormal semen parameters were included in this study. The statistical analysis was carried out with SPSS 14.0 statistical software. Wilcoxon test was used to analyze our data with a  $P < 0.05$  considered statistically significant.

## RESULTS:

The semen sample of 20 men ( $41 \pm 10$  years old) was evaluated simultaneously with MM and Mojo AISA. The average and the standard deviation of semen concentration with MM and with Mojo AISA was  $57.90 \pm 45.6$  and  $46.3 \pm 44$ , respectively ( $P < 0.05$ ). However, no significant difference was seen in sperm motility between MM and AI method, with an average and standard deviation of  $48.4 \pm 21.1$  and  $41.9 \pm 19.9$ ,

respectively. Similar results were found when progressive motility was evaluated. The average and the standard deviation of progressive motility with MM and with Mojo AISA methods was  $39.1 \pm 22$  and  $31 \pm 17$ , respectively. These results show a strong agreement and accuracy when we compare the sperm motility results carried out by Mojo AISA and those obtained with the manual method.

## CONCLUSION:

According with our results, Mojo AISA represent a powerful tool for routine semen analysis providing reliable and standardized clinically results in a short time. While it can guarantee a high accuracy in the assessment of sperm motility, more software adjustments are needed to have a high accuracy of sperm concentration, in particular in samples with extremely low concentrations. This because we notice that the difference of the sperm concentration between the two methods was mainly seen when severe oligozoospermic patients were evaluated. However, this limitation may be overcome improving the artificial intelligence detector and tracker.

CO-023 ▶

## ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE SLC9C2 EN TESTÍCULO DE MAMÍFEROS

**P. Cots Rodríguez (1), M. Balastegui Alarcón (1), M. Avilés González (1), L. Gonzáles Brusi (2), N. García Carrillo (3), P. Sòria Monzó (1), J. Ballesta (1), E. Gómez Sánchez (4), M.J. Gómez Torres (5), M. Avilés (1)**

(1) Universidad de Murcia - Murcia (Murcia), (2) Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) - Madrid (Madrid), (3) Laboratorio de experimentación animal, ACTI, Universidad de Murcia - Murcia (Murcia), (4) Tahe Fertilidad - Murcia (Murcia), (5) Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

Según estudios recientes, en España aproximadamente 800.000 parejas sufren problemas de fertilidad. El origen de ésta puede deberse a distintos factores, y se estima que la causa de origen masculino representa el 30% de la infertilidad total. Aun así, hay múltiples mecanismos moleculares del gameto masculino que desconocemos, y por ello aproximadamente el 45% de los casos se atribuyen a origen desconocido. Por consiguiente, es fundamental la identificación de anomalías genéticas relacionadas con la espermatogénesis y, entre otros, un ejemplo de ello son aquellos genes codificantes para canales y transportadores iónicos [1].

Los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) son proteínas de membrana involucradas en procesos fisiológicos como la regulación intracelular de pH, crecimiento celular y absorción de fluidos. En concreto, el gen SLC9C2, se ha visto expresado en testículo humano y en espermátidas tardías, y tras un análisis bioinformático observamos que dicho gen se encuentra pseudogenizado en ratón.

El desarrollo de modelos animales de pérdida de función (Knock-out), fundamentalmente en ratón, han sido de gran importancia a la hora de conocer la función y los mecanismos de actuación en multitud de genes. En el caso particular de este gen no es posible realizarlo en ratón.

# COMUNICACIONES ORALES

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es determinar la expresión del gen SLC9C2 en el testículo de babuino (*Papio anubis*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y hámster (*Mesocricetus auratus*) y, de este modo, establecer un modelo experimental que nos permita estudiar el papel de dicho intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en la fisiología del espermatozoide de mamíferos y de la especie humana en particular.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia.

Se obtuvieron muestras testiculares de babuino (*Papio anubis*) (n=4) mediante castración, así como de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (n=2) y hámster (*Mesocricetus auratus*) (n=3) tras ser sacrificados. Posteriormente, se extrajo el RNA total de testículo y se realizó una RT-PCR. Para ello, se procedió a la retrotranscripción de RNA a cDNA y éste se mezcló junto con los distintos cebadores diseñados para cada una de las especies y la enzima polimerasa para proceder a su amplificación. El producto de la RT-PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris-Acetato-EDTA. Se realizó secuenciación por Sanger para confirmar la secuencia del amplicón obtenido. Finalmente, se realizó un análisis bioinformático para determinar

la identidad en la secuencia del gen humano con los de las tres especies analizadas.

## RESULTADOS:

Se detectó expresión de SLC9C2 en todas las muestras testiculares analizadas. La banda observada en la electroforesis coincidió con el tamaño del amplicón esperado según el diseño de cebadores realizado y fue confirmado por secuenciación.

Tras el análisis bioinformático se observó que la identidad de la proteína SLC9C2 humana con la de sus ortólogos en babuino, conejo y hámster es del 90,8%, 75,2% y 68,3%, respectivamente.

## CONCLUSIONES:

Este estudio demuestra la expresión del gen SLC9C2 en el testículo de babuino, conejo y hámster, lo que implica la utilidad de estas especies como modelo experimental alternativo al ratón. Estudios posteriores son necesarios para averiguar su función en la espermatogénesis y en la funcionalidad espermática en particular.

## BIBLIOGRAFÍA:

[1] Wang, H., McGoldrick, L.L. & Chung, J.J. Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nat Rev Urol* 18, 46–66 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00390-9>

## HALLAZGOS INCIDENTALES EN EL TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ESTUDIO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS (PGT-M) MEDIANTE GENOTIPADO DE SNPs.

**E. Toro Toro, CM. Armada Sánchez, D. Campos Rodero, L. Álvarez Gómez, E. García-Guixé, A. Gómez Duro, M. Sandalinas Alabert, C. Giménez Sevilla**  
Reprogenetics Spain - Barcelona (Barcelona)

## INTRODUCCIÓN:

El genotipado de SNPs en ciclos de PGT-M, permite identificar el haplotipo de riesgo asociado al gen de interés en muestras de ADN de ambos miembros de la pareja y de un familiar de primer grado (referencia) con estatus genético conocido.

Esta técnica también permite detectar anomalías cromosómicas cualitativa y cuantitativamente: el análisis cualitativo se basa en SNPs informativos (haploblocks) y el cuantitativo, en los diagramas log-R ratio (Log-R) y B-allele frequency (BAF)

que contribuyen a la detección de variantes en el número de copias (CNV). Las técnicas empleadas habitualmente en el estudio de aneuploidías embrionarias, no permiten establecer el origen de las anomalías meióticas. El análisis cualitativo en el genotipado de SNPs sí permite determinar el origen de estas anomalías, permitiendo visualizar alteraciones poco frecuentes que pasarían desapercibidas con técnicas de análisis convencional.

Entre estos hallazgos, se hallan casos de disomía uniparental, diploidía uniparental, haploidía o poliploidía.

# COMUNICACIONES ORALES

Estas anomalías, aunque minoritarias, pueden ocasionar enfermedades relacionadas con alteraciones de la impronta o síndromes con herencia recesiva en el caso de disomía uniparental si el progenitor es portador de una variante patogénica en un gen recesivo. En la diploidía uniparental el embrión no se desarrolla correctamente produciendo una mola hidatiforme completa (46,XX cromosomas derivados del padre) o un teratoma ovárico (46,XX cromosomas derivados de la madre).

Los embriones haploides no son viables pero los triploides pueden dar lugar a un embarazo evolutivo. Aunque las concepciones triploides pueden derivar en molas parciales y la gran mayoría se abortan en el primer trimestre, pueden dar lugar a un embarazo a término. Sin embargo, la triploidía suele ser letal en el periodo prenatal o neonatal inmediato. Solamente se han descrito algunos casos mosaicos con larga supervivencia.

## OBJETIVO:

Identificar anomalías cromosómicas mediante genotipado de SNPs no detectables con técnicas de secuenciación masiva (haploidía, poliploidía, disomía uniparental y diploidía uniparental) y evaluar su incidencia en ciclos de PGT-M.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se estudiaron muestras de trofoectodermo de 727 blastocistos procedentes de 160 ciclos de PGT-M. Tras una amplificación total del genoma por desplazamientos múltiples (MDA), los productos obtenidos se analizaron mediante genotipado de SNPs (HumanKaryomap, Illumina) para el estudio de la enfermedad hereditaria y la evaluación de anomalías cromosómicas.

Tras el análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras, los embriones con anomalías en el número de complementos cromosómicos o en su origen parental se clasificaron en: haploide, triploide, disomía uniparental y diploidía uniparental.

## RESULTADOS:

Un 1,5% de los embriones analizados (11/727) presentaban alteraciones en el número de complementos cromosómicos o en su origen parental. De ellos, 4 se clasificaron como triploides de origen materno (3x69,XXX y 1x69,XXY). Cinco se clasificaron como haploides (23,X0), de los cuales 4 solo presentaban cromosomas de origen materno y 1 solo de origen paterno. Dos embriones analizados presentaban una dotación cromosómica diploide uniparental con dos juegos cromosómicos de origen materno.

## CONCLUSIONES:

Solamente se han observado triploidías de origen materno, cuando en la gran mayoría de casos tienen un origen paterno (fecundación por dos espermatozoides o por un espermatozoide de diploide). Pensamos que este hecho puede deberse al uso de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides requerida en ciclos de PGT-M.

A tenor de los resultados obtenidos, y exceptuando el embrión triploide con cariotipo 69,XXY, el genotipado de SNPs ha permitido diagnosticar 10 anomalías cromosómicas que no se hubieran detectado con el análisis mediante técnicas de secuenciación masiva (1,4% vs 0,15%).

## HALLAZGOS INCIDENTALES EN EL TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ESTUDIO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS (PGT-M) MEDIANTE GENOTIPADO DE SNPs.

**B. Lledó Bosch, R. Morales Sabater, JA. Ortiz Salcedo, A. Rodríguez Arnedo, J. Ten Morro, JC. Castillo Farfán, A. Bernabéu García, J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu Pérez**  
Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

El niPGT-A ha generado un gran interés en las técnicas de diagnóstico genético en medicina reproductiva. Las tasas de éxito y concordancia entre el PGT-A y el niPGT-A son variables en las dis-

tintas publicaciones. Las discordancias parecen estar relacionadas con el mosaicismo embrionario, la eliminación preferencial de células aneuploides, la contaminación de ADN y el método utilizado para el análisis (amplificación / detección). La eficacia de niPGT-A se ha visto limitada por las dificultades técnicas aso-

# COMUNICACIONES ORALES

ciadas con la baja cantidad y calidad del ADN, lo que presenta desafíos en el desarrollo de nuevas técnicas o adaptación de las existentes para el análisis genético.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio fue evaluar la precisión de niPGT-A comparando dos técnicas de análisis cromosómico diferentes.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio de validación prospectivo ciego desde septiembre de 2018 hasta diciembre de 2019, que incluyó 302 análisis cromosómicos. 276 correspondieron a biopsias de trofotodermo (TE) de parejas que acudieron a nuestra clínica para PGT-A y cuyo medio de cultivo donde el blastocisto había sido cultivado (SBM) fue evaluado por dos métodos. Se evaluaron 8 blancos para detectar una posible contaminación en el medio de cultivo. Finalmente, para investigar las discrepancias diagnósticas: los embriones aneuploides diagnosticados mediante TE se descongelaron y se volvieron a analizar mediante biopsias de TE y de masa celular interna (ICM).

Los embriones se cultivaron en medio Global Total LP hasta el D3, se lavaron tres veces y se cultivaron nuevamente hasta la biopsia (D5 o D6). Para el análisis de TE se utilizó Veriseq (Illumina®). Los embriones euploides congelados se descongelaron y se transfirieron en el ciclo posterior. La recogida del SBM se realizó después de la biopsia TE y las muestras se almacenaron a -80°C. El análisis cromosómico SBM se realizó utilizando Veriseq (Illumina®) y NICS (Yikon®).

## RESULTADOS:

Obtuvimos resultados del test genético en el 96,8% de las muestras de TE frente al 90,4% en SBM utilizando ambas técnicas ( $p > 0,05$ ). La tasa de mosaicismo fue mayor en SBM (30,4% SBM-Yi-

kon; 28,3% SBM-Veriseq) en comparación con las biopsias TE (14,1%) ( $p=0,013$ ;  $p=0,031$ ) independientemente de la técnica utilizada. Realizamos comparaciones entre ambas técnicas de SBM mostrando un 95,2% de consistencia en el diagnóstico. Con respecto a la concordancia diagnóstica (euploide-euploide vs aneuploide-aneuploide) entre cada técnica de SBM y biopsia TE, obtuvimos 74,6% SBM-Yikon vs 72,3% SBM-Veriseq. Sin embargo, cuando consideramos los embriones biopsiados en D6, estas tasas alcanzaron el 92,0% y el 86,5%, respectivamente. Al analizar la concordancia cromosómica completa, los resultados citogenéticos fueron exactamente los mismos que los de la biopsia TE en el 45,2% SBM-Yikon y el 41,7% SBM-Veriseq. Además, en el 20,1% SBM-Yikon y el 23,3% SBM-Veriseq los resultados fueron discordantes sólo en el diagnóstico de mosaicismo. Las restantes fueron discordancias parciales (22,6% SBM-Yikon vs 23,3% SBM-Veriseq) y complementarias (4,8% SBM-Yikon vs 3,3% SBM-Veriseq). Para identificar la causa de las discrepancias volvimos a analizar embriones aneuploides TE, el 55,6% de las discrepancias se debieron a contaminación del ADN (origen materno), el 22,2% al mosaicismo embrionario, el 11,1% a baja resolución en SBM-Yikon y el 11,1% a baja resolución en ambas técnicas. Por último, analizamos la FIV siendo la tasa de embarazo evolutivo del 50% para TE-euploide-SBM-Yikon-aneuploide frente al 33,3% para TE-euploide-SBM-Veriseq-aneuploide.

## CONCLUSIONES:

La concordancia diagnóstica entre PGT-A y niPGT-A parece ser independiente de la técnica utilizada para el análisis genético. Además, la concordancia fue mayor para los embriones biopsiados el D+6. Por lo tanto, el resultado del niPGTA puede verse influenciado por factores como la contaminación del ADN y el mosaicismo embrionario. La optimización de las condiciones de cultivo y la recuperación del medio constituyen posibles objetivos para mejorar la fiabilidad de niPGT-A.

	niPGT-A	PGT-A	FIV/ICSI
No. de ciclos con trasfencia	13	13	130
Embarazo clínico(%)	9 (69.2%)	9 (69.2%)	75 (57.7%)
Abortos (%)	1 (11.1%)	1 (11.1%)	12 (16%)
Embarazo evolutivo(%)	8 (61.5%)	8 (61.5%)	63 (48.5%)
Muestras informativas	62/65 (95%)	125/129 (97%)	
Anormales (%)	44%	46%	

## FACTORES QUE AUMENTAN EL RIESGO DE ABORTO BIOQUÍMICO TRAS LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EUPLOIDES EN CICLOS DE PGT-A

JA. Ortiz Salcedo, R. Morales Sabater, B. Lledó Bosch, A. Rodríguez Arnedo, A. Bernabéu García,  
J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu Pérez

(1) Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

El aborto bioquímico es una interrupción temprana en el desarrollo del embarazo. Entre las variables que se han propuesto como las causantes de los abortos bioquímicos se ha incluido tradicionalmente a las alteraciones cromosómicas embrionarias. A pesar que en los ciclos de PGT-A se transfieren embriones euploides, las tasas de aborto bioquímico no parecen verse modificadas por lo que han de existir otros factores asociados con este tipo de abortos.

### OBJETIVO:

Establecer los factores paternos, maternos y embrionarios que aumentan la probabilidad de abortos bioquímicos en embriones euploides de parejas sometidas a un ciclo de FIV-PGT-A.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se trata de un estudio observacional y retrospectivo. Se realizó un cribado cromosómico preimplantacional (PGT-A) a un total de 4752 embriones correspondientes a 1510 ciclos de FIV de parejas que acudieron a nuestras clínicas de fertilidad de enero 2017 a diciembre 2020. Se seleccionaron para el estudio los ciclos con transferencia de un único embrión (n=956). Las indicaciones para la realización del PGT-A fueron la edad materna avanzada, cariotipo o FISH en espermatozoides alterado, antecedentes de cromosopatías, abortos de repetición y fallos recurrentes de implantación.

Las células del trofoectodermo fueron biopsiadas en día 5, 6 o 7 del desarrollo embrionario. La clasificación morfológica embrionaria se realizó acorde a los criterios de ASEBIR (2015) y Gardner y Schoolcraft (1999). El análisis cromosómico se realizó mediante NGS, utilizando la plataforma de Illumina (VeriSeq Illumina®, San Diego, CA, USA). Tras la biopsia los embriones fueron vitrificados y transferidos en un ciclo posterior. La vitrificación y desvitrificación se realizaron empleando los medios de Irvine Scientific® (BioCare) en soporte cerrado CBS® (EMB).

Los resultados clínicos fueron registrados en una base de datos que recogía además variables relacionadas con los progenitores, los embriones y su biopsia, la estimulación ovárica y los tratamientos adyuvantes.

La asociación entre los diferentes variables y el aborto bioquímico se analizó mediante regresión logística binaria utilizando los softwares estadísticos SPSS (v20.0) y R (v. 4.0.3).

### RESULTADOS:

La edad media materna fue de  $32.6 \pm 6.8$  y la paterna de  $39.0 \pm 7.1$ . El 40.4% de los ciclos correspondían a ovocito donado y un 9.3 % a semen donado. Los embriones fueron mayoritariamente de calidad A (60.3%) o B (36.9%). El 11.1% de los embriones presentaban mosaicismo embrionario (porcentaje de la línea aneuploide: 25-50%). La tasa de implantación embrionaria fue del 40%, el aborto bioquímico un 9.7%, aborto clínico 6.7% y embarazo evolutivo 34.2%.

Con el objeto de determinar que factores podrían aumentar las tasas de aborto bioquímico en embriones euploides, se realizó un análisis multivariable. Las alteraciones uterinas (OR= 5.061, IC 95% [1.746-14.675], y el día de la biopsia embrionaria (OR= 2.138, IC 95% [1.375-3.325], aumentaban de forma notable el riesgo de aborto bioquímico. La edad materna (OR= 1,083 IC 95% [1.014-1.157], y el número de metafases II recuperadas tras la estimulación ovárica (OR= 1.057, IC 95% [1.013-1.103], también incrementaban el riesgo, pero en menor medida. Sorprendentemente, variables como mosaicismo, calidad embrionaria, número de células biopsiadas, los fallos previos de implantación o los tratamientos adyuvantes, no afectaban a las tasas de aborto bioquímico.

Se realizó un modelo predictivo del aborto bioquímico mediante regresión logística binaria empleando las variables que mostraban una mayor asociación estadística. El modelo final presentaba un área bajo la curva ROC (AUC) que es una medida de su capacidad predictiva, igual al 68.9%, IC 95% [63.0%-74.7%].

## CONCLUSIONES:

Las alteraciones uterinas, la biopsia embrionaria en día 6 o 7 y en menor medida la edad materna y el número de metafases

II recuperadas en la estimulación ovárica, son factores de riesgo de aborto bioquímico en ciclos de PGT-A.

## RELACIÓN ENTRE EL RUIDO (DLR-DERIVATIVE LOG RATIO) EN LOS RESULTADOS DE NGS EN PGT-A CON EL DIAGNÓSTICO DE MOSAICISMO CROMOSÓMICO EN LAS BIOPSIAS DE TROFOECTODERMO

R. Morales Sabater (1), B. Lledó Bosch (1), JA. Ortiz Salcedo (1), A. Cascales Hernández (1), J. Ten Morro (1), A. Bernabéu García (1), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1)

Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

En una biopsia de trofoblasto, al analizar simultáneamente múltiples células del embrión es posible que tengamos un resultado de mosaicismos (células con diferentes cariotipos). Existe una intensa investigación, no sólo sobre los mecanismos biológicos por los cuales se origina y se corrige el mosaicismos, sino también sobre los factores técnicos que podrían estar influyendo en su diagnóstico. Estos factores incluyen una biopsia embrionaria subóptima, DNA fragmentado, lisis celular incompleta, apoptosis de las células, presencia de inhibidores de la PCR en el medio y errores en el protocolo. Las muestras de baja calidad y los artefactos en la amplificación del DNA dan lugar a un aumento en el ruido general tras el análisis de la muestra. VeriSeq PGS, una de las plataformas más usadas para PGT-A, tiene un rango dinámico aumentado en comparación con la técnica de array-CGH, y esto hace que cuando una muestra presenta ruido, éste se vea amplificado. Existe un parámetro dentro del control de calidad de los resultados de secuenciación que mide el ruido general presente en la muestra (DLR-Derivative Log Ratio). Altos valores de DLR podrían indicar baja calidad de la muestra de DNA, o problemas durante la amplificación o la preparación de librerías.

## OBJETIVO:

El objetivo del presente estudio ha sido analizar si existe una correlación entre el ruido general de las muestras representado por el DLR y la detección de mosaicismos cromosómicos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un análisis retrospectivo de un total de 4752 resultados de PGT-A, correspondientes a biopsias de trofoectodermo de embriones en día 5, 6 o 7 de desarrollo. El PGT-A se llevó a cabo con el kit de VeriSeq (Illumina), tras la amplificación del genoma completo con la técnica Picoplex. Los datos de secuenciación

se analizaron con el software BlueFuse Multi (Illumina). Se consideró un resultado informativo cuando el DLR fue inferior o igual a 0,4, siguiendo las recomendaciones del fabricante (VeriSeq PGS-MiSeq QC Assessment Guide). Un embrión fue considerado mosaico cuando el porcentaje de aneuploidía para al menos un cromosoma fue entre 25 y 50%. El análisis de los datos se realizó mediante SPSSv20.0.

## RESULTADOS:

De los 4752 embriones analizados por VeriSeq, 189 resultaron ser no informativos (DLR > 0,4), dando una tasa de no informativos del 3,98%. Teniendo en cuenta los 4563 embriones informativos (DLR ≤ 0,4), el DLR medio fue de  $0,20 \pm 0,04$ , siendo la mediana 0,19. Por otro lado, el número de embriones mosaico fue de 871, lo que corresponde a un 18,32%. Para analizar si el porcentaje de embriones mosaico variaba en función del DLR, usamos un análisis de regresión logística, introduciendo como variables de confusión la edad materna y paterna, la calidad embrionaria y el día de la biopsia, y categorizamos el DLR utilizando como punto de corte la mediana (0,19). Observamos que el porcentaje de embriones mosaico fue de 20,4% en el grupo de embriones con DLR altos ( $\geq 0,19$ ) frente a 17,4% en el grupo de embriones con DLR bajos ( $< 0,19$ ). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,018$ ; IC 95% [1,032- 1,400]).

## CONCLUSIONES:

El ruido general (DLR) obtenido en los resultados de PGT-A usando el kit de VeriSeq si influye en el diagnóstico de mosaicismos. En las muestras que presentan mayor ruido, y por tanto mayor DLR, detectamos mayor tasa de mosaicismos, apoyando la hipótesis que el mosaicismos cromosómicos en biopsias de trofoectodermo está provocado, además de por factores biológicos, por factores técnicos que podrían dar lugar a un diagnóstico incorrecto del embrión.

## CLONACIÓN GAMÉTICA POR GENERACIÓN DE ANDROGENOTAS HUMANOS: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EDICIÓN GENÓMICA POR CRISPR-CAS9

MJ. Escribà Pérez (1), R. Bautista Llácer (2), N. Grau Grau (1), A. Oller (2), L. Escrich Albelda (1), X. Vendrell Montón (2)

(1) IVI Valencia, Fundación IVI - Valencia (Valencia), (2) Sistemas Genómicos - Paterna (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

La clonación, entendida como la multiplicación asexual de una entidad genética, provoca un intenso debate tanto en la investigación básica como en su aplicación terapéutica y clínica en humanos. La tecnología de trasplante nuclear se ha aplicado para la mejora de la calidad citoplasmática ovocitaria y para la sustitución mitocondrial completa por spindle transfer. En este contexto, presentamos una nueva aplicación: la generación de embriones androgenotas como una nueva posibilidad para la clonación del gameto paterno. Metodológicamente se basa en la microinyección espermática en ooplastos (ovocitos MII previamente enucleados), cuya ulterior activación permite el desarrollo mitótico uniparental. El estudio del desarrollo androgenota inicial (día 3) sugiere que los androgenotas están compuestos por células haploides, que pueden ser reclutadas como modelo de estudio del gameto masculino o con finalidad reproductiva.

### OBJETIVO:

Validación del modelo androgenota mediante caracterización genética (ploidía, fórmula cromosómica y fingerprinting). Adicionalmente, empleando el modelo androgenota, se explora un sistema de edición genómica basado en CRISPR-Cas9 para corregir variantes patogénicas de origen espermático.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se generaron embriones androgenotas a partir de un paciente heterocigoto para la variante patogénica c.27dupG en el gen HBB responsable de la beta-talasemia y homocigoto para el polimorfismo c.9T>C en el mismo gen. El estudio genético de los androgenotas se realizó en día 3, analizando la ploidía (fase I; n=6), fórmula cromosómica mediante aCGH (fase II; n=6) e identidad genética por estudio de polimorfismos STRs (fase III; n=18), destinando en las fases II y III al menos una célula para control de ploidía mediante FISH. La edición del genoma espermático se realizó coinyectando el espermatozoide con una mezcla de g-RNA, una secuencia de ADN donante de cadena sencilla y CRISPR-Cas9 durante la ICSI. En día 3, los androgenotas fueron analizados por secuenciación para las variantes del gen HBB (fase IV; n=32).

### RESULTADOS:

Fase I: Cada androgenota analizado mostró homogeneidad intra-androgenota en términos de ploidía, con fórmulas 23,X y 23,Y. Fase II: El estudio de aCGH en célula individual exhibió androgenotas uniformes en 4/6 (tres 23,Y y uno 46,XX), y dos aneuploides. Fase III: 9/18 mostraron el alelo normal para HBB y 8/18 el alelo mutado. Además, el análisis individual de las células constituyentes sugiere la isogenicidad de la muestra. En total, el 87.5% (35/39) fueron haploides (23,X:23,Y; 20:15), tres autodiploidizados (dos 46,YY, uno 46, XX) y un triploide 69,YY0. El 70.8% (17/24) mostró fórmulas cromosómicas 46,XX o 23,Y; siendo 47.0% (8/17) portadores de la variante patogénica. Dieciséis androgenotas con información genética completa (ploidía, fórmula cromosómica y estudio del HBB) rindieron 7 androgenotas haploides, con alelo normal HBB y 46,XX y 23,Y (3:4). Fase IV: Todos los androgenotas mostraron el polimorfismo c.9T>C. El análisis de las células individuales en 4 androgenotas mostró células isogénicas, sin quimerismo intra-androgenota. Tras la coinyección del gRNA, sc-DNA y CRISPR-Cas9 con el espermatozoide (Fase IV), 3/32 androgenotas mostraron c.27dupG (9.4%), siendo 90.6% (29/32) no portadores de la variante patogénica en HBB; un porcentaje llamativamente superior a los controles (12/23; 52.2%). Tras la secuenciación, observamos 3 grupos de respuesta, en relación a la edición: deleciones (25%), edición ineficiente (polimorfismo c.9T>C persistente; 50%) y edición eficiente (25%).

### CONCLUSIONES:

Los androgenotas mostraron la existencia de isogenicidad y autodiploidización, sugiriendo su sentido como tecnología de clonación gamética. El estudio de regiones génicas permitió establecer la segregación de variantes concretas, pudiendo corregirse mediante técnicas de edición genómica y rindiendo células únicas haploides y reparadas, aun con baja eficiencia dados los efectos off-target. Este trabajo presenta un modelo para el estudio del gameto paterno y abre la puerta a la generación preconcepción de células haploides corregidas, procedentes de varones portadores de enfermedades monogénicas.

# COMUNICACIONES ORALES

CO-029 ▶

## GENE CONVERSION IN HUMAN EMBRYOS INDUCED BY GENE EDITING

**N. Marti Gutierrez (1), D. Liang (1), Y. Lee (2), H. Ma (1), A. Koski (1), A. Mikhalchenko (1), S. Heitner (1), E. Kang (2), P. Amato (1), S. Mitalipov (1)**

(1) Oregon Health & Science University - Portland (Oregon), (2) CHA University - Gyeonggi (South Korea)

### INTRODUCTION:

DNA double strand breaks (DSBs) at specific loci can be efficiently induced by genome editing tools. Most DSBs are repaired by either non-homologous end joining (NHEJ) or homology directed repair (HDR) using synthetic DNA templates

### OBJECTIVE:

Our study aims to evaluate if DNA DSBs in human preimplantation embryos also repaired by an alternative mechanism known as gene conversion (GC), where intact endogenous homologous sequences are used as templates.

### MATERIAL AND METHOD:

Pre-tested sgRNAs and Cas9 protein were co-injected into human MII oocytes or zygotes to target heterozygous and homozygous wild-type (WT) loci. Injected embryos were cultured for 3 days and then individual blastomeres of cleaving embryos were isolated and analysed by sequencing at a single-cell level. Since gene conversion results in loss of heterozygosity (LOH)

around target region, we evaluated the presence or loss of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) adjacent to the target region.

### RESULT:

We show high frequency of GC by targeting the mutant alleles in several heterozygous loci of human preimplantation embryos. Moreover, when targeting both alleles at homozygous loci we found that 40.2% (129/321) blastomeres appeared with identical indel mutations on both parental alleles, indicating that GC and NHEJ compete and interplay with each other within the same cell. GC results in extensive loss of heterozygosity (LOH) within the targeted genomic region. In contrast to GC, frequency of HDR via exogenous synthetic DNA templates is limited.

### CONCLUSION:

Our study demonstrates that GC and NHEJ are the two major DNA DSB repair mechanisms in human preimplantation embryos. While gene conversion could be applicable for gene correction, extensive LOH presents a safety concern.

CO-030 ▶

## DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN MATERNA EN NIPGT-A MEDIANTE GENOTIPADO

**C. Pérez Pelegrín**

BIOARRAY - Elche (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

El estudio de PGT-A (de sus siglas en inglés, Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies) es una herramienta bastante extendida en reproducción asistida, que puede resultar muy beneficiosa para un perfil de parejas concreto, como son: edad

materna avanzada (> 35 años), fallo recurrente de implantación (>2 fallos de implantación) y abortos de repetición (>2 abortos). Para un estudio de PGT-A convencional, se requiere de una biopsia del embrión en estadio de blastocisto (día 5 o 6 tras fecundación), para recoger 5-8 células del trofoectodermo para su posterior amplificación de genoma completo o WGA (Whole



# COMUNICACIONES ORALES

Genome Amplification). En la última década, el estudio de PGT-A sigue la tendencia de otras áreas en medicina, un cambio hacia técnicas no invasivas. Diversos grupos internacionales han publicado estudios de concordancias entre la biopsia y su medio de cultivo respectivo, variando entre el 65 al 85%. Estos estudios ya ponen de manifiesto que la baja concordancia es resultado de una posible contaminación materna en el medio de cultivo. Esto vendría dado por la no eficiencia en la decumulación y, consecuentemente, en el embrión en crecimiento continuarán adheridas células del cúmulo. En este sentido, un estudio multicéntrico reciente, reporta una concordancia media del 75% con recogida del material no invasiva. Sin embargo, presentan una variabilidad entre centros significativa, que varía desde un 62,1% a un 85,7% de concordancia e incrementa la incertidumbre con resultados de niPGT-A de 46, XX (C.Rubio et al; 2020). Por el momento, se hace imprescindible una validación de la técnica de recogida de material por parte de cada clínica que vaya a implantar esta técnica en sus laboratorios, algo costoso y difícilmente sostenible en el tiempo. En definitiva, la contaminación materna es una fuente de variabilidad que debe ser acotada al máximo para poder aumentar el índice de concordancia entre la biopsia y el medio. Por este motivo, es necesario la búsqueda de una herramienta que permita determinar si existe alta probabilidad de contaminación materna en la muestra, que haga del niPGT-A una metodología fácilmente estandarizable y reproducible en cualquier laboratorio de reproducción.

## OBJETIVO:

Desarrollo de una estrategia, basada en genotipado por SNP (Single Nucleotide Polimorphism), de detección directa y distinción de contaminación materna para el estudio de PGT-A no

invasivo. Esta herramienta pretende ser aplicable en cualquier clínica de reproducción aumentando las tasas de concordancia entre la biopsia y medio de cultivo.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se utilizan 30 muestras de medio de cultivo embrionario procedentes de varias clínicas de reproducción asistida para su amplificación de genoma completo con WGA, con protocolo modificado internamente para esta técnica. Posteriormente este material amplificado se utiliza para hacer una amplificación dirigida para estudio de SNPs previamente seleccionados mediante software propio con selección por TagSNP, basado en herramienta PGD-SEQTM, y secuenciación por NGS (Next Generation Sequencing) en plataforma Ion Torrent. Adicionalmente, se ha desarrollado una herramienta bioinformática para la evaluación de la heterocigosidad de la muestra y detección de la probabilidad de contaminación materna.

## RESULTADOS:

Nuestros resultados indican que la aproximación a través del estudio de genotipado de SNPs, permite identificar un gran porcentaje de muestras con sospecha de contaminación materna, concretamente donde el resultado del medio de cultivo es 46, XX y la biopsia 46, XY.

## CONCLUSIONES:

La estrategia de genotipado de SNPs permite detectar la probabilidad de contaminación materna en una muestra de medio de cultivo embrionario y que, paralelamente, este protocolo sea compatible con el propio estudio de PGT-A no invasivo.

CO-031 ▶

## PERFIL Y CONDICIONES LABORALES DEL EMBRIÓLOGO CLÍNICO EN ESPAÑA

**I. Ochando Sánchez (1), MT. Sánchez Núñez (2), P. Fernández Berrocal (3)**

(1) Hospital General Universitario de Albacete - Albacete (Albacete), (2) Departamento de Psicología de la Universidad de Castilla-La Mancha - Albacete (Albacete), (3) Facultad de Psicología de la Universidad de Málaga - Málaga (Málaga)

## INTRODUCCIÓN:

Los escasos estudios previos muestran que el Embriólogo Clínico es uno de los profesionales sanitarios que más estrés sufre en el ámbito laboral, especialmente las mujeres (López-Lería et al, 2014).

En la actualidad, la especialidad en Embriología Clínica no está legalmente reconocida en España, cuestión que dificulta la prevención o intervención en la salud física y mental de estos especialistas, así como en la calidad de vida profesional incumpléndose así derechos fundamentales.

# COMUNICACIONES ORALES

Es imprescindible evaluar y conocer a fondo las condiciones laborales y las percepciones que los profesionales tienen sobre ellas, así como otras variables que puedan estar incidiendo en su estado de salud y bienestar emocional para poder llevar a cabo pautas de prevención e intervención ajustadas a sus necesidades.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio fue describir las condiciones laborales y la percepción sobre el grado de presión psicológica y calidad de vida profesional de los especialistas en Embriología Clínica, así como la descripción del perfil profesional.

## MATERIAL Y MÉTODO:

El estudio fue realizado entre noviembre de 2020 y abril de 2021. Se realizó una encuesta dirigida a todos los especialistas en Embriología Clínica en activo en España. El formulario ha sido cumplimentado por 142 sujetos hasta la fecha, en su mayoría pertenecientes al sector privado (84,51%). Del total de encuestados, 107 son mujeres y 35 son hombres con edades comprendidas entre los 24 y 60 años. Entre los instrumentos de evaluación utilizados se incluía un cuestionario sobre variables sociodemográficas y una encuesta elaborada expresamente para analizar la carga laboral, incluyendo variables relacionadas con la presión psicológica o grado de preocupación. Se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos (SPSS 20) usando los tests de Kolmogorov-Smirnov (normalidad), exacto de Fisher (variables cualitativas) y los tests t-Student y U-Mann-Whitney (medias entre grupos) según la distribución de los datos.

## RESULTADOS:

Los resultados muestran que un 80,99% de los encuestados

pertenecen a la categoría de Embriólogo Senior y el 19,01% restante a la de Embriólogo Junior. En relación a la carga laboral, los datos reflejan una media de 40,20 horas trabajadas a la semana y de dos fines de semana al mes. Además, un 52,11% de los encuestados afirma no poder descansar cuando lo necesita en el trabajo. Los análisis en función del ámbito laboral muestran diferencias estadísticamente significativas en la media de horas trabajadas a jornada completa ( $p=0,04$ ) y la media de fines de semana trabajados al mes ( $p=0,004$ ) siendo ambas variables superiores en el ámbito privado. No se han encontrado diferencias significativas en el resto de variables estudiadas.

En relación a la presión psicológica, las variables calificadas como más preocupantes en el trabajo diario son, en primer lugar, la pérdida de un preembrión en la desvitrificación (93,66%) y en segundo lugar, un mal resultado de fecundación (82,4%). Los análisis en función del género muestran diferencias estadísticamente significativas en relación a estas dos variables con valores  $p=0,038$  y  $p=0,018$  respectivamente, afectando en mayor grado a las mujeres. Además, un 50,70% de los profesionales afirma que su trabajo requiere que oculte sus sentimientos y un 63,38% de los encuestados dice no sentirse reconocido profesionalmente en relación al resto de especialistas.

## CONCLUSIONES:

Los resultados preliminares del estudio muestran una alta carga laboral de los especialistas en Embriología Clínica, especialmente en el ámbito privado, así como un alto grado de presión psicológica en el trabajo diario, más acentuado en las mujeres. Esto obliga a realizar un análisis más profundo que defina el estado de salud mental o estrés laboral y las causas principales de dicha situación con la finalidad de establecer protocolos de detección e intervención en la calidad de vida profesional de este sector.

CO-032 ▶

## ¿QUÉ OPINAN LAS PACIENTES SOBRE EL ANONIMATO DE LA DONACIÓN DE GAMETOS?

**R. Núñez Calonge (1), A. Guijarro Ponce (2), N. Santamaria (3), M. Poveda (4), P. Nieto (5), A. Sola (6), T. Rubio (7), J. Iñiguez (8), P. González (9), P. Alberola (10)**

(1) Grupo UR Internacional - Madrid (Madrid), (2) Zaida Espacio de Salud - Cuenca (Cuenca), (3) UR Mediterráneo - Almería (Almería), (4) Clínica UR Vistahermosa - Alicante (Alicante), (5) Cefiva - Oviedo (Oviedo), (6) UR Montpellier - Zaragoza (Zaragoza), (7) UR La Vega - Murcia (Murcia), (8) IMED - Valencia (Valencia), (9) Clínica La Inmaculada - Granada (Granada), (10) Hospital La Moncloa - Madrid (Madrid)

# COMUNICACIONES ORALES

## INTRODUCCIÓN:

La donación de gametos es la técnica de reproducción asistida que más ha aumentado en los últimos años en todo el mundo, siendo objeto de controversia en cuanto a los distintos problemas éticos que plantea. Una de las cuestiones más discutidas es el anonimato. En España, es apoyado por la mayoría de los profesionales de la reproducción, pero, aunque existen muchas publicaciones sobre las motivaciones y opiniones de los donantes, no existen datos en nuestro país acerca de cuál es preferencia de los pacientes sobre el anonimato y la revelación de la procedencia del material genético de sus hijos.

## OBJETIVO:

Conocer la opinión de los pacientes que han realizado algún tratamiento con donación de gametos sobre el anonimato de la donación y revelación del origen a sus hijos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio multicéntrico en 11 centros de reproducción asistida. Se entregó una encuesta a 66 pacientes de donación de gametos y todos ellos respondieron anónimamente en una escala de Likert de 7 puntos.

Se recogieron sus características sociodemográficas, sus opiniones sobre el secreto o la divulgación del modo de concepción, el tipo de información al que debería tener acceso el niño (identificativo o no identificativo) y si pretenden informar a su hijo y familiares sobre su origen.

El análisis estadístico se realizó con T-Student para muestras independientes en la comparación de los resultados de la escala de Likert tras su transformación a una escala de rango 0-1. Se utilizó T-Student de una muestra para la comparación respecto al valor neutro 0,5 en dicha escala. En ambos casos se consideró 0,05 valor significativo.

## RESULTADOS:

El perfil genérico de la población encuestada es el de mujer (86,4%), con pareja heterosexual (74,2%) de más de 39 años (51,5%), universitaria (71%), urbana (62%) y sin hijos previos (78,8%). El 48,5% recurrió a la donación de ovocitos, el 36,4% de semen y el 15,2% de embriones.

Entre las parejas homosexuales o las mujeres sin pareja el 82,4% tiene idea de contarle a su hijo y el 88,2% al menos a su círculo más próximo. Sin embargo, en las parejas heterosexuales el 60,0% no piensa contárselo a su hijo o ni se lo ha planteado y el 47,5% no piensa contarle ni a su círculo familiar más próximo.

Los pacientes no desean conocer la identidad del donante (0,279 SD:0,330  $p < 0,001$ ) y piensan que para el niño no es importante conocer el origen de los gametos (0,281 SD:0,317  $p < 0,001$ ) ni la identidad del donante (0,171 SD:0,259  $p < 0,001$ ). No creen que el donante tenga derecho a conocer la identidad de los niños concebidos con sus gametos (0,102 SD:0,220  $p < 0,001$ ) pero sí al anonimato independientemente de los deseos de los niños o los padres receptores de sus gametos (0,691 SD:0,291  $p < 0,001$ ).

En cuanto al perfil de los pacientes, el factor que en mayor medida influye en la actitud sobre el anonimato del donante de manera independiente del resto de factores es la existencia de hijos previos. Todos los encuestados que ya tienen un hijo previo son más radicales en el rechazo a la idea de que para los niños sea importante conocer el origen de los gametos ( $p:0,043$ ) o la identidad del donante ( $p:0,033$ ) o en el rechazo del derecho del donante a conocer la identidad de los niños ( $p:0,042$ ).

## CONCLUSIONES:

Los resultados de este estudio demuestran que, en general, los pacientes que realizan donación de gametos son reacios, no solo a conocer la identidad del donante, sino a revelar a sus hijos su origen.

La principal limitación de este estudio es no poder conocer la opinión de los propios niños nacidos por donación de gametos.

## REALIDAD DE LOS USUARIOS DEL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE ASEBIR EN LA EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES FRESCOS

**L. Martínez Granados (1), M. Serrano Molina (2), ML. López Regalado (1), E. Veiga Álvarez (3), B. Freijomil Díaz (4), N. Ortiz Piñate (5), L. Sánchez Castro (6), A. González Utor (7), JA. Castilla Alcalá (8), M. Iglesias Núñez (9)**

(1) Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid), (2) Clínica IFEM - Córdoba (Córdoba), (3) Hospital Clínico Universitario de Santiago - Santiago de Compostela (Coruña), (4) Institut Marqués - Barcelona (Barcelona), (5) Instituto Europeo de Fertilidad - Madrid (Madrid), (6) Hospital Universitario Central de Asturias - Oviedo (Asturias), (7) IMER Sevilla - Sevilla (Sevilla), (8) Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada), (9) Hospital Universitario Quirónsalud Madrid - Pozuelo de Alarcón (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

El programa de Control de Calidad Externo (CCEExt) en evaluación embrionaria más común, en los laboratorios de reproducción, es el basado en la participación de diversos laboratorios que miden una o más magnitudes en los mismos embriones, y en el que los resultados obtenidos por un laboratorio son comparados con los resultados obtenidos por el resto de los laboratorios participantes o con un grupo de expertos. Por tanto, permite conocer cómo están funcionando los procedimientos de un determinado laboratorio en relación con cómo funcionan en otros laboratorios. Estos programas de CCEExt constituyen la base de la transferibilidad de resultados entre laboratorios. Uno de los requisitos que un programa de CCEExt debe cumplir para que se alcancen los objetivos del mismo y los participantes puedan utilizarlo como una herramienta de mejora es que se asemeje a la práctica diaria de sus usuarios.

### OBJETIVO:

Nos proponemos analizar si el Control de Calidad Externo de evaluación embrionaria de ASEBIR (CCEExt) refleja la práctica diaria de sus usuarios.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se envió una encuesta a los 69 usuarios del CCEExt de su edición del 2019. La encuesta contenía preguntas sobre la práctica habitual de cada centro en el proceso de evaluación embrionaria en embriones en fresco y sobre aspectos que influyen en la decisión sobre el destino de los embriones cultivados. Se analizaron las respuestas de los 32 centros, que finalmente contestaron la encuesta.

### RESULTADOS:

El 81.3% de los encuestados utilizaba siempre la catalogación embrionaria propuesta por ASEBIR, frente a un 9.4% que no la utilizaba nunca. El 96.9% de los usuarios evalúa habitualmente blastocistos y el 71.9% realiza evaluación en D+2/+3 de los blastocistos que cultiva. La estrategia freeze all es realizada por el 78.2% de los usuarios en menos de la mitad de sus tratamientos. Un 40.7% utiliza alguna plataforma time-lapse para realizar evaluación embrionaria en más de la mitad de sus tratamientos y sólo la mitad de los usuarios utiliza algún algoritmo de morfocinética en alguno de sus casos. El 53.2% realiza transferencia de embrión único en más del 75% de sus transferencias.

### CONCLUSIONES:

El Control de Calidad Externo de evaluación embrionaria de ASEBIR se adapta, en gran medida, a la actividad diaria de sus usuarios. Sin embargo, la incorporación de evaluación embrionaria a través de plataformas time-lapse y la opción de elegir un único embrión a transferir, serían puntos a valorar para adaptar el control de calidad externo de ASEBIR a los nuevos tiempos.

## INFORMES DE EMBRIONES ANEUPLOIDES Y USO DEL SISTEMA INTERNACIONAL PARA LA NOMENCLATURA DE LA CITOGENÉTICA HUMANA

**L. Martínez Granados (1), P. Mir Pardo (2), E. Ferrer I Robles (3), P. Piqueras Trilles (4), E. Cano Oliva (1), M. Canales Gijón (5), M. López Regalado (1), E. Conesa Blanco (6), C. Olmedo Illueca (7), M. Iglesias Núñez (8)**

(1) Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid), (2) IGENOMIX - Valencia (Valencia), (3) CREA Centro Médico de Reproducción Asistida - Valencia (Valencia), (4) Ginemed Murcia-Valencia - Murcia (Murcia), (5) FIV4 Instituto de Reproducción Humana - Gijón (Asturias), (6) Universidad de Alcalá - Alcalá de Henares (Madrid), (7) Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (Valencia), (8) Hospital Universitario Quirónsalud Madrid - Pozuelo de Alarcón (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

Actualmente la realización de tests genéticos preimplantacionales para la detección de aneuploidías (PGT-A) mediante biopsias de trofoectodermo es bastante frecuente como técnica complementaria a las técnicas de reproducción humana asistida. La manera en la que se expresan los resultados de estas biopsias, en los informes, es fundamental para la correcta interpretación de los clínicos. Una información deficiente o con nomenclaturas no estandarizada puede poner en riesgo el resultado de un tratamiento de reproducción asistida por una incorrecta valoración del informe. De igual manera, la información trasladada a los pacientes podría ser incorrecta, si la nomenclatura de los informes generados tras una biopsia de trofoectodermo no cumple los estándares internacionales.

### OBJETIVO:

Nos proponemos conocer si los laboratorios de genética utilizan el Sistema Internacional para la Nomenclatura de la Citogenética Humana en la expresión de la carga cromosómica embrionaria al realizar dichos test.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se solicitaron informes de embriones aneuploides, a diferentes laboratorios de reproducción que era usuarios de laboratorios de genética externos. Se analizaron 15 informes de embriones sometidos a PGT-A de tres laboratorios de genética españoles.

### RESULTADOS:

Se encontraron tres tipos de estructuras para expresar la carga cromosómica anormal. Para el laboratorio 1: tipo de aneuploidía (monosomía, trisomía, tetrasomía o nulisomía) seguida del cromosoma afecto; para el laboratorio 2: número de cromosomas totales, seguida de las siglas que indican la carga cromosómica sexual normal o anormal, seguidas de la falta (-) o aumento (+) de algún cromosoma y para el laboratorio 3: expresión de la carga cromosómica sexual normal o anormal y de manera independiente, la expresión de la carga cromosómica autosómica, expresada como la falta (-) o aumento (+) de algún cromosoma. Al comparar los tipos de estructura utilizadas por los laboratorios y la propuesta estandarizada internacional, solo el laboratorio 2 adapta su nomenclatura a la propuesta estandarizada.

### CONCLUSIONES:

Se ha puesto de manifiesto la variabilidad existente en la terminología utilizada para expresar la carga cromosómica embrionaria por parte de los laboratorios de genética y la baja implantación del Sistema Internacional para la Nomenclatura de la Citogenética Humana en los informes de embriones aneuploides. El uso de terminología estandarizada permitiría evitar confusiones en la interpretación de los informes y aumentar la seguridad de los pacientes.

## EL TAMAÑO NO IMPORTA: ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA ELECTRÓNICO DE TESTIGO Y TRAZABILIDAD EN UN CENTRO DE RA, INDEPENDIEMENTE DEL NÚMERO DE CICLOS QUE REALICE

**N. Ortiz Piñate, C. de la Cruz Suárez**

Instituto Europeo de Fertilidad - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

La incorporación de los sistemas automatizados de trazabilidad en un centro de RA, se han planteado en la mayoría de los casos en centros de gran volumen de ciclos/año. Estos sistemas permiten monitorizar todos los pasos realizados en cada procedimiento del laboratorio de RA, estableciendo un registro completo del ciclo de cada paciente.

### OBJETIVO:

Validar la incorporación de un sistema automatizado de trazabilidad en un centro de RA con un número "medio" de ciclos/año y con un personal de laboratorio de 2 embriólogos, con horarios laborales diferentes. Repercusión en la calidad del servicio prestado a los pacientes.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se incorpora un sistema automatizado de trazabilidad por radio frecuencia (RI Witness TM) en el año 2017 y se analizan de forma retrospectiva los datos arrojados por el sistema hasta abril de 2021.

Con la instalación del RI Witness, se diseña un algoritmo de trabajo que incluye todas las etapas de cada procedimiento del LRA. Se realiza doble y triple testigo en los pasos de mayor riesgo de matching (ej. FIV-ICSI, biopsia-DGP.)

En ese periodo de tiempo, 834 pacientes realizaron algún tratamiento del laboratorio (IA, FIV, TEC.), equivalente a 1618 ciclos. El sistema contabiliza el total de mismatches y queda registrado el motivo del mismo. Los motivos de los mismatches se clasificaron en distintas categorías:

- Comunicación entre personal externo al laboratorio (enfermería) y el mismo (ej. introducción de la tarjeta de ID del paciente en el quirófano, sin previo aviso al laboratorio).
- Áreas de trabajo mal despejadas (ej. 2 placas/tubos de pacientes distintos cercanos a los lectores, descarte incorrecto de placas ya fuera de uso).

- Fallo en aplicación del algoritmo de trabajo establecido previamente en el witness (ej. paso de los ovocitos de la placa de la donante a la placa de la receptora asignada).

- Riesgo verdadero de mismatch (ej. cambio de gametos/embriones con placas de distintas pacientes)

### RESULTADOS:

De enero de 2017 a abril de 2021, se registran 12169 puntos de witness y se identifican 67 mismatches (0.55%). Corresponden a un error de comunicación entre el personal, el 0.12% (n=15); a áreas de trabajo mal despejadas, un 0.30% (n=37); fallo en la aplicación del algoritmo de trabajo, el 0.08% (n=10); y a un riesgo verdadero de mismatch el 0.04% (n=5).

También analizamos el número de mismatches en distintos periodos de tiempo, observándose una reducción significativa de los mismos con el tiempo de uso e integración en el sistema de trabajo del laboratorio (2017-2018: se registran el 73.1% del total de mismatches de todo el periodo analizado (49/67); 2019: 13, 4% (9/67); 2020-abril 2021: 13, 4% (9/67).

### CONCLUSIONES:

Hemos validado la integración de un sistema automatizado de trazabilidad, que al advertirnos de un posible mismatch, nos permite realizar una intervención correctiva inmediata, garantizando la seguridad del paciente. Debido a la estructura de nuestra unidad, en la que por lo general está un solo embriólogo en el laboratorio en cada turno de trabajo, resulta indispensable contar con una herramienta como esta.

La introducción de este sistema, ha conllevado un periodo de aprendizaje y control de calidad. Se observa como el número de mismatches va disminuyendo por años de utilización, aunque es prácticamente imposible evitar el error humano. Existen muchos factores externos que facilitan la pérdida de concentración del embriólogo (carga de trabajo, interrupciones dentro del laboratorio, etc.), pudiendo ocasionar estos mismatches. En este sentido, es indispensable que haya una implicación del resto de la unidad de RA.

## EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ACEITE MINERAL Y DEL DISEÑO DE PLACA EN LA ESTABILIDAD DE LA TEMPERATURA Y OSMOLALIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO

**D. González Abreu (1), C. Miret Lucio (1), M. Benavent Martínez (1), A. García Esteve (1), M. Escribá Suárez (1), E. Mestres Gonzalvo (2), N. Costa Borges (2), G. Calderón de la Olla (2), J. Crespo Simó (1), J. Teruel López (1)**  
(1) Equipo Juana Crespo - Valencia (Valencia), (2) Embryotools - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

El correcto desarrollo embrionario depende en gran medida de las condiciones de cultivo in vitro. Diferentes parámetros como la osmolalidad del medio de cultivo, la temperatura y humedad ambiental, y la temperatura de los equipos del laboratorio, deben mantenerse estables ya que juegan un papel esencial en el correcto desarrollo embrionario. Estas variables, además, no actúan solamente de forma individual, sino que pueden interactuar entre sí. Los incrementos de osmolalidad, derivados de la evaporación del medio, pueden verse incrementados debido a altas temperaturas y, en cambio, pueden paliarse mediante altos niveles de humedad. Factores externos, como el volumen y tipo de aceite mineral usado y, el diseño de placa de cultivo, pueden también afectar a la estabilidad de las condiciones del sistema de cultivo.

### OBJETIVO:

Evaluar la variación de la osmolalidad y de la temperatura del medio de cultivo, según el tipo de aceite mineral y del diseño de placa empleado durante el cultivo embrionario.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se definieron grupos experimentales basados en la combinación de tres tipos de aceite mineral de distinto grado de viscosidad (de menor a mayor: Parafina, Lite y LifeGuard®; LifeGlobal), con dos diseños de placas de cultivo (placas de Petri de 35mm de diámetro [Oosafe] y placas con pocillos predefinidos y contacto directo entre su base y las superficies calefactadas [MiniGPS®, LifeGlobal]). Las placas se prepararon con 5ml de aceite y gotas de 50µl de medio de cultivo único (Vitrolife), y se incubaron en un incubador de sobremesa con atmósfera seca (AD-3100, Astec), durante 7 días a 37.3°C y 6.5% de CO<sub>2</sub>. La osmolalidad del medio se midió diariamente mediante un osmómetro de punto de congelación (Osmo1®, Advanced Instrument, con precisión  $\leq 2$ mOsm/Kg). Adicionalmente, se registró la variación de la temperatura que experimentaban los distintos grupos, al sacar las placas del incubador y ubicarlas en la campana calefactada de trabajo. La temperatura se registró cada 30 segun-

dos, durante 10 minutos, mediante un termopar de calibre fino (Okolab, con precisión de  $\pm 0.12^\circ\text{C}$ ). Paralelamente, se monitorizó la temperatura de la superficie calefactada mediante un termologger (38.43 $\pm$ 0.19°C; iButtons, Brightsentinel, con precisión  $\pm 0.05^\circ\text{C}$ ). La temperatura y humedad de la sala fue registrada mediante un sistema de monitorización continua (21.48 $\pm$ 0.63°C y 47.98 $\pm$ 6.42%, Octax Log&Guard, Vitrolife).

El análisis estadístico se realizó mediante t-student y Anova.

### RESULTADOS:

En todos los grupos experimentales se observó variación de la temperatura y evaporación del medio de cultivo. No obstante, observamos como determinadas combinaciones de placa y tipo de aceite, contribuyeron a minimizar estas variaciones. Las placas con pocillos predefinidos presentaron una menor evaporación que las placas Petri, con un incremento de osmolalidad de 15.56 y 17.89mOsm/kg, respectivamente, entre día 0 y 7 ( $p=0.007$ ). Del mismo modo, las placas con pocillos sufrieron un menor descenso de temperatura que el observado en las placas Petri ( $p<0.001$ ), y también se vio afectado por el tipo de aceite usado, Parafina, Lite o LifeGuard® (Pocillos: 0.5°C, 0.4°C, 0.1°C; Petri: 0.93, 0.95, 0.63°C, respectivamente) ( $p=0.012$ ). Asimismo, se observó como la viscosidad del aceite influyó significativamente sobre el incremento de la osmolalidad durante el cultivo (19.2mOsm/kg, 16.3mOsm/kg y 14.7mOsm/kg en aceites de baja, media o alta viscosidad, respectivamente ( $p=0.009$ )).

### CONCLUSIONES:

Nuestros resultados confirman que tanto el tipo de aceite como el tipo de placa usados durante el cultivo embrionario, así como la combinación de ambos, pueden alterar, en beneficio o detrimento, la estabilidad del sistema de cultivo in vitro. La combinación de la placa con pocillos predefinidos MiniGPS®, junto al aceite mineral de alta viscosidad, LifeGuard®, ha mostrado la mayor competencia en cuanto al mantenimiento de la temperatura y la osmolalidad durante periodos de hasta 7 días de incubación. Estos factores pueden tener un gran impacto en el desarrollo y la calidad embrionaria, así como en los resultados clínicos.



**COMUNICACIONES  
PÓSTERS**



## EDICIÓN DEL GENOMA "IN VIVO" MEDIANTE CRISPR/CAS9

**S. Lucas Toca (1), C. Ochoa Marieta (1), M. Ros Lasiera (2)**

(1) CER Santander - Bezana (Cantabria), (2) IBBTEC-CSIC-UC - Santander (Cantabria)

### INTRODUCCIÓN:

Con el objetivo de curar las enfermedades causadas por mutaciones genéticas, la investigación biomédica ha buscado métodos que permitieran la modificación del ADN, la llamada edición genómica. Los primeros intentos se basaron en el descubrimiento de las endonucleasas de los dedos de zinc (ZNF) y las nucleasas ligadas a los activadores de transcripción (TALEN), aunque el diseño y aplicación de estos sistemas era complicado. Recientemente, el descubrimiento de la tecnología CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas) ha supuesto una gran revolución ya que permite la edición deseada del genoma con una eficiencia sin precedentes.

En este proyecto, hemos aplicado la técnica del CRISPR/Cas9 en cigotos para la generación de modelos animales de enfermedad. Los modelos animales constituyen una herramienta inestimable para el estudio de enfermedades humanas ya que permiten caracterizar y comprender la enfermedad y ensayar posibles procedimientos terapéuticos.

### OBJETIVO:

Generar modelos murinos de malformaciones de la extremidad mediante el sistema CRISPR/Cas9. Comprender el desarrollo de la extremidad y su control genético.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Hemos editado el ADN de cigotos de ratón mediante electroporación. Gracias al diseño del último electroporador, NEPA 21, el procedimiento es mínimamente invasivo. Se han usado cigotos híbridos B6/CBA que han sido transferidos a hembras CD1 pseudogestantes después de la electroporación. El análisis genómico se ha realizado mediante secuenciación de Sanger.

### RESULTADOS:

Las células tienen diferentes mecanismos de reparación para este daño generado. Gracias a la inserción y delección de nucleótidos, podremos generar los modelos knock-out, y si introducimos una secuencia diseñada por nosotros con unos brazos de homología, se producirá la recombinación homóloga insertándose la secuencia diseñada en el genoma y generando así modelos knock-in.

Se ha generado un modelo de sindactilia para estudiar esta enfermedad (OMIM602570). Para ello, se ha generado la pérdida de función del gen Jagged2 mediante CRISPR/Cas9, dirigiéndose al exón 4 del gen dando lugar a la delección de 41nt y produciendo una ruptura en la pauta de lectura de este en el dominio delta-serrate ligand (DSL) de la proteína.

Para entender la patogénesis de la enfermedad uña-rótula (OMIM 161200), causada por el gen Lmx1b, se han generado delecciones de la secuencia de los enhancers de dicho gen, que reproducen la enfermedad. Para ello, hemos realizado dos cortes en el ADN.

Finalmente, para facilitar las técnicas de análisis del gen Hoxa13, crucial en el desarrollo embrionario, hemos modificado la proteína Hoxa13, mediante la adición de un tag sin pérdida de función. La eficiencia de la técnica es de un 50%.

### CONCLUSIONES:

Se ha conseguido con éxito la edición del genoma de una manera sencilla y rápida. La aplicación del CRISPR/Cas9 en cigotos mediante una técnica mínimamente invasiva, como es la electroporación con NEPA21, para la generación de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas es muy eficaz.

## ¿QUÉ SABEN LAS DONANTES SOBRE SU SALUD REPRODUCTIVA?

**N. Santamaría Mollá (1), R. Núñez Calonge (2), JA. Guijarro (3), L. Del Águila Ramos (1), R. López (4), I. Barros (5), A. Sola (6), S. Montero (7), T. Rubio (8), J. Íñiguez (9)**

(1) UR Mediterráneo - Almería (Almería), (2) UR International Group - Madrid (Madrid), (3) Hospital Virgen de la Luz - Cuenca (Cuenca), (4) UR Vistahermosa - Alicante (Alicante), (5) Cefiva - Oviedo (Oviedo), (6) UR Montpellier - Zaragoza (Zaragoza), (7) UR Puerta del Sur - Jerez de la Frontera (Cádiz), (8) UR La Vega - Murcia (Murcia), (9) UR Imed - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

La esterilidad afecta aproximadamente al 15% de la población en edad reproductiva, es decir a jóvenes; sin embargo, la información que tienen las jóvenes de esa edad en cuanto a la fertilidad puede ser insuficiente. Las donantes de gametos, son un grupo especialmente involucrado en la salud reproductiva puesto que ayudan a muchas personas a solucionar sus problemas reproductivos, sin embargo, no existen muchos estudios en España que aborden el conocimiento de las donantes acerca de ella. Los resultados del estudio realizado nos muestran que las donantes son conscientes de que existen dificultades acerca de la fertilidad, pero los conocimientos acerca de su salud reproductiva son insuficiente.

### OBJETIVO:

Nuestro objetivo es saber el conocimiento de las donantes sobre su salud reproductiva y fertilidad.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Hemos realizado un estudio prospectivo, transversal y multicéntrico que incluye donantes de ovocitos de 10 clínicas de reproducción asistida diferentes, en las cuáles se realizan tratamientos de donación de gametos en España.

El estudio ha durado 2 meses (septiembre-octubre del 2020), con una muestra de 63 donantes de ovocitos de entre 19 y 35 años, de las cuales el 78% no habían donado antes.

El cuestionario tiene 41 preguntas divididas en tres partes: características sociodemográficas (11 preguntas), conocimientos sobre fertilidad (22 preguntas) y un cuestionario en escala para determinar la información que tienen sobre su salud reproductiva, así como los riesgos acerca de su fertilidad (8 preguntas).

Se ha realizado una estadística descriptiva, una chi cuadrado con un valor significativo de 0,05.

### RESULTADOS:

En las encuestas, el 96,8% de las donantes conocían las dificultades que existen en cuanto a la fertilidad. El aumento de la edad de las mujeres fue evaluado por las donantes como un riesgo decisivo para la fertilidad. Se encontró que existía una disminución en cuanto al conocimiento de cuándo disminuye la fertilidad, el 39,7 % piensan que disminuye entre los 35-40 años y un 30% piensan que disminuye entre los 40-45 años; pero al mismo tiempo un 66% indicaban que se debería preservar la fertilidad antes de los 35 años. Existe una diferencia significativa entre donantes universitarias y no universitarias, las primeras, un 92,6 % (p: 0,034) afirmaban que la fertilidad de las mujeres disminuye conforme la mujer envejece y por ello, el número y calidad de los ovocitos, mientras que entre las donantes no universitarias sólo lo afirmaban un 61,1%. Sólo el 47% de las participantes entendían lo que es la reserva ovárica y el 47,6% piensan que se crean nuevos ovocitos cada mes.

En cuanto, a los factores de riesgo involucrados en la fertilidad, todas mencionan el estilo de vida como algo condicionante (91,2%), otro factor de riesgo destacado son los tratamientos de quimioterapia/radioterapia (83,8%) y el tabaco, alcohol y otras drogas (82,4%). Por último, hay una diferencia entre las donantes universitarias y no universitarias en cuanto a cómo influye el índice de masa corporal, entre las primeras el 88,9% lo ven como un riesgo y las donantes no universitarias solo un 61% piensan que es algo significativo (p:0,012).

### CONCLUSIONES:

El estudio revela que existe una falta de información entre las donantes de ovocitos acerca de su salud reproductiva, lo cual no sólo es importante para el éxito de los planes de prevención, sino que nos permitirá abordar nuevas estrategias para evitar futuros problemas reproductivos.

Limitaciones: Tras realizar el estudio, se ha determinado que la compensación económica es un factor clave a la hora de donar, habría que estudiar un poco más a fondo este factor.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

Edad donante	Nº ovocitos recuperados	Nº ovocitos maduros asignados	Valor predicho de embarazo al finalizar el ciclo	Límite de Conf. Inferior (95%)	Límite de Conf. Superior (95%)
18-29	<20	≥8	0.7422	0.5995	0.8471
18-29	≥20	≥8	0.6082	0.4551	0.7425
30-35	<20	≥8	0.5723	0.3789	0.7458
18-29	<20	5-7	0.5671	0.4461	0.6806
18-29	<20	3-4	0.5063	0.3106	0.7001
30-35	≥20	≥8	0.4190	0.2524	0.606
18-29	≥20	5-7	0.4139	0.2817	0.5597
30-35	<20	5-7	0.3784	0.2328	0.5498
18-29	≥20	3-4	0.3560	0.1786	0.5843
30-35	<20	3-4	0.3228	0.1590	0.5458
30-35	≥20	5-7	0.2470	0.1316	0.4154
30-35	≥20	3-4	0.2044	0.0843	0.4175

P-003 ▶

## CHARACTERIZATION OF OVARIAN FOLLICULAR RESUMPTION AFTER DRUG-FREE IVA IN PRIMARY OVARIAN INSUFFICIENCY PATIENTS

M. Méndez Justo, JM. Calafell Pozo, J. Ferreri Dos Anjos, S. Cívico Vallejos, D. Manau Trullàs, F. Fabregues Gasol.

Hospital Clínic de Barcelona - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCTION:

Primary ovarian insufficiency (POI) occurs when the ovaries stop functioning normally and patients start to have menopausal symptoms before age 40. Despite having a few remaining follicles, their only chance for bearing a baby nowadays is through egg donation.

Distinct studies have been focusing on the determinants and intracellular signaling pathways involved in the activation of primordial follicles, as the maintenance of a correct ovarian reserve will depend on a balance between activating and inhibiting factors (1).

A method for the activation of dormant follicles using in vitro culture of ovarian fragments treated with PI3K stimulators and

PTEN inhibitors in mice and human has been recently developed. Other studies suggested that ovarian fragmentation could interfere with the ovarian Hippo signaling pathway, resulting in ovarian follicle growth. Kawamura et al. (2) combined these two methods in an in vitro activation (IVA) strategy to treat infertility in patients with POI.

Furthermore, it has been proposed that the IVA approach could be used in patients with diminishing ovarian reserve and early stage of POI. As these patients have spontaneous activation of dormant primordial follicles reaching the secondary stage, secondary follicle growth could be promoted in these patients using drug-free IVA without tissue culture. For patients whose ovaries still contain residual secondary follicles, it is likely that, the fragmentation step alone, which implies an Hippo signaling pathway disruption, is sufficient to promote follicle growth (3).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJECTIVE:

To analyze predictive factors for ovarian follicular resumption after Drug-Free IVA in POI patients.

## MATERIAL AND METHOD:

Prospective observational cohort study in a tertiary-care university hospital. Thirty-two patients who underwent Drug-Free IVA by laparoscopy between January 2018 and December 2019 together with a follow-up of one year.

Ovarian function was defined as resumption of menstrual cycles (at least three consecutive episodes of menstrual bleeding) or the presence of follicles > 10 mm on ultrasound. Early and late ovarian follicular resumption were analyzed.

Resumption of ovarian function was determined and predictive factors were identified by multivariate analysis using R software version 4.0.5.

## RESULTS:

Resumption ovarian activity was observed in 22 patients (68.75%), while it was early in 12 and late in 10. A total of 5 pregnancies (22.7%) were achieved with 4 live births and one miscarriage. The multivariate logistic regression confirmed that duration of amenorrhoea was the only variable that could

predict ovarian activity resumption (OR:0.27; 95%CI: 0.11-0.78). However, neither age, hormonal parameters and the presence of residual follicles in the biopsy predicted the ovarian activity resumption after Drug-Free IVA

## CONCLUSIONS:

Drug-Free IVA is a feasible option to be offered to POI patients mainly in those patients with recent POI

## BIBLIOGRAPHY:

(1) Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJ. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 1;107(22):10280-4. doi: 10.1073/pnas.1001198107. Epub 2010 May 17. PMID: 20479243; PMCID: PMC2890455.

(2) Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(43):17474-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110>.

(3) Fabregues F, Calafell JM, Manau D, Borrás A, Peñarrubia J, Casals G, et al. Pregnancy after orthotopic ovarian tissue transplantation using N-hexyl-2-cyanoacrylate. *J Endometr Pelvic Pain Disord*. 2017;9(3):216-21. <https://doi.org/10.5301/jeppd.5000288>.

P-004 ▶

## PROTEÍNAS SÉRICAS COMO PREDICTOR DE LA CALIDAD EMBRIONARIA

J. Torres Hernández, M. Torres Serrano, M. Sánchez Toledo, C. García Garrido, L. Navarro Casado, I. Ochando Sánchez

Hospital General Universitario de Albacete - Albacete (Albacete)

## INTRODUCCIÓN:

La "medicina personalizada" supone un cambio de paradigma en la toma de decisiones atendiendo al estado particular del paciente. Cada vez es más habitual intentar establecer algoritmos y técnicas con capacidad predictiva (time-lapse, diagnóstico genético preimplantacional...), preferiblemente de carácter no invasivo, que permitan optimizar los protocolos terapéuticos ya establecidos.

Existen diversas patologías de origen gastrointestinal, renal o inflamatorio, así como el propio estilo de vida, capaces de alterar parámetros bioquímicos (determinables de forma rutinaria), que podrían afectar a la calidad embrionaria.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es establecer posibles indicadores

# COMUNICACIONES PÓSTERS

predictivos de la calidad embrionaria en base a parámetros bioquímicos séricos de uso habitual, previos al proceso de punción ovárica, que permitan diseñar protocolos preventivos personalizados en pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se ha llevado a cabo un estudio observacional retrospectivo en mujeres sometidas a tratamiento de reproducción asistida entre enero de 2015 y diciembre de 2019. Se seleccionaron un total de 2667 embriones (con 2PN y 2CP en D+1) fertilizados mediante ICSI, procedentes de ovocitos propios de 451 pacientes. Para cada parámetro bioquímico se estudiaron aquellos embriones que poseían observaciones de fragmentación en D+2 y/o D+3 (considerando el mayor porcentaje de fragmentación entre ambos días), y además un periodo inferior a 15 días entre la punción ovárica y la determinación bioquímica. Se analizaron los perfiles de proteínas totales (162 embriones), albúmina (57), colesterol (22), triglicéridos (22), LDL (13) y HDL (13).

Los datos obtenidos se analizaron usando el software estadístico R. Se compararon los valores medios de cada parámetro tras clasificar los embriones con una fragmentación  $\leq 5\%$  como "no fragmentados", o con fragmentación  $>5\%$  como "fragmentados". También se realizaron análisis mediante regresión lineal ordinaria y robusta (Trimmed Least Squares).

## RESULTADOS:

En cuanto al perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total y subfracciones) no se observó relación entre los niveles séricos y la fragmentación embrionaria ( $p$  muy superior a 0.05 en todos los casos).

Respecto al perfil proteico, no se observó asociación con el contenido sérico de albúmina ( $p=0.47$ ), pero sí con la concentración de proteínas totales. El valor medio proteico de los 55 embriones "no fragmentados" (34%) fue de 7.23 g/dl, y el de los 107 "fragmentados" (66%) fue de 6.98 g/dl ( $p=7.0\cdot 10^{-4}$ ).

Del estudio de regresión robusta se refleja una asociación inversa, de fuerza moderada ( $R^2 = 0.11$ ) aunque muy significativa ( $p=3.2\cdot 10^{-5}$ ) entre las dos variables, observándose un descenso medio de la fragmentación embrionaria de un 7.88 % por cada g/dl que aumentan las proteínas séricas.

Cabe destacar que la mayoría de los embriones (84 %) procedían de pacientes con valores de proteínas dentro del intervalo de referencia.

## CONCLUSIONES:

La relación observada entre la baja concentración sérica de proteínas totales y la mayor fragmentación embrionaria supone una potencial herramienta predictiva de la calidad embrionaria. Por tanto, es importante la detección de causas de hipoproteïnemia potencialmente corregibles (enteropatías con malabsorción, celiaquía, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dietas estrictas...) que puedan suponer una mejora en el rendimiento de los tratamientos de fecundación in vitro. Adicionalmente, la calidad embrionaria puede presentar una variación destacable incluso en ausencia de patologías, con valores de proteínas séricas dentro del rango de la normalidad. La ausencia de relación significativa observada en el perfil lipídico puede ser debida al bajo tamaño muestral. Por todo ello sigue siendo necesario realizar estudios adicionales (tanto en mujeres como en varones) capaces de ampliar la cantidad de parámetros bioquímicos y el tamaño muestral, con el fin de aumentar la capacidad predictiva de la calidad embrionaria.

P-005 ▶

## LA ECLOSIÓN ASISTIDA COMO ALTERNATIVA PARA LA MEJORA DE LOS RESULTADOS EN BLASTOCISTOS CON COLAPSO ESPONTÁNEO EVALUADO MEDIANTE SISTEMAS TIME-LAPSE

**A. Mifsud Giner, A. Tejera Pastor, MJ. de los Santos Molina, A. Valera Cerdá, L. Alegre Ferri, M. Meseguer Escrivá.**  
MIRMA-VLC - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

Todavía no ha sido encontrada la causa de porque se produce el fenómeno del colapso durante el desarrollo embrionario. La idea de que es un mecanismo biológico necesario para que el

embrión pueda salir de la pelúcida (ZP) y así completar la eclosión ha sido recientemente cuestionada (Marcos et al. 2015). Mediante sistemas de time-lapse hemos observado que alrededor de un 20% de los embriones colapsan y el colapso reduce de manera significativa su potencial de implantación (Sciorio et al. 2020).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

Demostrar si la disminución de la implantación tras sufrir al menos un episodio de colapso, puede ser mejorada/revertida mediante la realización de una eclosión asistida en embriones que han sido desvitrificados para su transferencia.

## MATERIAL Y MÉTODO:

De manera retrospectiva se han analizado un total de 609 blastocistos cultivados en incubadores de time-lapse. La presencia del colapso se detectó en los videos existentes previos a la descongelación de los embriones. El colapso fue identificado cuando se producía una separación de más del 50%, de la superficie de las células del trofotodermo de la ZP. El AH se realizó mediante láser eliminando ¼ de la ZP del embrión. Los blastocistos se clasificaron en 4 grupos: los dos primeros grupos incluyeron a los blastocistos que colapsaron, subdividiéndose en los que se realizó el AH (COLAP-AH) y en los que no (COLAP-NO AH). Para saber si las diferencias se debían únicamente al efecto del AH, evaluamos el efecto del AH introduciendo 2 nuevos grupos de estudio en embriones no colapsados con y sin AH (NO COLAP- AH y NO COLAP-NO AH, respectivamente). Las tasas de gestación y de implantación fueron analizadas y comparadas mediante el test X2.

## RESULTADOS:

Dentro el grupo de embriones de D5 de desarrollo (85% del total) que colapsan, cuando realizamos el AH (143), se incrementan de un modo estadísticamente significativo las tasas de gestación al compararlas con el grupo de embriones colapsados a los que no les realizamos el AH (153), 60.1% vs 47.7%. ( $p=0.032$ ). Cuando analizamos todos los embriones (D5+D6) encontramos una mejora al realizar el AH, aunque estas diferencias no fueron significativas. Al centrarnos en el grupo de blastocistos en D5 de desarrollo que no colapsaron, vimos que el AH también mejoraba las tasas de gestación, aunque este incremento no alcanzó significancia estadística, 60.7 % (117) vs 53.7% (108). ( $p=0.290$ ). Hemos obtenido la misma tendencia al analizar la tasa de implantación de los embriones KID al realizarles el AH, 45.08% vs 34.51% ( $p=0.072$ ) aunque probablemente debido al tamaño muestral estas diferencias no alcanzaron diferencias significativas.

## CONCLUSIONES:

Tras los resultados obtenidos y a pesar del efecto nocivo del colapso en el potencial reproductivo del embrión, hemos encontrado una herramienta que podría revertir, o al menos igualar, el potencial reproductivo del embrión que colapsa al de aquellos embriones que no presentan colapso. Sería interesante incorporar esta herramienta en la selección embrionaria de nuestros laboratorios para mejorar nuestras tasas de gestación e implantación y optimizar los resultados.

P-006 ▶

## DESARROLLO DE UN NUEVO DISPOSITIVO PARA LA DENUDACIÓN AUTOMATIZADA DE OVOCITOS Y EMBRIONES BOVINOS

**J. Guerrero Sánchez (1), Y. Cabello (1), G. Fernández Blanco (1), J. Fidalgo (1), P. Carasa (1), L. Matthys (1), P. Belchin (2), JA. Horcajadas (1), S. Munné (1)**

(1) Overture Life - Madrid (Madrid), (2) Hospital Ruber Juan Bravo Quirón Salud - Madrid (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, existe una gran variabilidad en los resultados clínicos obtenidos por diferentes embriólogos y laboratorios debido a la falta de estandarización de determinados procesos. En las últimas dos décadas, las tecnologías basadas en dispositivos microfluídicos han demostrado tener un gran potencial, habiendo sido implementadas con éxito en varios de los procedimientos de la fecundación in vitro. A pesar de los avances, la integración de tecnología microfluídica rara vez ha sido aplicada para mejorar el

procesamiento de ovocitos y cigotos, los cuales, a día de hoy, han de ser denudados manualmente para facilitar su manipulación y evaluación morfológica.

## OBJETIVO:

La automatización del proceso de denudación o decumulación de complejos cúmulo-ovocito (COCs) está relacionada con la probabilidad de reducir la variabilidad entre laboratorios y embriólogos, aumentando las tasas de éxito y facilitando procesos tales como la congelación de ovocitos y embriones, la Inyección

# COMUNICACIONES PÓSTERS

intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la transferencia nuclear o la valoración morfológica tanto de ovocitos como de cigotos. La denudación permite manipular mejor el ovocito y observar claramente su estructura (zona pelúcida, espacio perivitelino, membrana citoplasmática y citoplasma). Gracias a esto último, es posible clasificar los ovocitos de acuerdo con su estado de madurez nuclear, predecir la tasa de desarrollo embrionario e implantación y evitar la contaminación de ADN para pruebas no invasivas de análisis embrionario (NI-PGT y metabólica). Además, el desarrollo de un dispositivo microfluídico con geometrías optimizadas que aseguren la completa denudación, puede evitar el excesivo estrés mecánico y mejorar la comprensión de los mecanismos biomecánicos de este proceso.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Para llevar a cabo la denudación, desarrollamos un biochip microfluídico que ejercía un movimiento dinámico sobre el ovocito o embrión al mismo tiempo que evitaba el atrapamiento de las muestras biológicas dentro de los canales microfluídicos. La eficacia del proceso se estableció mediante puntuación subjetiva de las imágenes de los ovocitos o embriones tomadas después de cada protocolo microfluídico. Un total de 192 COCs bovinos fueron utilizados debido a su similitud de tamaño con los COCs humanos. La mitad se denudaron entre 16 y 20 horas después de la inseminación y la otra mitad antes de la inseminación durante 5-10 minutos. Los COCs se clasificaron como parcialmente denudados cuando era posible la evaluación de la fertilización, la ICSI o la vitrificación, y completamente denudados cuando no quedaban células del cúmulo. Los controles se denudaron manualmente (capilar Stripper® 145µm ID) para comparar el estrés mecánico entre ambos procedimientos.

## RESULTADOS:

Los 96 COCs bovinos fueron manipulados microfluidicamente después de la inseminación logrando la eliminación completa (56/96) o parcial (40/96) de las células del cúmulo en día 1, mientras que para el grupo de doble denudación en día 3, 89/96 (92,7%) fueron completamente denudados y el resto permanecieron parcialmente denudados. En comparación, 80/80 (100%) de los COCs denudados manualmente, lograron una denudación completa (50% grupo postinseminación y 50% grupo preinseminación). Además, 68/96 (70,8%) de los COCs del grupo preinseminación fueron parcialmente denudados, lo suficiente para llevar a cabo la ICSI después de 5-10 minutos de tratamiento. El estrés mecánico calculado fue inferior a 4,4 Pa, unas diez veces menor que el aplicado por el proceso manual (~44Pa).

## CONCLUSIONES:

La denudación completa es clave para evitar la contaminación del ADN en el análisis no invasivo de los embriones (NI-PGT o metabólica). La creación de un sistema automatizado tiene como función la estandarización del proceso y evitar el estrés mecánico. El éxito del procedimiento está basado en el diseño de los pocillos del biochip y el protocolo microfluídico utilizado. No obstante, nuestro dispositivo, que tiene el potencial de escalar y tratar cada ovocito individualmente, puede mejorar la automatización y aumentar la eficiencia de los procedimientos actuales en reproducción asistida.

P-007 ▶

## INFLUENCIA DEL CULTIVO EMBRIONARIO EN GRUPO FRENTE AL CULTIVO EMBRIONARIO INDIVIDUAL EN LA CALIDAD Y LA TASA DE FORMACIÓN DE BLASTOCISTOS: ESTUDIO PILOTO

**M. Herreros Hergueta, L. Martí Ferri, N. Díaz Hernández, MC. Tió Marquina, A. Rodríguez Arnedo, J. Guerrero Villena, JA. Ortiz Salcedo, J. Ten Morro, R. Bernabéu Pérez.**

Instituto Bernabéu Alicante - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

El cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto es una práctica común en la mayoría de laboratorios de reproducción asistida. Existen dos estrategias diferentes para el cultivo embrionario,

individual o en grupo. Varios autores señalan que el cultivo embrionario en grupo podría ayudar a los embriones con menor potencial a que consigan desarrollarse mediante señales paracrinas y alcancen la fase de blastocisto. Por otro lado, otros autores sostienen que el cultivo individual favorece el desarrollo embrionario,

# COMUNICACIONES PÓSTERS

pues así no hay competición por los diferentes componentes del medio de cultivo. Por lo tanto, aún está por demostrar qué método de cultivo embrionario es el mejor para el desarrollo de los embriones, tanto para mejorar la calidad, como para obtener un mayor número de blastocistos.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio fue determinar que método de cultivo embrionario (individual o grupal) hasta día 5 es mejor para conseguir una mayor calidad y tasa de formación de blastocistos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Es un estudio prospectivo randomizado en el que se han incluido un total de 565 embriones procedentes de 79 tratamientos de donación de ovocitos en fresco. Esta randomización tuvo lugar una vez se conocieron el número de ovocitos fecundados, al día siguiente de realizar la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Los embriones se cultivaron en microgotas de 30 µl de medio de cultivo (Global® Total®, LifeGlobal®), según la tabla de randomización, de forma individual o grupal. Definimos 3 grupos: Grupo 1, cultivo individual (61 embriones), Grupo 2, cultivo de 2-4 embriones por gota (153 embriones), y Grupo 3, cultivo de 5-7 embriones por gota (340 embriones). Los embriones que fueron al grupo de cultivo individual se dispusieron en una microgota de manera individual, mientras que los que fueron a cultivo grupal se dispusieron de 2 a 7 embriones por microgota

dependiendo del número total de ovocitos fecundados de la paciente. En día 5 se valoró la calidad embrionaria. Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS.

## RESULTADOS:

En conjunto, observamos una tendencia a un mayor número de embriones de buena calidad (A/B) en día 5 (63,9%, 52,9%, 54,8%,  $p=0.324$ ) y una mayor tasa en la formación de blastocistos (68,9%, 58%, 60,5%,  $p=0.333$ ) en el grupo 1, comparado con los grupos 2 y 3, respectivamente, si bien los resultados no alcanzaron significación estadística. Cuando comparamos la tasa de embriones de buena calidad (A/B) en día 3, ésta fue similar en los grupos 1, 2 y 3 (82%, 84,7%, 77,5%;  $p=0.16$ ), respectivamente.

## CONCLUSIONES:

Nuestros datos sugieren que el cultivo individual podría ser beneficioso para la calidad y la tasa de formación de blastocistos en día 5. Estos resultados cambian la visión de que el cultivo en grupo puede mejorar el desarrollo embrionario. Como hipótesis, podemos argumentar que algunos de los componentes que liberan los embriones al medio durante su división, podrían afectar potencialmente a la calidad de la cohorte, comprometiendo el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Al ser un estudio piloto hay que tomar estos resultados con cautela por lo que actualmente estamos incrementando el número de casos para contrastar esta hipótesis.

P-008 ▶

## DETERMINACIÓN DEL SISTEMA DE ALORRECONOCIMIENTO KIR/HLA-C MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)

A. Díaz Chamorro  
BIOARRAY - Elche (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

En la implantación el embrión se adhiere al endometrio, y comportándose como un injerto semialogénico, no es rechazado por el sistema inmune de la madre. Esto se debe a que se toleran los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) paternos presentes en el feto y a su vez, se mantiene una respuesta efectora adecuada de protección frente a patógenos; aunque recientemente, se ha planteado una fuerte asociación entre algunos trastornos de fertilidad y determinadas alteraciones en el sistema inmune.

Las fases de la implantación finalizan cuando las dos capas del trofoectodermo dan lugar al trofoblasto extraveloso (EVT), que tiene un fenotipo invasivo y se infiltra en el tejido uterino materno. Esto ocurre gracias a las células asesinas naturales o natural killers uterinas (uNK), que se relacionan con el EVT mediante sus receptores similares a las inmunoglobulinas (KIR). La función de las células uNK queda regulada por los receptores KIR que reconocen el receptor C del antígeno leucocitario humano de clase I (HLA-C) de las células embrionarias, (el cual depende de ciertos motivos aminoacídicos específicos).



# COMUNICACIONES PÓSTERS

Las distintas combinaciones de genes KIR se denominan haplotipos y se han determinado dos, el A y el B. Como los receptores KIR y el HLA-C son tan polimórficos, cada gestación presenta una combinación diferente. Cuando existe una incompatibilidad entre las células uNK y las células embrionarias pueden aparecer complicaciones en la implantación. De hecho, estudios demuestran que la combinación del haplotipo A materno con el HLA-C2 fetal aumenta en hasta un 50% la prevalencia de fallo reproductivo.

Así, la complejidad del sistema de compatibilidad KIR/HLA pone de manifiesto la utilidad y necesidad de la evaluación del haplotipo de este entre parejas a fin de mejorar la probabilidad de conseguir una implantación exitosa y embarazo a término.

## OBJETIVO:

Adaptar el procedimiento de genotipado convencional del sistema KIR/HLA al sistema de secuenciación NGS. Esto es debido a la necesidad de introducir este estudio al flujo de trabajo de los laboratorios de reproducción para proporcionar información de una mayor resolución y de una forma más eficaz con tecnologías de referencia que están sustituyendo a las tecnologías clásicas. Y además, distinguir todos los genes KIR y HLA-C para establecer un sistema precoz de determinación indirecta de compatibilidad entre parejas puede considerarse en el futuro en un sistema de priorización de embriones.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Actualmente, los protocolos de rutina para determinar los genes KIR se realizan exclusivamente mediante sistemas electroforéticos lentos y escasamente estandarizados. Para mejorar el estudio de estos genes, hemos diseñado y desarrollado un panel de secuenciación con tecnología AmpliSeq™ (ThermoFisher), basada en PCR multiplex para genotipar simultáneamente los genes HLA-C y KIR, entre otros, mediante NGS.

## RESULTADOS:

Se diseñaron los cebadores específicos para los genes KIR y HLA-C, entre otros, para amplificar simultáneamente todos los genes. Los resultados preliminares obtenidos hasta el momento son muy prometedores ya que estamos siendo capaces de genotipar con éxito el sistema KIR/HLA por NGS en multitud de parejas.

Estos avances han permitido establecer estudios precoces de compatibilidad en esas parejas y estimar la probabilidad del genotipo HLA-C embrionario de forma indirecta mediante el desarrollo de un software informático propio.

## CONCLUSIONES:

Este trabajo nos ha permitido incorporar la evaluación del sistema KIR/HLA en nuestra rutina de estudio de parejas, añadiendo mucho más valor de cara a un estudio precoz. Así, conseguimos aportar mayor información preliminar en cuanto a las probabilidades de éxito para la obtención de embriones que puedan generar un embarazo a término.

P-009 ▶

## ¿EXISTEN DIFERENCIAS MORFOCINÉTICAS ENTRE EMBRIONES EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES DE UNA MISMA PACIENTE?

**L. Martí Ferri, J. Ten Morro, N. Díaz Hernández, M. Herreros Hergueta, JA. Ortiz Salcedo, MC. Tió Marquina, A. Rodríguez Arnedo, A. Bernabéu García, J. Llacer Aparicio, R. Bernabéu Pérez**  
Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

Las aneuploidías cromosómicas siguen siendo la principal causa de fallos de implantación y abortos de repetición. El análisis cromosómico de los embriones mediante la biopsia embrionaria en estadio de blastocisto sigue siendo el método más fiable para asegurar la transferencia de un embrión euploide. Sin embargo, la biopsia embrionaria es un método invasivo y el propio proce-

dimiento conlleva la manipulación del embrión fuera del incubador. A lo largo de los años se han evaluado diferentes métodos no invasivos para la selección embrionaria.

El uso del time lapse en el cultivo embrionario nos ha permitido evaluar todos los eventos que suceden hasta el estadio de blastocisto. Diversos estudios han intentado relacionar la morfocinética embrionaria con el estatus cromosómico obteniendo resultados

# COMUNICACIONES PÓSTERS

contradictorios. Además, la mayoría de los estudios realizados consideran cada embrión como unidad independiente sin tener en cuenta que ciertos factores de la estimulación y de la paciente pueden influir en la cinética embrionaria.

## OBJETIVO:

El objetivo del presente estudio ha sido valorar si existen diferencias morfocinéticas entre los embriones euploides y aneuploides desarrollados hasta la fase de blastocisto dentro de una misma paciente.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo en el que se evaluaron los eventos de 118 embriones biopsiados pertenecientes a 40 pacientes. El cultivo embrionario fue llevado a cabo en incubadores GERI (Genea Biomedx). La biopsia embrionaria fue realizada en estadio de blastocisto siendo analizados los fragmentos mediante secuenciación masiva.

Se realizó un pareado entre los eventos morfocinéticos de los embriones euploides y aneuploides de una misma paciente mediante el paquete estadístico SPSS (versión 20.0), excluyendo los diagnósticos de embriones mosaico. Para ello, y para que la paciente fuera su propio grupo control, se incluyeron aquellos casos en los que tuvieron el mismo número de embriones euploides y

aneuploides. Los eventos que se analizaron son los descritos en la guía de buena práctica de la ESHRE (Good practice recommendations for the use of time-lapse technology; DOI: 10.1093/hropen/hoaa008). También se analizó el efecto de la multinucleación en 2 y 4 células, la presencia de divisiones irregulares, así como divisiones reversas mediante la prueba de McNemar.

## RESULTADOS:

La edad media de las pacientes fue de  $36,6 \pm 4,4$  años. Tras analizar los resultados, no encontramos ninguna diferencia significativa de los diferentes eventos morfocinéticos entre embriones euploides y aneuploides de la misma paciente. De la misma forma, la presencia de multinucleación (42 embriones aneuploides con ausencia de multinucleación y 17 con presencia frente a 36 embriones euploides con ausencia de multinucleación y 23 con presencia) ( $p=0.307$ ), las divisiones irregulares ( $p=0.302$ ) y divisiones reversas ( $p=1.00$ ) tampoco se asociaron con el estatus cromosómico de los blastocistos analizados

## CONCLUSIONES:

Teniendo en cuenta que la propia paciente fue su propio grupo control, el desarrollo morfocinético embrionario hasta la fase de blastocisto no se asocia con el estatus cromosómico embrionario. Son necesarios estudios prospectivos con un mayor número de casos para validar estos resultados.

P-010 ▶

## TRANSFERENCIA ELECTIVA EN DÍA 6 VERSUS DÍA 5 EN UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS

**J. Guerrero Villena, J. Ten Morro, A. Rodríguez Arnedo, L. Martí Ferri, M. Herreros Hergueta, N. Díaz Hernández, R. Sellers Gil, MC. Tió Marquina, R. Bernabéu Pérez.**

Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

Existe una tendencia cada vez mayor a la transferencia en fase de blastocisto debido a las ventajas que aporta el cultivo largo, optimizando el proceso de selección de aquellos embriones con mayor potencial para dar lugar a un embarazo evolutivo tras la transferencia de un único embrión, además de mejorar teóricamente la sincronización del embrión y el endometrio. De forma rutinaria la transferencia se realiza coincidiendo con el día 5 (d5)

de desarrollo embrionario, y las transferencias en día 6 (d6) son poco frecuentes y por lo general asociadas a embriones que presentan un desarrollo lento, y un potencial de implantación menor. La pregunta que surge es si la transferencia en d6 atendiendo a motivos logísticos (optimización de la carga de trabajo en el laboratorio, ciclos de PGT-A, imposibilidad de la paciente de acudir el día previsto para transferencia...), y no a criterios de calidad embrionaria, ofrecería resultados comparables a aquellos obtenidos transfiriendo en d5.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

El objetivo primario de este estudio fue comparar la tasa de embarazo clínico tras la transferencia electiva de embriones en día 6 versus día 5 en un programa de donación de ovocitos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo realizado entre enero y diciembre de 2019 en el que se incluyeron 213 transferencias de embriones frescos procedentes de nuestro programa de donación de ovocitos. De ellas, 151 se realizaron en d5 y 62 en d6. Las transferencias en d6 correspondieron a casos en los que se evitó el día 5 exclusivamente por motivos logísticos. Los principales parámetros analizados fueron embarazo clínico, implantación, y tasa de aborto espontáneo, así como el número de embriones útiles. Los resultados se analizaron mediante la prueba de la t de Student y la prueba de chi-cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS:

No se encontraron diferencias significativas en las características iniciales entre las donantes en ambos grupos de tratamiento

(edad, IMC, paridad, dosis inicial de gonadotropina). El número de ovocitos maduros donado fue comparable;  $9,6 \pm 0,4$  versus  $9,3 \pm 0,3$  en el grupo d5 y d6 ( $p = 0,16$ ), respectivamente. La tasa de fertilización fue 73,2% y 76%,  $p = 0,36$ , el número medio de embriones transferidos en cada grupo fue comparable ( $1,1 \pm 0,2$  frente a  $1,1 \pm 0,5$ ), así como el número de embriones supernumerarios vitrificados ( $3,7 \pm 1,4$  frente a  $3,0 \pm 1,7$ ). También se calcularon las tasas de embarazo clínico, implantación y aborto clínico: grupo d5; 53%, 52,5% y 13,2%; grupo d6; 55%, 54,3% y 20%, sin encontrar diferencias significativas.

## CONCLUSIONES:

Los datos disponibles en la literatura sobre el potencial implantatorio de embriones transferidos electivamente en día 6 son limitados, y reflejan tasas de éxito más bajas en ciclos autólogos, algo que podría atribuirse a una cuestión de receptividad endometrial en ciclos estimulados. Sin embargo, de acuerdo con nuestros datos, no parece ser este el caso en ciclos de donación de ovocitos cuando la calidad embrionaria es comparable. Nuestros datos respaldarían la eficacia de la estrategia de transferencia electiva en d6 basada en motivos logísticos, lo que permite una mayor flexibilidad para programar la transferencia de embriones evitando, por lo tanto, inconvenientes para pacientes y laboratorio.

P-011 ▶

## INFORMATIVIDAD Y TASA DE ANEUPLOIDÍA EN 21.268 BLASTOCISTOS FRESCOS Y VITRIFICADOS

A. Polo Picasso, D. Castelló Salom, L. Rodrigo Vivó, L. Marín Lopez de Carvajal, I. Campos Galindo, C. Simón Vallés, C. Rubio Lluesa, N. Al-Asmar Piñar  
Igenomix - Paterna (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

Se ha observado en distintos estudios que la vitrificación, así como el día del desarrollo embrionario, podría influir en los resultados cromosómicos de la biopsia de trofoectodermo (TE) en PGT-A (1, 2). Sin embargo, dicha influencia sigue siendo aún controvertida. Para ello, hemos analizado retrospectivamente un tamaño muestral suficiente para tratar de establecer respuestas a esta incógnita.

## OBJETIVO:

Determinar si la vitrificación (blastocistos frescos vs congelados), y/o el día del desarrollo embrionario (D5 vs D6) afecta a la tasa de

informatividad y/o al porcentaje de aneuploidías de los embriones analizados mediante PGT-A.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo multicéntrico que incluye muestras de biopsia de TE correspondientes a 21.268 blastocistos biopsiados en 44 centros entre enero de 2018 y enero de 2021. Las biopsias realizadas en D5 o D6 se analizaron mediante NGS (Next Generation Sequencing) con ReproSeq PGS (ThermoFisher Scientific) y el software Ion Reporter con algoritmo de análisis propio desarrollado por nuestro equipo de bioinformática. Se comparan aquí dos parámetros, informatividad de las muestras y tasa de aneuploidía de los blastocistos analizados mediante chi-cuadrado ( $p < 0,05$ ).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

	Blastocistos frescos			Blastocistos vitrificados		
	D5	D6	Total	D5	D6	Total
<b>Nº emb. biopsiados</b>	13.994	6.390	20.384	376	508	884
<b>Media Edad Mat. (DE)</b>	37,9 (4,8)	37,9 (3,6)	37,9 (4,5)	37,2 (4,9)	37,2 (3,7)	37,2 (4,3)
<b>% informativos</b>	98,5	98,0	98,4	96,5	98,4	97,6
<b>% aneuploidias</b>	58,9 <sup>a</sup>	63,1 <sup>b</sup>	60,2 <sup>c</sup>	51,2 <sup>d</sup>	51,0 <sup>e</sup>	51,1 <sup>f</sup>

ab:  $p < 0,0001$  [OR: 0,841 (0,7908–0,8943)]; ad:  $p < 0,0039$  [OR: 1,366 (1,109–1,683)]

be:  $p < 0,0001$  [OR: 1,647 (1,372–1,977)]; cf:  $p < 0,0001$  [OR: 1,449 (1,264–1,661)]

## CONCLUSIONES:

- En los blastocistos vitrificados se obtuvo la misma tasa de informatividad que en los blastocistos frescos tanto en D5 como en D6, así como en el total de ellos.

- Los blastocistos vitrificados presentaron una menor incidencia de aneuploidías estadísticamente significativa tanto en D5 como en D6 respecto a los blastocistos frescos. Esto podría ser debido a que posiblemente algunos blastocistos anormales no sobrevivan a la vitrificación, haciendo que su porcentaje disminuya tras esta situación de estrés adicional.

- En el grupo de blastocistos frescos se observa un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de aneuploidías de aquellos en D6 vs D5 sugiriendo una tasa de aneuploidía mayor asociada a cinética embrionaria más lenta. Sin embargo, esto no se observa en el grupo de blastocistos vitrificados, donde la incidencia de aneuploidías es similar en D5 y D6.

Todo esto hace pensar que la vitrificación de los blastocistos no afecta a la calidad del ADN de las células, ya que se observó el mismo porcentaje de informatividad en ambos grupos, así como tampoco representaría un riesgo mayor de aneuploidías. El hecho de realizar una biopsia en blastocistos vitrificados implica una doble vitrificación, pero ya ha sido descrito que esto no parece tener impacto clínico negativo (3).

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Maggiulli, R., Gianciani, A., Cimadomo, D., Ubaldi, F.M., Rienzi, L. Human Blastocyst Biopsy and Vitrification. *J. Vis. Exp.* 2019 Jul 26;(149). doi: 10.3791/59625.

2. Yee, C. S., & Tian, T. S. (2019). Choosing between Day 5 and Day 6 blastocyst: Comparison of aneuploidy rates and pregnancy rates. *RBMO*, 38, e31.

3. Taylor, T. H., Patrick, J. L., Gitlin, S. A., Michael Wilson, J., Crain, J. L., & Griffin, D. K. (2014). Outcomes of blastocysts biopsied and vitrified once versus those cryopreserved twice for euploid blastocyst transfer. *RBMO*, 29(1), 59–64.

	BLASTOCISTOS FRESCOS			BLASTOCISTOS VITRIFICADOS		
	D5	D6	Total	D5	D6	Total
<b>Nº EMB. BIOPSIADOS</b>	13.994	6.390	20.384	376	508	884
<b>MEDIA EDAD MAT. (DE)</b>	37,9 (4,8)	37,9 (3,6)	37,9 (4,5)	37,2 (4,9)	37,2 (3,7)	37,2 (4,3)
<b>% INFORMATIVOS</b>	98,5	98,0	98,4	96,5	98,4	97,6
<b>% ANEUPLOIDES</b>	58,9 <sup>a</sup>	63,1 <sup>b</sup>	60,2 <sup>c</sup>	51,2 <sup>d</sup>	51,0 <sup>e</sup>	51,1 <sup>f</sup>

ab:  $p < 0,0001$  [OR: 0,841 (0,7908–0,8943)]; ad:  $p < 0,0039$  [OR: 1,366 (1,109–1,683)]

be:  $p < 0,0001$  [OR: 1,647 (1,372–1,977)]; cf:  $p < 0,0001$  [OR: 1,449 (1,264–1,661)]

## RESULTADOS CLÍNICOS DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES MOSAICOS

**D. Campos Rodero, J. Barkin Astillero, E. García Guixé, A. Gómez Duro, E. Fernández García, C. Giménez Sevilla, M. Sandalinas Alabert.**

Reprogenetics Spain - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La técnica de Next Generation Sequencing (NGS) permite la diferenciación entre embriones euploides, aneuploides y mosaicos. Se considera un embrión mosaico cuando coexisten dos o más líneas celulares con diferente dotación cromosómica en un 20-80% de las células analizadas.

Según los últimos datos publicados, aproximadamente el 18,6% de los embriones analizados por NGS son mosaicos. Se ha descrito que estos tienen capacidad de implantar, aunque con una tasa inferior a los embriones euploides, además de presentar mayores tasas de aborto. Sin embargo, también pueden dar lugar a embarazos evolutivos y al nacimiento de niños sanos. Hasta la fecha se ha descrito el nacimiento de un único niño con mosaicismo cromosómico confirmado tras la transferencia de un embrión mosaico.

### OBJETIVO:

El objetivo del estudio es realizar un seguimiento de los embriones diagnosticados como mosaicos por PGT-A entre los años 2018 y 2021. Los datos obtenidos se comparan con los publicados hasta la fecha en cuanto a las tasas de implantación, embarazo evolutivo y aborto.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó el seguimiento de 34 embriones diagnosticados como mosaicos en ciclos de FIV-PGT-A analizados mediante NGS (Veri-seq, Illumina) y transferidos entre los años 2018-2021, procedentes de diferentes laboratorios de reproducción asistida.

Los embriones transferidos se clasificaron de la siguiente manera en función del número de alteraciones y el grado de mosaicismo: 18 embriones mosaico simple moderado (1-2 alteraciones en un 31-40% de las células analizadas), 13 embriones mosaico simple extenso (1-2 alteraciones en un 41-69% de las células analizadas), 1 embrión complejo moderado ( $\geq 3$  alteraciones en un 31-40% de las células analizadas) y 2 embriones complejo extenso ( $\geq 3$  alteraciones en un 41-69% de las células analizadas). De los 28 embri-

nes transferidos, 21 de ellos presentaban únicamente alteraciones segmentales.

### RESULTADOS:

La tasa de implantación del total de embriones mosaicos en la serie analizada fue del 64,7%, con una tasa de embarazo evolutivo del 52,9%. Se registró una tasa de aborto del 18,2%. Un 63,6% de los embriones que implantaron presentaban únicamente alteraciones segmentales con rango de tamaño que oscilaba entre 7,3pb y 127,7 pb. El 36,4% de los embriones restantes presentaba alteraciones de cromosoma completo.

Según los resultados obtenidos en el estudio, los embriones que presentan una mayor tasa de implantación y embarazo evolutivo son los clasificados como mosaicos simples de aneuploidía completa (70%), seguido de los embriones mosaicos de aneuploidías segmentales (con una tasa de implantación del 66,7% y de embarazo evolutivo del 52,4%) y finalmente los embriones mosaicos complejos que presentaron una tasa de implantación del 33,3%. Se reportó una tasa de aborto del 0% en los grupos de mosaico simple y de mosaico de aneuploidías segmentales, mientras que el total de embriones mosaicos complejos transferidos dio lugar a aborto.

No se ha reportado ningún nacimiento en el que se confirmase la presencia de mosaicismo en el recién nacido.

### CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos de tasa de implantación, embarazo evolutivo y aborto están en consonancia con los datos de transferencia de embriones mosaicos publicados en la bibliografía.

Si bien es cierto que la tasa de implantación y embarazo evolutivo de los embriones mosaicos es inferior a la de los embriones euploides, estos pueden tenerse en consideración para su transferencia en aquellos casos en que tras un ciclo de PGT-A no se obtengan embriones euploides y siempre previo asesoramiento y tras aceptación expresa de los pacientes.

## SCREENING DE PORTADORES CON CRIBADO BÁSICO. ¿LAS ENFERMEDADES INCLUIDAS DISMINUYEN SUFICIENTEMENTE EL RIESGO REPRODUCTIVO?

**A. Feliu Cuberes, I. Trujillo Puebla, M. Pardo Rodríguez, M. Palahí Bages, D. Cotán Marín, M. Sandalinas Alabert**

FullGenomics S.L. - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

El test de screening genético en donantes de gametos tiene como objetivo reducir el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia. Las distintas organizaciones y sociedades recomiendan la realización de un test en donantes que incluya, al menos, los genes asociados a fibrosis quística, atrofia muscular espinal, talasemias, sordera ligada a GJB2 y el síndrome de X frágil (panel básico).

La tecnología usada para el screening de portadores permite el análisis de cientos de genes relacionados con enfermedades recesivas autosómicas (AR) y ligadas al cromosoma X (XLR). Dado que no existe una limitación técnica para el análisis de más enfermedades que las recomendadas de conocimiento básico (panel expandido), es posible escoger cuantos genes analizamos en los donantes con el fin de reducir el riesgo reproductivo al asignar a un donante en concreto a una pareja.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es evaluar el número de pacientes portadores de enfermedades recesivas incluidas en el panel expandido (ECS) que no serían analizadas en el panel básico. Determinar si la inclusión de ciertos genes en el panel básico disminuye considerablemente el número de pacientes portadores de alguna enfermedad no analizada, reduciendo el riesgo en asignaciones de donantes sin matching genético.

### MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio se han analizado los resultados de 4546 pacientes, a los cuales se les ha realizado un análisis expandido mediante NGS de 276 genes AR; el panel básico únicamente incluye la información de 6 de estos genes.

Se ha contabilizado el número de personas portadoras de alguna enfermedad AR no informada en el panel básico. Estas enfermedades se han categorizado según su frecuencia de portadores estimada: categoría A, frecuencia mayor o igual a 1/100 (26 genes); categoría B, frecuencia menor de 1/101.

### RESULTADOS:

Del total de 4546 pacientes analizados, 1245 (27.39%) no se han identificado portadores de ninguna de las enfermedades analizadas, 254 (5.59%) son portadores únicamente de una enfermedad incluida en el cribado básico y 3047 (67.02%) son portadores de al menos 1 enfermedad no analizada en el cribado básico.

Así mismo, del total de 3047 pacientes, 842 (27.63%) serían identificados de todas las enfermedades incluidas en ECS si se analizan los genes de la categoría A. De este modo, únicamente 2205 (48.50%) de los 4546 serían portadores de genes de la categoría B, no incluidos en el panel analizado.

### CONCLUSIONES:

El panel de donante básico, al contener las enfermedades de prevalencia más elevada, reduce considerablemente la probabilidad que un paciente sea portador de alguna enfermedad no informada (diagnosticando correctamente el 32.98% de los pacientes).

Sin embargo, el 67.02% es portador de alguna enfermedad no incluida y, si no se determina y se actúa al respecto, existe un riesgo incrementado de hijo afectado. La inclusión en el cribado básico de los genes de la categoría A permitiría reducir el porcentaje de portadores de alguna enfermedad no analizada hasta el 48.50%. De este modo, sólo se excluiría la información relativa a los genes con una frecuencia de portadores menor de 1/100, por lo que en las asignaciones sin matching la probabilidad de hijo afectado se vería reducida considerablemente. En consecuencia, sería necesario descartar para asignaciones sin matching el 24.11% de los donantes, dado que serían portadores de una enfermedad con elevado riesgo reproductivo.

Estos datos ponen de relevancia la importancia de realizar un ECS en lugar de un cribado básico siempre que sea posible para obtener el máximo de diagnósticos y aumentar la tasa de detección general del análisis, independientemente de si se realiza matching, pero también la necesidad de valorar la inclusión de más enfermedades en el cribado básico.

## NIPGT-A VERSUS PGT-A, ¿ES EL MOMENTO DEL CAMBIO?

M. Fernández Díaz, B. de Luxán Delgado, S. Atienza de Nava, B. Alonso Cuevas, P. Muñoz Oreña, E. García Álvarez, C. Bango Álvarez, P. López Cañal, C. Rodríguez Rodríguez, A. Gayo Lana  
Clínica ERGO - Gijón (Asturias)

### INTRODUCCIÓN:

La técnica de diagnóstico genético preimplantacional no invasivo (niPGTA) se ha ido estandarizando a lo largo de los últimos años con el fin de aportar un score más a la selección embrionaria como lo ha hecho el PGT-A tradicional, o la morfocinética con el uso del time-lapse. Sin embargo, esta técnica no invasiva podría llegar a sustituir en el futuro el PGT invasivo ya que los resultados de concordancia con las técnicas invasivas son cada vez mayores y así lo avalan los resultados obtenidos en niveles de euploidia y tasas de embarazo.

### OBJETIVO:

Comparar los resultados obtenidos mediante la técnica niPGT-A EMBRACE durante los primeros meses de su aplicación con los anteriores obtenidos por PGT-A con biopsia embrionaria del blastocisto.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se analizaron los 20 ciclos de biopsia embrionaria realizados entre septiembre de 2018 y agosto de 2020 (dentro de un total de 261 ciclos de fecundación in vitro), frente a los 35 casos de análisis no invasivo realizados entre septiembre de 2020 y mayo de 2021 (dentro de 206 ciclos de fecundación in vitro).

Se obtuvieron resultado de 75 embriones analizados mediante PGT-A y 110 mediante ni-PGT-A, y se compararon los datos de tasa de embarazo bioquímico y embarazo clínico.

### RESULTADOS:

Hasta la aparición de EMBRACE, el **8%** de los tratamientos de FIV se realizaban con PGT-A, subiendo ese porcentaje al **17%** cuando se analizaron mediante ni-PGT-A ( $p < 0.001$ ).

En ambos grupos la edad media fue de 35.4 y 36.9 años respectivamente, no habiendo diferencias significativas.

El **41%** de los embriones analizados por PGT-A fueron informados como euploides (31/75), frente a un **28%** por niPGT-A (31/110). La tasa de embrión no informativo o con ADN insuficiente fue superior en niPGT-A con un **12%** (13/110) respecto a biopsia embrionaria con un **4%** (3/75), teniendo en cuenta que los embriones analizados por niPGT-A pueden ser de calidad inferior a los biopsiados por no usar técnicas invasivas.

La tasa de beta positiva fue superior ( $p=0.63$ ) en la técnica no invasiva alcanzando un **75%** (6/8) frente a la biopsia embrionaria de un **55%** (5/9), y en embarazo clínico con un **50%** por EMBRACE (4/8) frente a un **33%** por biopsia (3/9).

### CONCLUSIONES:

La aplicación de la técnica niPGT-A en los tratamientos de fecundación ha supuesto un aumento en el interés de los pacientes por analizar el estado genético de sus embriones, motivados principalmente por tratarse de una técnica no invasiva. Por ello, junto al hecho de poder analizar el medio de cultivo de embriones con calidad no suficiente para ser biopsiados, puede explicar la menor tasa de euploidia obtenida mediante niPGT-A.

El porcentaje de embriones no informativos fue superior por niPGT-A pudiendo deberse a la necesidad de optimizar la técnica de recogida del medio o la calidad embrionaria inferior respecto a los embriones que se biopsiaban.

Se obtuvo un aumento en la tasa de embarazo tanto en embarazo bioquímico como en embarazo clínico evolutivo superior en los casos de niPGT-A. Esto puede ser debido a la no biopsia de los embriones y por tanto menor daño, o también a la base técnica del niPGT-A por estar analizando el ADN global de todo el embrión y no solamente unas células concretas como en la biopsia.

En todo caso, es necesario aumentar el número de casos analizados, transferidos y segmentar los resultados en base a otros criterios de confusión que pudieran estar afectando.

## LA SOLEDAD DEL 9 EN LA PLACA DE EMBRYOSCOPE PLUS

**M. Grossmann Camps, N. Rives Enédaguila, À. Paricio Vallespí, C. Puche Niño, I. Bernal Araque, A. Rabanal Anglada**

Barcelona IVF - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

Los diseños en placas de cultivo in vitro de embriones para incubadores time-lapse (por ejemplo, placas para GERI o para EmbryoScope) difieren mucho de las placas de cultivo tradicionales. De alguna manera estos nuevos diseños posibilitan la trazabilidad individual de cada embrión, a la vez que facilitan el efecto paracrino del cultivo en grupo que tan buenos resultados presenta en embriones de otras especies como el ratón o la vaca. Indudablemente los embriones modifican el medio que les rodea consumiendo componentes de éste y secretando diversos factores que pueden influir en el desarrollo de otros embriones.

La placa de cultivo diseñada para EmbryoScope Plus tiene una capacidad de 16 embriones ubicados cada uno en un pocillo. Los 16 pocillos están repartidos en dos zonas (pocillo 1 a 8 y pocillos 9 a 16) y los pocillos de cada zona comparten medio de cultivo. Este diseño permite estudiar embriones de una misma cohorte en, digamos, dos ambientes distintos.

Este estudio tiene, a priori, el obstáculo de que, en el cultivo en medio secuencial, se refresca el medio de cultivo en D+3, lo que podría ocultar los efectos estudiados.

### OBJETIVO:

Valorar si hay un efecto adverso en el cultivo in vitro individual de un ovocito en la placa de EmbryoScope Plus.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se analizan retrospectivamente los 44 ciclos de donación o de ovocitos propios en mujeres menores de 35 años que tuvieron exactamente 9 ovocitos MII y que se cultivaron in vitro en incubador EmbryoScope Plus en el período 2020-marzo 2021. Semen eyaculado, fresco o criopreservado. A medida que se realizaba ICSI, los ovocitos se colocaban, en orden, en los sucesivos pocillos, hasta el número 9. No hay selección previa en el orden de fecundación. Cultivo en medios secuenciales Vitrolife hasta D+5/D+6.

Se valora tasa de fecundación y de blastocisto en los ovocitos cultivados en grupo (G8, pocillos 1 a 8) y las mismas tasas del ovocito cultivado "solo" en el pocillo 9 (G1).

El grupo control natural de este estudio sería el que tuviese un único ovocito MII en el pocillo 1, pero estos casos con un único embrión son, por definición, casos de muy mal pronóstico y no son comparables.

Evaluación de resultados mediante Ji cuadrado.  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS:

La tasa global de fecundación de los 396 ovocitos analizados fue del 78,8% y la tasa de blastocisto del 67,2% de los embriones 2PN.

Para G8 (n= 352) las tasas observadas de fecundación y de blastocisto fueron, respectivamente 83,1% y 68,7%.

Para G1 (n= 44) las tasas observadas de fecundación y de blastocisto fueron, respectivamente 74,7% y 62,5%.

Hay diferencias significativas en el número de embriones que consiguen llegar a blastocistos en cada grupo

### CONCLUSIONES:

Los ovocitos que "caen" en el pocillo 9 fecundan menos y llegan en menor tasa al estadio de blastocisto comparados con los otros 8 ovocitos MII de la misma cohorte cultivados en grupo.

La menor tasa de blastocistos se detecta a pesar de que el medio se cambie en D+3, lo podría indicar que lo que prima es el efecto paracrino y no el consumo de nutrientes.

El pequeño número muestral no permite elevar esta conclusión a definitiva, pero de confirmarse, plantea la necesidad de separar en dos grupos los ovocitos tras ICSI y de ocupar las dos zonas de cultivo dentro de la placa de EmbryoScope Plus.



## RESULTADOS CLÍNICOS EN PACIENTES SOMETIDAS A CICLO DE FIV-ICSI CON ESTIMULACIÓN MÍNIMA: CITRATO DE CLOMIFENO VS LETROZOL

P. Gómez Apiñániz, M. Borrallo Fernández, I. Carreño Pérez, L. Seco Blanco, R. Vázquez Agüero, B. Castro Martín, J. Iglesias Rodríguez-Aguilar, A. Bermejo de la Calzada.

MINIFIV - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

La reproducción humana asistida ha avanzado mucho en los últimos años, con la implementación de técnicas y tecnología que mejoran las tasas de embarazo. Actualmente, está en auge la estimulación mínima de los ovarios durante el ciclo folicular, usando menor cantidad de medicación y durante menos días, para reducir la carga hormonal externa. La estimulación suave es un tratamiento más sencillo, con menos inyecciones y menos costes, que ocasiona menos problemas físicos y psicológicos a las pacientes.

### OBJETIVO:

En nuestra clínica se emplean el Citrato de Clomifeno (CC) y el Letrozol (LT) para estimular el crecimiento folicular en un protocolo de estimulación mínima. Actualmente no hay suficiente evidencia científica para saber qué tratamiento produce unos mejores resultados clínicos. Por ello, el objetivo principal del estudio es analizar y comparar la tasa de gestación clínica en ciclos de estimulación mínima en nuestras pacientes tratadas con CC o con LT. Además, nos interesa comparar el número de folículos, de ovocitos, la tasa de fecundación, el desarrollo embrionario, la tasa de implantación y la tasa de aborto.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se trata de un estudio retrospectivo, observacional y unicéntrico. En el estudio se incluyen las pacientes que se sometieron a un tratamiento de estimulación mínima con CC o con LT entre el 31 de enero y el 15 de octubre de 2020, sin excepción. Se han analizado 238 ciclos, 90 de CC y 48 de LT. Mostramos los resultados clínicos obtenidos de todas las pacientes, y los comparamos según la utilización de CC o LT. Por último, hemos hecho subgrupos para valorar pacientes de peor pronóstico clasificados en función de su edad, su índice de masa corporal (IMC) y sus niveles de hormona foliculoestimulante (FSH) basal.

### RESULTADOS:

Nuestros resultados muestran que en los ciclos de CC un 80,37% de los ovocitos fueron MII, siendo un 79,75% en los ciclos de LT. La tasa de fecundación en los ciclos de CC comparada con las de LT es de 75% y 71%, respectivamente. Nuestro estudio muestra que en los ciclos de CC se obtienen más embriones sobrantes vitrificados y embriones totales por ciclo que en los de LT. El 47,89% de los ciclos de CC llegaron a transferencia, siendo el 41,66 en los de LT. La tasa de gestación clínica por transferencia es mayor en los ciclos de CC que en los LT (28% vs 20%, respectivamente). La estimulación ovárica con CC reduce el grosor endometrial comparado con los ciclos de LT, provocando un mayor porcentaje de transferencias en diferido. Este efecto es mayor en pacientes mayores de 39 años, en el grupo de pacientes con normopeso y en las de sobrepeso. Las pacientes con FSH < 10 mUI/ml tratadas con CC consiguen un mayor número de ovocitos totales, de ovocitos fecundados, de embriones totales y de embriones sobrantes vitrificados que las pacientes de ciclos de LT.

### CONCLUSIONES:

Basándonos en nuestros datos, concluimos que la tasa de gestación clínica mejora cuando la transferencia es en diferido, siendo la mayoría en estadio de blastocisto, y cuando se usa CC como tratamiento. De manera excepcional, observamos mejores resultados en la tasa de gestación clínica en pacientes mayores de 39 años, o en pacientes que tenían un FSH  $\geq 10$  cuando recibieron tratamiento de LT. Aumentando el número de ciclos incluidos en el estudio tendríamos a más pacientes por grupo de variables, lo que nos daría unos resultados más concluyentes.

## ¿GENERA LA CRIOPRESERVACIÓN EN MUESTRAS NORMOZOOSPÉRMICAS SEMINALES DIFERENCIAS EN LA TASA DE FECUNDACIÓN, BLASTULACIÓN Y CALIDAD EMBRIONARIA COMPARADAS CON MUESTRAS EN FRESCO?

P. Troncoso Pérez, A. Zavala García, C. González Navas, D. Sosa Rosales, E. Criado Scholz

Ovoclinic - Marbella (Málaga)

### INTRODUCCIÓN:

Se considera que las muestras de semen de donante son de mejores características que aquellas procedentes de paciente. Varios autores y estudios han reportado que el proceso de criopreservación espermática produce daños en la calidad de la muestra, como, por ejemplo, un aumento de la fragmentación comparadas con muestras en fresco. Por tanto, se podría considerar que las muestras de donante tendrían una mayor tasa de fragmentación que aquellas de pacientes normozoospermicos que se usan en fresco.

### OBJETIVO:

Evaluar si la criopreservación provoca daños sustanciales en muestras espermáticas de donante en comparación con muestras en fresco de pacientes normozoospermicos que se vea reflejada en una menor tasa de fecundación y blastulación en ciclos con ovocitos vitrificados de donante.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Realizamos un estudio descriptivo, comparativo, retrospectivo y de corte transversal en el periodo de enero 2018 a diciembre 2020, en Ovoclinic, Marbella, España; un centro terciario de atención privada.

Se analizaron 176 ovocitos de donantes vitrificados. Dividimos la población en aquellos ovocitos microinyectados con semen congelado de donante y los comparamos con aquellos microinyectados con semen proveniente de pareja sin criopreservar. Ambos tipos de muestras fueron capacitadas mediante gradientes discontinuos de densidad y posterior lavado. Ninguna fue tratada mediante técnicas complementarias para eliminar posible fragmentación de DNA seminal. Los parámetros analizados incluyen, número de ovocitos fertilizados, tasa de fertilización, el desarrollo embrionario a blastocisto y la calidad embrionaria. Para evaluar la calidad embrionaria, utilizamos la

clasificación de Veeck, considerando blastocistos de buena calidad, aquellos que cumplen con criterios de vitrificación o transferencia (A, B, o C). Debido al carácter retrospectivo del presente estudio, no fue necesario conseguir aprobación por parte de comité de bioética.

Analizamos el promedio y la desviación estándar. Para el análisis inferencial, utilizamos el test de Shapiro para valorar normalidad de datos y T de Student para su comparación. El Valor-P ajustado fue considerado estadísticamente significativo si era  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS:

En la población general de 176 ovocitos vitrificados de donante, N=60 fueron microinyectados con semen de donante y N=116 con semen de pareja en fresco. En cuanto a los ovocitos, las edades de las donantes, IMC, protocolo de estimulación y días de tratamiento fueron homogéneas (Tablas 1 y 2). Incluso en los días de administración del desencadenante de la ovulación, hubo un número similar de folículos mayores de 17 mm, criterio utilizado para indicar la maduración ovocitaria. Se obtuvo una tasa de 83,31% fertilizados en el grupo de semen de donante y de 78,34% en el de semen de pareja (Tabla 3). Sin embargo, el número de ovocitos fertilizados en ambos grupos fue similar ( $P=0,707$ ). Se obtuvo una tasa de blastulación de 57,44% en el grupo de semen de donante y de 63,53% en el de semen de pareja. En este caso, el número de blastocistos viables (transferidos y/o criopreservados) en ambos grupos fue similar ( $P=0,868$ ).

### CONCLUSIONES:

La tasa de fertilización de ovocitos vitrificados es similar al microinyectarse con semen de pareja con  $REM \geq 5$  M/mL, en comparación con semen de donante. Aunque encontramos un mayor porcentaje de tasa de fertilización en aquellos ovocitos microinyectados con semen de donante, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de ovocitos fertilizados, número total de blastocistos obtenidos ni

## COMUNICACIONES PÓSTERS

en cuanto a calidad embrionaria. Por lo tanto, podemos concluir que el proceso de congelación en muestras de donante no producen un daño sustancial en la calidad del semen ya que

comparadas con muestras de paciente en fresco consideradas normozoospermicas no producen diferencias significativas en los parámetros que hemos analizado.

**Tabla 1.** Datos demográficos de donantes de ovocitos vitrificados.

Variables	Población Total (N=176)	Semen Donante (N=60)	Semen Pareja (N=116)	Valor P
Edad, Años	24.30 ± 4.28	24.83 ± 4.12	24.03 ± 4.35	0.234
Talla	1.64 ± 0.06	1.63 ± 0.06	1.65 ± 0.06	0.288
Peso	61.12 ± 7.82	60.06 ± 8.00	61.67 ± 7.71	0.203
IMC, Kg/m <sup>2</sup>	22.64 ± 2.48	22.45 ± 2.64	22.73 ± 2.40	0.496

**Tabla 2.** Resultados de protocolo de EOC en donantes de ovocitos y características de semen.

Variables	Población Total (N=176)	Semen Donante (N=60)	Semen Pareja (N=116)	Valor P
Dosis FSH, UI	3111.08 ± 531.10	3042.5 ± 446.15	3146.55 ± 568.67	0.185
Días de estimulación	11.55 ± 1.33	11.33 ± 1.29	11.67 ± 1.34	0.107
Dosis FSH Promedio	264.50 ± 42.17	268.93 ± 29.45	262.21 ± 47.38	0.249
Número de folículos >17 en día de trigger	17.02 ± 7.34	15.75 ± 7.07	17.68 ± 7.42	0.092

**Tabla 3.** Resultados de fertilización de ovocitos vitrificados de donante.

Variables	Población Total (N=176)	Semen Donante (N=60)	Semen Pareja (N=116)	Valor P
MII Asignados Pac	6.22 ± 1.97	5.91 ± 2.14	6.38 ± 1.87	0.152
Ovocitos fertilizados	5.03 ± 2.08	4.95 ± 2.17	5.07 ± 2.04	0.707
% Fertilizados	80.03	83.31	78.34	—
Total Blastos	2.65 ± 1.88	2.73 ± 1.98	2.61 ± 1.83	0.694
Total Blastos Calidad	1.84 ± 1.40	1.86 ± 1.54	1.82 ± 1.34	0.868
%Blastos Alta Cal.	61.53	57.44	63.65	—

## ANÁLISIS COMPARATIVO DE PRUEBAS GENÉTICAS NO INVASIVAS PREIMPLANTACIONALES DE ANEUPLOIDÍAS (NI PGTA) CICLOS PGTA Y FIV RESULTADOS PRELIMINARES

**Y. Franco Iriarte, A. Villa Milla, R. Gay Fernández Vegue, F. Sotos Borrás, E. Carrillo de Albornoz, B. Bueno Olaia, V. Cabezuleo Sánchez, S. Bau Aparicio, A. Martínez Acera, S. Iniesta Pérez.**

Hospital Ruber Internacional - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

Uno de los mayores desafíos en la actualidad de la FIV es seleccionar con precisión los embriones viables que tienen más probabilidad de lograr un niño sano en casa después de la transferencia de embriones. La biopsia de trofoblasto (TE) y PGT-A han proporcionado una evaluación directa del estado de los cromosomas de los embriones mejorando las tasas de implantación y embarazo clínico por transferencia. Una alternativa no invasiva es analizar cfDNA embrionario en el medio de cultivo de blastocisto. Varios estudios han demostrado que las pruebas de cfDNA en medio de cultivo de blastocistos en el día 6 de desarrollo permiten la detección de aneuploidías con altas tasas de concordancia en comparación con la biopsia de TE y la masa celular interna.

### OBJETIVO:

El objetivo es estudiar si el estudio genético no invasivo de aneuploidías (niPGTA) puede mejorar el éxito clínico en pacientes de FIV.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio observacional de aplicación clínica de niPGT-A entre julio-diciembre de 2020. La aplicación clínica consistió en una primera fase de validación, comparando biopsias de TE con cfDNA en el medio de 28 blastocistos. En una segunda fase, se aplicó niPGT-A y el resultado de 13 transferencias de embriones únicos (SET) en comparación con 13 SET PGT-A y 130 SET de FIV / ICSI realizadas en el mismo período. En los tres grupos, la edad de las mujeres y los donantes fue  $\leq 38$  años. Los embriones se cultivaron en un sistema time-lapse (Geri) hasta el día 4, donde posteriormente fueron cambiados a gotas individuales de 10  $\mu$ l de CCSS hasta el día 6 en un sistema K-system de baja concentración de oxígeno. El día 6, los blastocistos se vitrificaron y los medios se recogieron en tubos de PCR estériles después de al menos 40 horas en cultivo. Los medios se congelaron inmediatamente y se analizaron mediante análisis de secuenciación masiva. La transferencia diferida se realizó de acuerdo con los resultados de los medios.

### RESULTADOS:

Previamente se realizó una validación del protocolo comparando los resultados de cfDNA con las biopsias TE del mismo blastocisto día 6, siendo la concordancia de ploidía del 87,5%.

Se encontraron resultados similares para niPGT-A y PGT-A en términos de aneuploidía y resultados clínicos. Los porcentajes de resultados informativos fueron 95% y 97% y las tasas de aneuploidía fueron 44% y 46%, para niPGT-A y PGT-A, respectivamente. Las tasas de embarazo clínico para estudio de aneuploidías fueron en ambos grupos 69,2%, con 8 embarazos en curso (61,5%) y 4 analizados por test prenatal NACE. Para los embriones no analizados, el embarazo clínico fue (57,7%) siendo las tasas de embarazo en curso (48,5%).

En los ciclos de niPGT-A, la transferencia de embriones se realizó de acuerdo con los resultados de los medios y la morfología. Hicimos un análisis secundario de qué blastocisto transferiríamos, si solo se considera la morfología. Observamos que, si solo seleccionamos por morfología, en el 61,5% de los casos elegiríamos el mismo embrión que con niPGT-A, y en el 30,4% de los casos transferiríamos un blastocisto con medio aneuploide.

### CONCLUSIONES:

Observamos resultados consistentes para niPGT-A en comparación con las biopsias de TE en nuestra validación interna. Estos resultados avalan la aplicación clínica de niPGT-A en la rutina del laboratorio y pueden evitar la manipulación embrionaria reduciendo también la subjetividad cuando los embriones son seleccionados solo por morfología. Nuestros resultados son alentadores, pero deben interpretarse con cautela debido al pequeño tamaño de la muestra. Se necesitan ensayos controlados más grandes y aleatorios para verificar y ampliar nuestros hallazgos en cada grupo.

## VALIDACIÓN DEL “EXOMA RECESIVO”: UN NUEVO ALCANCE EN GENÉTICA PRECONCEPCIÓN

**X. Vendrell Montón, M. Pardo Belenguer, J. García Vuelta, L. Díaz Chacón, A. Arilla Codoñer, C. Torres Vidalexom.**

Sistemas Genómicos - Sueca (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

El estudio genético de portadores de enfermedades hereditarias ha impactado de manera radical en la forma de programar un embarazo, tanto en parejas que utilizan gametos propios, como en parejas o mujeres sin pareja masculina que acuden a la donación de gametos. Estos estudios permiten establecer el riesgo genético para la descendencia en individuos asintomáticos, en lo que se conoce coloquialmente como el “matching” genético. Este componente anticipatorio es clave en la toma de decisiones reproductivas. En este escenario, el estudio simultáneo de unos centenares de genes seleccionados está migrando hacia el análisis de las regiones codificantes (exones) de todos los genes de herencia autosómica recesiva (AR) y recesiva ligada al cromosoma X (ARLX), en un análisis genómico masivo que hemos llamado el “exoma recesivo”.

### OBJETIVO:

Presentar la validación técnica de un estudio genómico masivo basado en NGS (next generation sequencing) que combina el análisis de las regiones codificantes (exones) y regiones de splicing, la captura y resecuenciación dirigida de genes específicos y técnicas clásicas de PCR en la misma muestra.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Los experimentos de validación incluyeron tres tipos de ensayo: 1) Validación de un panel de 7 genes de alta complejidad (CYP21A2, CYP21A1P, HBA1, HBA2, SMN1, CFTR, DMD) mediante captura y resecuenciación dirigida basada en sondas de ADN diseñadas ad hoc (Twist Bioscience) sobre regiones diana específicas, en 22 muestras positivas para variantes conocidas en estos genes. 2) Validación de la captura de los exones y regiones de splicing de 4248 genes asociados a enfermedad, con sondas de ARN de diseño comercial (SureSelect Human All Exon V6) enriquecidas en regiones de especial interés, en 4 muestras positivas para 16771, 16403, 15702 y 15666 variantes, respectivamente. Posteriormente, se procedió al filtrado bioinformático de cerca de 2000 genes (AR+ARLX). 3) Validación de la TP-PCR en el gen FMR1 en 46

muestras positivas. En los experimentos de NGS partimos de ADN total extraído de sangre periférica. El protocolo incluye fragmentación enzimática, ligación, purificación, cuantificación, hibridación con sondas biotiniladas, captura magnética con microesferas de estreptoavidina, amplificación y secuenciación por síntesis (plataforma HiSeq 2500, Illumina). Los archivos fastq procedentes de la secuenciación masiva fueron computados con algoritmos bioinformáticos y un visor de secuencia de diseño propio. La cobertura media del exoma fue de 100x (paired-end), las variantes se contrastaron en las bases de datos gnomAD, 1000Genomes, y descritas como patogénicas/probable patogénicas en HGMD y ClinVar. Los criterios de filtrado de variantes se contrastaron en 3150 muestras clínicas de exoma, analizadas en nuestro laboratorio. Versión del genoma GRCh38/hg38.

### RESULTADOS:

Los experimentos de validación exhiben una sensibilidad y especificidad superiores al 99% para los genes HBA1, HBA2, CFTR, SMN1 y DMD, destacando la detección de CNVs (copy number variations), todas confirmadas por MLPA. En relación con el exoma, el porcentaje de lecturas mínimo mapeado (99%), lecturas de alta calidad mapeadas sin duplicados de PCR (75%) y profundidad media de lectura mínima (123.5X) quedaron por encima de los umbrales establecidos (80%, 40% y 100X, respectivamente). La sensibilidad fue del 97% y especificidad del 89%. Se detectaron de forma veraz (>99%) inserciones  $\leq 12$  nucleótidos, deleciones  $\leq 25$  nucleótidos y variantes puntuales en las regiones de codificantes y hasta 20 nucleótidos en las zonas de splicing.

### CONCLUSIONES:

El análisis combinado del exoma, técnicas de captura y resecuenciación dirigida de genes conflictivos y un protocolo especial de PCR permite establecer de forma segura, específica y veraz el estatus de portador/no portador de variantes patogénicas/probable patogénicas en individuos asintomáticos para genes de herencia AR y ARLX, antes de la concepción. El manejo de la cantidad de información obtenida no es trivial y su indicación deber ser valorada en una consulta de asesoramiento genético preconcepción.

## MEJOR CALIDAD EMBRIONARIA A MENOR CONCENTRACIÓN DE HIALURONIDASA UTILIZADA

V. Montalvo Pallés, J. Masso Hernández, A. García-Faura Cirera, B. Marquès López-Teijón, M López-Teijón Pérez.

Institut Marquès - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La decumulación es un proceso clave en los tratamientos de FIV, combina una acción química con una mecánica para poder clasificar los ovocitos entre maduros e inmaduros. La acción química se lleva a cabo mediante la acción de la hialuronidasa que degrada el ácido hialurónico que se encuentra entre las uniones celulares de las células del cúmulo. El tiempo de exposición a este ácido se debe mantener bajo mínimos con el objetivo de minimizar el potencial efecto nocivo de este.

La concentración de los medios comerciales disponibles en la actualidad es de 80 UI/ml. Sin embargo, algunos grupos han reportado resultados beneficiosos al diluir la hialuronidasa.

### OBJETIVO:

Analizar si diferentes concentraciones de hialuronidasa tienen algún efecto sobre los diversos parámetros de éxito en los ciclos de FIV.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio prospectivo que incluye 560 ciclos de ovodonación cultivados en sistema time-lapse. En el grupo control (GC=277 ciclos) se realizó la decumulación con una solución de 80 UI/ml de hialuronidasa, en el grupo 1 (G1=196 ciclos) se diluyó la hialuronidasa hasta obtener 40 UI/ml, y en el grupo 2 (G2=87 ciclos) se diluyó a 26,6 UI/ml.

Los ovocitos se decumularon mediante el uso de la solución con hialuronidasa durante un máximo de 30 segundos y posteriormente se utilizaron capilares de diámetros decrecientes (300µm, 170µm, y 135µm) para eliminar por completo las células del cúmulo.

### RESULTADOS:

Tanto la tasa de ovocitos maduros (GC=79,99%; G1=78,95%; G2=78,95%; p=0,648), como la tasa de fecundación (GC=74,50%; G1=73,84%; G2=72,63%; p=0,667) no se vieron alteradas por las diferentes diluciones. Donde sí que observamos diferencias fue en las tasas de blastocisto útil (GC=59,96%; G1=64,34%; G2=67,63%; p=0,0076), observando un incremento en el número de blastocistos de buena calidad con una mayor dilución de la hialuronidasa.

Por lo que respecta a los resultados clínicos de estos embriones, no vemos diferencias en la tasa de implantación (GC=50,56%; G1=50,00%; G2=46,43%; p=0,92) ni en la tasa de aborto (GC=19,78%; G1=12,06%; G2=15,38%; p=0,464).

Profundizando en la calidad embrionaria vemos un incremento en la cantidad de embriones con una Massa Celular de calidad A (Score Gardner) (GC=59,56%; G1=62,70%; G2=71,30%; p=0,005), así como un incremento en los embriones con un trofoectodermo de máxima calidad (GC=45,99%; G1=47,42%; G2=54,78%; p=0,008).

### CONCLUSIONES:

Estos resultados indican una clara mejora en la calidad embrionaria con el uso de concentraciones menores de hialuronidasa. Pese a no observar un efecto sobre la tasa de fecundación, vemos un incremento en la cantidad de blastocistos utilizables a partir de una concentración de 40 UI/ml. También vemos un incremento en la calidad de estos embriones utilizables, incrementando el porcentaje de embriones de máxima calidad.

## IMPACTO CLÍNICO DEL TIEMPO DE CULTIVO TRAS LA DESVITRIFICACIÓN EMBRIONARIA

Á. Linares Bernabéu (1), N. Ruiz Espinosa (1), J. Bartolomé García (1), JA. Ortiz Salcedo (2), J. Ten Morro (3), L. Luque Martínez (1), R. Bernabéu Pérez (3)

(1) Instituto Bernabéu - Albacete (Albacete), (2) Instituto Bernabéu Biotech - Alicante (Alicante), (3) Instituto Bernabéu Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

Dado el creciente número de ciclos de reproducción asistida que implican la vitrificación embrionaria y su posterior transferencia diferida, surge la necesidad de identificar y describir el papel específico que desempeñan las condiciones ambientales a las que se encuentra sometido el embrión durante este periodo de reactivación del metabolismo celular.

Si bien es cierto que existen ciertos parámetros implicados en el éxito de una criotransferencia, el tiempo transcurrido desde la desvitrificación hasta la transferencia embrionaria constituye un posible factor cuyo impacto clínico no se ha descrito en profundidad.

### OBJETIVO:

El propósito de este estudio consiste en establecer y analizar la relación entre el tiempo que permanece el embrión en cultivo en la incubadora hasta que es transferido al útero materno y los resultados clínicos del tratamiento.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo de cohortes realizado entre julio de 2017 y junio de 2020 en pacientes que realizaron un ciclo de Fecundación In Vitro (FIV). Se tuvieron en cuenta 1908 tratamientos de ovodonación y transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido. Se excluyeron pacientes con patología uterina, ciclos en los que se emplearon espermatozoides testiculares y/o ciclos de diagnóstico genético preimplantacional. El estudio valoró la asociación entre el tiempo de cultivo previo a la transferencia y el éxito del ciclo en términos de: B-hCG positiva (>5 mUI/mL) en suero sanguíneo, gestación clínica, aborto clínico y recién nacido vivo.

La vitrificación y desvitrificación embrionaria se realizó empleando el protocolo y los medios de Irvine Scientific® (Fujifilm IrvineScientific) en soporte cerrado HSV (Cryo Bio System). El cultivo de los embriones se llevó a cabo en incubadoras tipo benchtop al 7.2% CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub> y 86.8% N<sub>2</sub>, empleando el medio de cultivo Global Total® (Cooper Surgical) suplementado con seroalbúmina humana (HSA, SAGE media) al 5%.

El valor del tiempo de cultivo embrionario como predictor de los resultados clínicos de la FIV se evaluó mediante una regresión logística binaria (SPSSv20.0) corregida por calidad embrionaria (A, B o C), día de desarrollo del blastocisto (5 ó 6), tipo de ovocito donado (fresco/congelado) y origen seminal (cónyuge/donante y fresco/congelado).

### RESULTADOS:

La edad media de las pacientes receptoras de ovodonación fue de 42.52 ± 4.11 años. Asimismo, la edad media de las donantes de ovocitos fue de 24.65 ± 3.04 años. El tiempo medio de cultivo desde la desvitrificación hasta la transferencia embrionaria fue de 3.21 ± 1.40 horas.

Los resultados clínicos totales de los ciclos de FIV fueron: 40.3% B-hCG positiva en suero, 35.7% gestación clínica, 10.2% aborto clínico y 25.5% recién nacido vivo. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo que permanecieron los embriones en cultivo y B-hCG positiva (OR=0.948, IC 95% [0.876-1.027], p=0.192), gestación clínica (OR=0.943, IC 95% [0.866-1.027], p=0.178), aborto clínico (OR= 0.954, IC 95% [0.788-1.154], p=0.625) y nacido vivo (OR= 0.912, IC 95% [0.901-1.077], p=0.722).

Del mismo modo, cuando se estableció en cuartiles el tiempo de cultivo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a tasa de gestación clínica: primer cuartil (<0.5h): 30.0%, segundo cuartil (0.5h-2h): 31.2%, tercer cuartil (2.01h-4h): 30.2% y cuarto cuartil (> 4h): 27.8% (p =0.718).

### CONCLUSIONES:

Según nuestros datos, no se puede establecer una relación estadísticamente significativa entre el tiempo que son cultivados los embriones antes de transferirlos y los parámetros de éxito clínico. Es por ello que se podría optimizar la organización y planificación del trabajo diario del laboratorio sin otorgar especial consideración a este parámetro. No obstante, se requeriría de estudios prospectivos más amplios que incluyan cohortes homogéneas para corroborar nuestros resultados iniciales.

## ALTA REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS CON DIFERENTES TIPOS DE INCUBADOR Y DE MEDIO DE CULTIVO

CM. García Pascual, L. Navarro Sánchez, L. Martínez Merino, D. Castelló Salom, N. Al-Asmar Piñar, A. Polo Picasso, I. Campos Galindo, L. Rodrigo Vivo, C. Simón Vallés, C. Rubio Lluesa.  
IGENOMIX - Paterna (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

La selección del embrión con mayor probabilidad de dar lugar a un recién nacido sano, es clave en un tratamiento de reproducción asistida. Los embriones euploides son los mejores candidatos, pero su identificación requiere de técnicas invasivas. Es necesario analizar una biopsia del embrión para poder determinar su contenido cromosómico, ya que la morfología o morfocinética no están directamente relacionadas con el contenido cromosómico del embrión. Ante las limitaciones que conlleva este enfoque invasivo, se ha desarrollado un método no invasivo de detección de aneuploidías basado en el análisis del ADN libre embrionario secretado al medio de cultivo en los últimos estadios de desarrollo embrionario (test Embrace).

### OBJETIVO:

Determinar la influencia de distintos incubadores (n=6) y medios de cultivo (n=6) en los resultados obtenidos mediante un método no invasivo de detección de aneuploidías.

### MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio se han incluido 22 centros de reproducción asistida que realizaron el proceso de validación para aplicar el test Embrace. En el proceso de validación para cada blastocisto se aspiró el medio de cultivo en el que habían estado los embriones entre los días 4 y 6 de desarrollo embrionario. Los resultados del análisis cromosómico de cada medio de cultivo se compararon con los resultados del análisis cromosómico del blastocisto correspondiente. Los embriones fueron cultivados siguiendo un protocolo adaptado para la identificación de aneuploidías en medio de cultivo. Dicho protocolo, descrito en Rubio et al, 2020, es totalmente no invasivo y no requiere de ningún tipo de manipulación extra del embrión (vitrificación, biopsia, eclosión asistida). Para el análisis cromosómico de los medios y de las muestras de blastocisto se utilizó la técnica de NGS (Next Generation Sequencing), con protocolos adaptados para cada tipo de muestra. La interpretación de los resultados

se realizó utilizando dos algoritmos de diagnóstico diferentes desarrollados internamente: uno para muestras de blastocisto y otro para el ADN libre en el medio de cultivo. Los medios de cultivo empleados fueron de dos tipos: 1) Medios únicos: CSCM (Irvine Scientific), Global total (LifeGlobal), G-TL (Vitrolife) y Sage-1 (Origio) y, 2) Medios secuenciales: Sage ART-1529 (Origio) y G5plus (Vitrolife). Y los diferentes tipos de incubador fueron: 1) Sistema time-lapse: EmbryoScope (Vitrolife) y 2) Incubador convencional: K-System (Cooper Surgical), Heracell (ThermoFisher Scientific), Minc (Cook Medical), ASTEC (ASTEC bio) y Miri (ESCO).

### RESULTADOS:

Se analizaron las tasas de concordancia entre el medio de cultivo y las muestras de blastocisto, considerando concordantes aquellas muestras euploides en ambos casos, o aneuploides en ambos casos. No se observaron diferencias en las tasas de concordancia entre ambos tipos de muestras ni para los diferentes tipos de incubadores empleados (convencional o time-lapse), ni para los diferentes medios de cultivo (medios únicos o secuenciales) (tablas 1 y 2).

### CONCLUSIONES:

El método no invasivo de detección de aneuploidías en medio de cultivo desarrollado en nuestro laboratorio es robusto y preciso en diferentes condiciones de cultivo. Se obtienen buenos resultados independientemente del tipo de incubador o del medio de cultivo empleado, siempre y cuando se trabaje siguiendo el protocolo específicamente diseñado para minimizar el efecto de la contaminación materna y/o externa.

### BIBLIOGRAFÍA:

Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryo cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1,301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol.* 2020; 223(5):751.e1-13.



## ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN 2593 PACIENTES ATENDIDOS EN UNA UNIDAD DE REPRODUCCIÓN

**ML. Bellido Díaz (1), M. Guzmán Bellido (2), MC. Gonzalvo López (2), CJ. Rodríguez Izquierdo (2), E. Fernández Sierra (2), A. Muñoz Oyonarte (2), M. Pérez Sánchez (1), JA. Castilla Alcalá (1), M. Molina Romero (3), S. Rodríguez Guirado (2)**

(1) Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs. - Granada (Granada), (2) Unidad de Reproducción, Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada), (3) CEIFER biobanco-NextClinics - Granada (Granada)

### INTRODUCCIÓN:

La prevalencia de alteraciones cromosómicas en pacientes atendidos en una Unidad de Reproducción varía entre los distintos autores y por tanto, no hay un consenso establecido sobre cuándo solicitar esta prueba. La frecuencia de alteraciones en autosomas o gonosomas también difiere entre autores cuando se ha estudiado en esta población.

### OBJETIVO:

Determinar la prevalencia y tipo de alteraciones cromosómicas en pacientes atendidos en una Unidad de Reproducción.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se incluyeron cariotipos realizados entre enero 2017 y agosto 2020 a 2593 pacientes, 1139 mujeres y 1454 hombres atendidos en nuestra Unidad de Reproducción. Todos los pacientes atendidos en la URH cumplían los criterios de inclusión del Sistema Nacional de Salud. Se realizó cariotipo a los hombres de parejas estériles con un factor masculino severo ( $< 5\text{mill/mL}$ ), malos resultados en ciclos de fecundación in vitro/ICSI, abortos de repetición o sospecha clínica de alteración cromosómica (ej talla corta, etc). En mujeres se indicó la realización de cariotipo por sospecha clínica, fallo ovárico prematuro, baja reserva ovárica, malos resultados en ciclos de FIV/ICSI o abortos de repetición. Los análisis cromosómicos se realizaron en linfocitos de sangre periférica obtenida en tubo heparina sódica, cultivo por técnica convencional con fitohemaglutinina (PHA) y sacrificio del cultivo por adición de colchicina. Se aplicaron técnicas de bandedo GTG usando protocolos estándar y se analizaron un total de 20 metafases con el análisis

completo de cinco cariotipos. No se incluyeron en el estudio citogenético las alteraciones consideradas polimorfismos. Las frecuencias observadas se compararon mediante test de Chi cuadrado, y en caso de no cumplir condiciones de validez, el test de Fischer.

### RESULTADOS:

La prevalencia de alteraciones cromosómicas en los cariotipos estudiados en las parejas atendidas en la Unidad de Reproducción fue el 4.8% (70/1454) en los hombres de parejas estériles y el 3.95% (45/1139) en las mujeres atendidas en la Unidad de Reproducción. Para estos pacientes, la prevalencia fue similar entre autosomas y gonosomas, con un 50% y 50%, respectivamente, en el caso de los hombres de parejas estériles, y un 53.3% y 46.7%, respectivamente, para mujeres atendidas en la Unidad de Reproducción. En hombres, la alteración en gonosomas encontrada con más frecuencia fue 47,XXY y sus mosaicismos (71.4%) y en mujeres fue la 45,X y sus mosaicismos (70.8%); mientras que en autosomas fue, para hombres y mujeres por igual, la rob(13;14) (7.1% en hombres y 8.9% en mujeres). No se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de cariotipos alterados por gonosomas y autosomas, tanto alteraciones numéricas como estructurales, entre mujeres y hombres atendidos en la Unidad de Reproducción.

### CONCLUSIONES:

Consideramos que la alta prevalencia observada de alteraciones del cariotipo en la población estudiada sugiere que este estudio debe realizarse en estos pacientes. Se debe realizar un adecuado consejo genético reproductivo a los pacientes que presenten esterilidad por alteraciones cromosómicas.

## ¿HAY DIFERENCIAS MORFOCINÉTICAS ENTRE OVOCITOS FRESCOS Y VITRIFICADOS EN CICLOS DE ACUMULACIÓN DE OVOCITOS PROPIOS? RESULTADOS PRELIMINARES.

L. Herrero Grassa (1), L. Cascales Romero (1), M. Aparicio González (1), C. Tempio (1), M. Dorado Cid (1), J. Ten Morro (2), J. Llácer Aparicio (2), R. Bernabéu Pérez (2)

(1) Instituto Bernabéu - Madrid (Madrid), (2) Instituto Bernabéu Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

La vitrificación de ovocitos es una técnica de rutina en cualquier laboratorio de FIV. La reproducibilidad, eficacia y seguridad de la técnica han sido ampliamente demostradas. Además, múltiples publicaciones han descrito que el desarrollo embrionario y los resultados clínicos obtenidos con ovocitos vitrificados son similares a los obtenidos con ovocitos fresco. Una de las indicaciones de vitrificación de ovocitos más frecuente es la acumulación de ovocitos para maximizar las posibilidades de éxito del ciclo de FIV.

Por otra parte, los sistemas de incubación de embriones con tecnología time-lapse, presentes ya en muchos laboratorios de FIV, permiten valorar con detalle todos los pasos del desarrollo embrionario, y eventos morfofocinéticos de los embriones que hace años no se tenían en cuenta.

La reciente incorporación de este sistema de incubación en nuestro laboratorio y esta nueva forma de valoración embrionaria, unida al gran número de pacientes que acumulan ovocitos vitrificados para unirlos a los ovocitos obtenidos en una última punción en fresco, nos ha llevado a preguntarnos si la evolución morfofocinética de estos ovocitos desvitrificados es comparable a la de los ovocitos en fresco de esta última punción.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es comparar retrospectivamente la morfofocinética embrionaria de estos dos tipos de ovocitos: frescos y vitrificados, dentro del mismo ciclo de ICSI, con el fin de conocer si la criopreservación afecta a los ovocitos a este nivel, en este tipo de pacientes

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo preliminar que analiza 24 ciclos de ICSI de 24 pacientes con ovocitos vitrificados (143) y frescos (145) cuya última punción se realizó entre enero y marzo de 2021.

La edad media de las pacientes fue de  $39.8 \pm 2.8$ . El número de MII acumulados por paciente fue de  $11 \pm 5.7$ , y el número medio de embriones por paciente fue  $7.5 \pm 4.7$  (Tasa de fecundación: 61.9%). La tasa de formación de blastocisto útil (transferido y/o criopreservado) fue 54.4%. Se excluyeron pacientes con patología seminal severa.

Los ovocitos vitrificados/desvitrificados (Kitazato, Japan) mostraron una supervivencia del 96.5% (138) y fueron microinyectados 4 horas después de la punción/desvitrificación. El cultivo embrionario se realizó en medio Global (LifeGlobal) y en incubadores time-lapse Geri (Genea Biomedx). La lista de parámetros analizados se describe en detalle en la publicación de la ESHRE (Good practice recommendations for the use of time-lapse technology; DOI: <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>). La comparación estadística se realizó con SPSS (versión 20.0, SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

### RESULTADOS:

Los dos grupos de estudio mostraron características basales similares. Las pacientes acumularon 6.0 MII frescos y 5.7 MII desvitrificados supervivientes. Las tasas de fecundación fueron comparables, aunque mayores en el grupo de ovocitos vitrificados (63.1% vs 52.4%;  $p=0.0705$ ) y la tasa de embrión útil por grupo fue también ligeramente más alta (54.0% vs 51.3%;  $p=0.7298$ ).

De todos los parámetros morfofocinéticos analizados (dato mostrado en horas en la tabla 1), los que mostraron diferencias significativas (ver tabla 2) entre los dos grupos (frescos y vitrificados respectivamente) fueron: t7 ( $55.1 \pm 10.5$  vs  $60.4 \pm 14$ ;  $p=0.038$ ), t8 ( $59.1 \pm 12.6$  vs  $63.3 \pm 11.4$ ;  $p=0.040$ ), t compactación ( $77.2 \pm 11.2$  vs  $82.9 \pm 13.4$ ;  $p=0.026$ ) y t8-t4 ( $19.9 \pm 10.9$  vs  $23.5 \pm 10.1$ ;  $p=0.040$ ).

Se observó una tendencia general no significativa de los embriones procedentes de ovocito vitrificados a desarrollarse más lentamente.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONES:

Este estudio retrospectivo preliminar, para el que seguimos recogiendo datos a día de hoy, muestra que existe una tendencia a un desarrollo más lento de los embriones procedentes de ovocito vitrificado, que tardan más horas en realizar el segundo y el tercer ciclo celular, y en llegar a completar la fase de blastocisto cavitado. Será necesario confirmar estos hallazgos aumentando la N de nuestro estudio, y valorar las posibles causas de esta ralentización en el desarrollo, en comparación con ovocitos frescos de las mismas pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA:

*Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. ESHRE Working group on Time-lapse technology; Susanna Apter, Thomas Ebner, Thomas Freour, Yves Guns, et al. Hum Reprod Open. 2020 Mar 19;2020(2).*

*Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohi J. Six years' experience in ovum donation using vitri?ed oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. Fertil Steril 2015;104:1426–34.e8.*

*Argyle CE, Harper JC, Davies MC. Oocyte cryopreservation: where are we now? Hum Reprod Update 2016;22:440–9.*

*Cobo A, Garcia-Velasco JA. Why all women should freeze their eggs. Curr Opin Obstet Gynecol 2016;28:206–10.*

*Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitri?ed by the Cryotop method. Fertil Steril 2008;89:1657–64.*

*Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. Hum Reprod 2010;25:2239–46.*

*Cobo A, Serra V, Garrido N, Olmo I, Pellicer A, Remohi J. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitri?ed oocytes. Fertil Steril 2014;102: 1006–15.e4.*

*Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod 2011;26:2658–71.*

*Basile N, Caiazza M, Meseguer M. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? Curr Opin Obstet Gynecol 2015;27:193–200.*

*Castello D, Motato Y, Basile N, Remohi J, Espejo-Catena M, Meseguer M. How much have we learned from time-lapse in clinical IVF? Mol Hum Reprod 2016;22:719–27.*

*Rubio I, Galan A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the Embryoscope. Fertil Steril 2014;102:1287–94.e5.*

P-025 ▶

## LA REBIOPSIA EMBRIONARIA COMO HERRAMIENTA DE RESCATE DE DIAGNÓSTICO EN CICLOS DE PGT-A

**L. Rodrigo Vivó, I. Campos Galindo, A. Polo Picasso, D. Castelló Salom, L. Marín López de Carvajal, C. Simón Vallés, C. Rubio Lluesa.**

IGENOMIX - Paterna (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

La tecnología de secuenciación masiva (NGS) aplicada al diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A) permite identificar de manera precisa aneuploidías cromosómicas presentes en todas o en parte de las células (mosaicismo) en biopsias de trofoectodermo (TE). Sin embargo,

limitaciones técnicas como la biopsia de un número bajo de células, la presencia de células dañadas en la biopsia, condiciones subóptimas en el transporte de las células y la propia tecnología de secuenciación pueden generar experimentos ruidosos con parámetros de secuenciación subóptimos, y dar lugar a un diagnóstico erróneo e incluso a fallos de amplificación con ausencia de diagnóstico.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

Evaluar los resultados de NGS de una segunda biopsia de trofoectodermo (rebiopsia) como herramienta de rescate de diagnóstico en ciclos de PGT-A.

## MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio retrospectivo hemos analizado los resultados de 381 rebiopsias de trofoectodermo de ciclos de PGT-A analizados entre enero 2018 y enero 2021 en nuestro laboratorio: 37 rebiopsias de embriones con diagnóstico inicial anormal caótico (con más de 5 cromosomas aneuploides); 146 rebiopsias de embriones con diagnóstico inicial no informativo (con resultado no concluyente debido a parámetros de calidad de secuenciación subóptimos); y 198 rebiopsias de embriones con ADN no detectado por fallo de amplificación (menos de 40.000 lecturas de secuenciación) en la primera biopsia.

El análisis de aneuploidías de 24 cromosomas se realizó mediante NGS (Thermo Fisher Scientific, USA), con el uso de un algoritmo de diagnóstico propio. Para el análisis estadístico entre grupos se utilizó el test exacto de Fisher y el test t de Welch ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS:

El 1% del total de embriones analizados en nuestro laboratorio (381/39310) fueron rebiopsiados por los diferentes centros de FIV con los que colaboramos. El 55,1% de las rebiopsias fueron euploides, el 42,5% aneuploides, el 0,3% no informativas y el 2,1% resultaron con ADN no detectado. El porcentaje de rebiopsias euploides de embriones inicialmente no informativas fue significativamente mayor al de rebiopsias de embriones inicialmente caóticos y con ADN no detectado (71,2% vs. 40,5% y 46%;  $p < 0,001$ , respectivamente). Todas las rebiopsias de embriones no informativas y con ADN no detectado fueron informativas, mientras que el 2,7% de rebiopsias de embriones inicialmente caóticos fueron no informativas. El 13,5% de las rebiopsias de embriones caóticos continuaron teniendo un resultado caótico, siendo esta incidencia mayor a la observada en rebiopsias de embriones no informativas y con ADN no detectado (3,4% y 4,0%;  $p < 0,05$ , respectivamente). En el 4% de las rebiopsias de embriones con ADN no detectado se obtuvo de nuevo un resultado de ADN no detectado. (Ver Tabla 1).

## CONCLUSIONES:

La realización de una segunda biopsia embrionaria (rebiopsia) permite rescatar información cromosómica en embriones procedentes de ciclos de PGT-A, optimizando el rendimiento del ciclo de PGT-A debido al incremento del número final de embriones euploides candidatos a transfer.

P-026 ▶

## EL CULTIVO PROLONGADO DE LOS EMBRIONES EN MEDIO ÚNICO BAJO CONDICIONES DE SATURACIÓN DE HUMEDAD EN INCUBADORES TIME-LAPSE MODIFICA EL DESARROLLO E INCREMENTA LA TASA DE GESTACION EVOLUTIVA

**C. Albert Rodríguez (1), MA. Valera Cerdá (2), L. Borí Arnal (2), J. Marcos Alises (3), Z. Larreategui Laiseca (4), A. Galán Rivas (1), A. Pellicer Martínez (5), M. Meseguer Escrivá (1)**

(1) IVIRMA Valencia - Valencia (Valencia), (2) Fundación IVIRMA - Valencia (Valencia), (3) - Murcia (Murcia), (4) - Bilbao (Vizcaya), (5) - Roma (Italia)

## INTRODUCCIÓN:

Como ya sabemos la tecnología time-lapse (TTL), proporciona estabilidad al cultivo de los embriones, necesaria para la mejora de la calidad embrionaria. Aunque hoy en día se controlan numerosas variables del cultivo, la osmolaridad del medio no es un parámetro que se monitorice rutinariamente, a pesar de que alteraciones en esta pueden afectar al desarrollo. El cultivo en condiciones de humedad evita oscilaciones de osmolaridad sobre todo usando medio único.

Se ha publicado previamente que el cultivo en humedad tiene una incidencia significativa en el desarrollo embrionario y la morfocinética.

## OBJETIVO:

El objetivo del trabajo fue averiguar si las condiciones de humedad mejoran la posibilidad de embarazo cuando los embriones son cultivados hasta blastocisto con medio único utilizando la tecnología time-lapse en cultivo grupal.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Un total de 1624 tratamientos ICSI de diciembre 2017 a octubre 2020 se incluyeron en un estudio retrospectivo. Los embriones fueron cultivados en condiciones secas (n=794) o de humedad (N=830) en un incubador con tecnología time-lapse (Geri®, Genea Biomedx, Australia). Este incubador tiene 6 cámaras independientes con las que podemos trabajar en cultivo seco (CS) o cultivo húmedo (CH). Además, los pacientes se distribuyen en pacientes con ovocitos propios con análisis genético preimplantacional (TGP, N= 555), tratamientos autólogos sin TGP (N=368) y tratamientos de donación de ovocitos (N=701). Los embriones fueron cultivados en placas de 16 pocillos y con medio único (Genea Biomedx). Para evaluar el efecto de la humedad en la tasa de gestación se utilizó la regresión logística multivariable, para controlar todas las posibles variables de confusión que pudieran sesgar las conclusiones del estudio. En un subgrupo de 7294 embriones monitorizados por el software Geri Assess® 2.0 (Genea Biomedx) se compararon mediante test ANOVA las anotaciones automáticas de la morfocinética embrionaria (t2, tM y tBE) según el tipo de cultivo.

## RESULTADOS:

La edad media de las pacientes fue 39,88±4.47 años, el IMC fue 23,45±4,21 la media de ovocitos correctamente fecundados fue 7,86±3,87. El resultado del análisis reveló que los embriones cultivados en humedad tienen más posibilidad de dar lugar a

una gestación que los cultivados en seco (OR=1,30, 95% CI (1,05-1,59), P=0,014. La tasa de gestación fue significativamente mayor (P=0,017) en CH (66,7%) que en CS (60,9%). Estratificando según tratamiento, la diferencia fue significativa en el caso de ovocitos propios (68,4% en CH vs 56,5% en CS, P=0,030), y en el caso de embriones con TGP realizado (67,1 % en CH vs 56,0 % en CS, P=0,023). En el caso de los ciclos con ovocitos donados la diferencia no fue significativa (66,4% CH vs 64,7 % en CS). Los embriones desarrollados en CH tuvieron en general un desarrollo más rápido que aquellos cultivados en CS. Las anotaciones de los embriones cultivados en CH marcaron tiempos significativamente más bajos (P<0,05) que en CS en los eventos tempranos: t2: 26,82±4,25 (CH) vs 27,16±4,75 (CS); tM: 84,06±11,99 (CH) vs 86,47±10,15 (CS). Los embriones transferidos tuvieron diferencias significativas (P<0,05) en tM: 83,30±7,79 (CH) vs 85,07±8,19 (CS) y tBE: 108,44±5,77 (CH) vs 109,90 (CS).

## CONCLUSIONES:

Estos resultados muestran que el cultivo en condiciones de humedad contribuye a la mejora del desarrollo embrionario, reflejado en un desarrollo más rápido, y de los resultados clínicos, con medio único y tecnología time lapse. Estos efectos son más evidentes cuando la calidad ovocitaria está más comprometida mientras que en ciclos de buen pronóstico como en la donación de ovocitos el efecto es más leve. La consolidación de estos resultados vendrá tras la confirmación de los mismos en las tasas de niño en casa y por estudios prospectivos.

P-027 ▶

## STATE OF THE ART EN BIOPSIA DE BLASTOCISTO: EL MÉTODO DE BIOPSIA (PULLING O FLICKING) DEPENDE DEL EMBRIÓN Y NO INFLUYE EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO

**R. Noró Pi, E. García Guixé, E. Toro Toro, R. Dasí Crespo, C. Giménez Sevilla, M. Sandalinas Alabert.**  
Reprogenetics Spain - Barcelona (Barcelona)

## INTRODUCCIÓN:

Actualmente, el test genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A) en estadio de blastocisto es uno de los procedimientos rutinarios aplicado en un elevado porcentaje de ciclos de FIV. La metodología empleada en la biopsia de trofotodermo, además de mantener la integridad del embrión, debe evitar el daño en las células a analizar. Se ha sugerido que la propia metodología de biopsia podría inducir errores en el diagnóstico sobreestimando la cantidad de mosaicismo real del embrión.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es comparar las dos técnicas utilizadas para biopsia de trofotodermo ("Flicking" o "Pulling") respecto a los resultados de PGT-A, para determinar si existe un sobrediagnóstico de embriones mosaicos en alguna de ellas.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio observacional y retrospectivo se incluyen 2614 embriones correspondientes a 616 ciclos de FIV-PGT-A a los que se les ha realizado biopsia en estadio de blastocisto y análisis de aneuploidías mediante NGS. Las biopsias fueron realizadas por 6 embriólogos usando el mismo protocolo en 39 centros de FIV distintos, en blastocistos de día 5, 6 o 7 de desarrollo y en distintos grados de expansión y eclosión. El método evaluado consiste en aspirar dentro de la pipeta de biopsia las células que se desea extraer y cortar con la ayuda de un sistema láser (Hamilton Thorne, Lykos). Tomando como factor limitante el número de pulsos realizados en las uniones celulares y la reacción de las propias células a dichas acciones, si éstas se han podido desprender con el número limitado de disparos aplicado se clasifica como "Pulling" y si es necesario añadir un corte mecánico con la pipeta de "Holding" se considera método "Flicking". Se registran la cantidad de células biopsiadas, el número de pulsos, la técnica de corte y la calificación morfológica del embrión. Tras el entubado de las células biopsiadas se realiza el estudio de aneuploidías mediante NGS para determinar su dotación cromosómica.

## RESULTADOS:

De los 2614 embriones analizados, en 1800 (68.9%) se utilizó el método "Flicking" y en 814 (31.1%) "Pulling".

No se encontraron diferencias significativas respecto a la edad materna ( $35.38 \pm 0.392$  vs  $35.40 \pm 0.431$ ,  $p=0.671$ ), estimación del número de células biopsiadas ( $4.45 \pm 0.058$  vs  $4.41 \pm 0.078$ ,  $p=0.0869$ ), número medio de pulsos láser aplicados ( $4.98 \pm 0.103$  vs  $4.77 \pm 0.211$ ,  $p=0.073$ ), calidad embrionaria ( $p=0.043$ ), ni en la tasa de no amplificados y degradados (1.11% vs 0.74%,  $p=0.496$ ) entre ambos grupos. En cuanto al diagnóstico, no se observaron diferencias significativas en la tasa de mosaicismo global entre "Flicking" y "Pulling" (25.17% vs 26.61%,  $p=0.466$ ) y ambos métodos mostraron proporciones similares de embriones euploides (38.60% vs 35.15%,  $p=0.102$ ), aneuploides (34.72% vs 36.88%,  $p=0.307$ ), diploides-mosaicos (12.92% vs 15.47%,  $p=0.092$ ) y aneuploide-mosaico (12.25% vs 11.14%,  $p=0.458$ ). Los embriones considerados diploides-mosaicos también presentaban similares características en ambos grupos en lo que se refiere a número de cromosomas implicados por embrión ( $1.93 \pm 0.156$  vs  $1.98 \pm 0.235$ ,  $p=0.720$ ) y grado de mosaicismo ( $p=0.286$ ).

## CONCLUSIONES:

Las técnicas de "Flicking" y "Pulling" no presentan diferencias entre ellas respecto a la tasa de mosaicismo ni sus características cuando se realizan en función de las necesidades de cada embrión, con una metodología estandarizada, controlando el número de pulsos láser y la integridad de las células biopsiadas durante el proceso.

P-028 ▶

## PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS PREDICTORES DE MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS HUMANOS PROFASE I

**I. Moya Marín (1), I. Peinado Casas (1), P. Torres Gómez (1), M. De la Orden Rodríguez (1), L. Serralta García (1), P.J. Fernández Colom (1), M.J. Gómez Torres (2), A. Monzó Miralles (1)**

(1) Hospital Universitario y Politécnico La Fe - Valencia (Valencia), (2) Departamento de Biotecnología. Universidad de Alicante - San Vicente Raspeig (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

El éxito de la reproducción asistida (RA) está directamente relacionado con el número de ovocitos maduros obtenidos. La utilización de la técnica de maduración in vitro (MIV) puede beneficiar a las pacientes de RA, ya que el 15% de los ovocitos recuperados tras estimulación ovárica (EO) son inmaduros. Aunque inicialmente estos ovocitos han sido desechados por su reducido potencial de desarrollo, en los últimos años son muchas las publicaciones que avalan su utilización y reportan niños sanos nacidos tras MIV. Se ha referenciado que un

tamaño ovocitario mayor se corresponde con una capacidad de maduración ovocitaria superior. Además, se ha reportado que la posición central de la vesícula germinal (VG) en ovocitos Profase I (PI) de ratón se relaciona claramente con una mayor competencia meiótica, siendo aún controvertida esta asociación en ovocitos humanos. Sin embargo, poco se ha descrito de la influencia del tamaño de la vesícula germinal como posible indicador madurativo.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

Este trabajo se centra en determinar si las características morfométricas de los ovocitos en estadio de PI podrían ser utilizadas como variables predictoras del potencial de maduración ovocitario.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio prospectivo de 218 ovocitos PI. Las pacientes incluidas en el estudio firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética Humana del hospital dónde se realizó el estudio. Se analizó la posición de la VG y se realizó el análisis morfométrico de los siguientes parámetros: diámetros y áreas del ovocito, ooplasma y vesícula germinal. Estas variables fueron relacionadas con la capacidad de MIV ovocitaria hasta un máximo de 48h.

## RESULTADOS:

Con respecto a la posición de la VG, los porcentajes de maduración más bajos se detectan en las posiciones más distantes: i) vesícula muy excéntrica en contacto con el oolema, o ii) cuando ésta se encuentra en el punto central del ovocito. - Todos los diámetros analizados fueron de mayor tamaño en el grupo de ovocitos que reanudaron la meiosis, encontrándose diferencias significativas con respecto a los que no maduraron (P-valor

## CONCLUSIONES:

Según nuestros resultados, tanto el diámetro como el área de ovocito y ooplasma, se pueden considerar parámetros predictores de la capacidad madurativa de PI humanos. También puede ser un indicador efectivo para valorar la MIV el diámetro de la VG. Sin embargo, las variables posición y área de la VG no son informativas.

P-029 ▶

## MODELO PREDICTIVO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE UN PROGRAMA DE DONACIÓN DE OVOCITOS

**E. Rocafort Curià (1), U. López (2), G. Millet (1), P. Sanz (1), R. Beguería (1), F. Oliva (2), MJ. Torelló (1), M. Moragas (1)**

(1) Quirónsalud Barcelona - Barcelona (Barcelona), (2) Universidad de Barcelona - Barcelona (Barcelona)

## INTRODUCCIÓN:

La ovodonación es un tratamiento de reproducción asistida con una creciente demanda debido al aumento de mujeres con deseo de embarazo en edad avanzada. El éxito de la ovodonación puede estar influenciado por múltiples factores. Actualmente no hay ningún límite estipulado sobre el mínimo o el máximo de ovocitos que deben darse a una receptora. De hecho, un estudio concluye que no hay diferencias de embarazo por transferencia in fresco cuando se donan entre 4 y 7 ovocitos por receptora.

Sin embargo, comporta una gran generación de embriones sobrantes que posiblemente no serán utilizados debido a la edad avanzada de las pacientes. Por ello, una de las estrategias

de los centros de reproducción asistida para reducir los embriones supernumerarios es compartir donante entre varias receptoras. La dificultad de la donación compartida es definir un número prudente de ovocitos en la repartición para que las posibilidades de embarazo sean óptimas.

La existencia de un modelo predictivo facilitaría calcular las expectativas reales de éxito de cada mujer o pareja a priori y de forma individualizada.

## OBJETIVO:

Identificar qué factores pueden influenciar el éxito de un ciclo de ovodonación para poder definir un modelo predictivo que permita optimizar el reparto de ovocitos.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo donde se incluyen 197 ciclos de ovodonación con sus respectivas criotransferencias realizados a mujeres de entre 35 y 50 años entre enero del 2018 y diciembre del 2019. Se analizaron como posibles factores determinantes la edad de la donante, edad de la receptora, número de ovocitos recuperados, número de ovocitos maduros, tasa de madurez, procedencia del semen y el tipo de inseminación.

## RESULTADOS:

Respecto la edad de la donante, el corte de edad se sitúa entre los 18-29 años y los 30 y 35 años, donde la tasa acumulada de embarazo es del 56,12% para el primer grupo y del 38,46% para el segundo siendo estadísticamente significativo ( $p=0.0298$ ). Cuando analizamos el número de ovocitos recuperados, se observa un aumento en la tasa de embarazo acumulada cuando el número es inferior a 20. No observamos diferencias en el número de ovocitos recuperados respecto a la edad de la donante. Cuando se analiza el número de ovocitos maduros asignados, los puntos de corte se sitúan entre 8 ovocitos o más, de 5-7 y de 3 a 4 ovocitos. La tasa acumulada de embarazo cuando se asignan 8 ovocitos o más es del 62,5%, de 5-7 del 46,46% y de 3-4 del 42,86% haciendo evidente que cuantos más ovocitos se donan hay diferencias significativas en el número de embriones criopreservados entre grupos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni para la edad de la receptora, el tipo de semen y el tipo de inseminación.

Basado en las variables anteriores se hace un modelo de regresión logística con variable dependiente el embarazo acumulado y como variables independientes edad donante, el número de ovocitos recuperados y los ovocitos maduros asignados. Comprobamos que el modelo es globalmente significativo ( $p=0.0055$ ) y que la regresión logística se ajusta adecuadamente a los datos observados ( $p=0.4296$ ). Como resultado podemos observar en la tabla adjunta que las pacientes con mejor pronóstico serán aquellas que reciban 8 o más ovocitos de una donante menor de 30 años y con una recuperación menor de 20 ovocitos total consiguiendo una tasa de embarazo acumulada de entre 60-85% aproximadamente.

## CONCLUSIONES:

El éxito del programa de ovodonación puede venir determinado por la edad de la donante, el número de ovocitos recuperados y el número de ovocitos maduros.

Nuestro modelo predictivo basado en estos parámetros puede ofrecer un mejor reparto en un programa de ovodonación para garantizar unas tasas de embarazo óptimas.

P-030 ▶

## TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS (PGT-SR) MEDIANTE GENOTIPADO DE SNPS

**E. García Guixé (1), E. Toro Toro (1), CM. Armada Sánchez (1), D. Campos Rodero (1), L. Álvarez Gómez (1), A. Gómez Duro (2), M. Sandalinas Alabert (1), C. Giménez Sevilla (1)**

(1) Reprogenetics - Barcelona (Barcelona), (2) Reprogenetics - Madrid (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

Los individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas pueden presentar gametos desequilibrados debido a una segregación anómala durante la meiosis. La técnica empleada actualmente en el Test Genético Preimplantacional de Reorganizaciones Cromosómicas (PGT-SR) es la Next

Generation Sequencing (NGS), que permite detectar embriones desequilibrados, pero no diferencia un embrión no portador de la reorganización cromosómica materna/paterna de un portador equilibrado.



# COMUNICACIONES PÓSTERS

El genotipado de SNPs aplicado al PGT-M permite identificar el haplotipo asociado al gen de interés en una familia para evitar la transmisión de enfermedades hereditarias. Si se aplica al PGT-SR, es posible hacer el seguimiento de la reorganización cromosómica en una familia, si se dispone de un familiar de primer grado portador de la misma reorganización (en equilibrio o desequilibrio) que se usará como referencia.

Esta técnica también permite detectar anomalías cromosómicas numéricas cualitativa y cuantitativamente. El análisis cualitativo permite establecer el origen de las anomalías meióticas, no posible con la técnica empleada habitualmente en el estudio de aneuploidías embrionarias (NGS).

## OBJETIVO:

Evaluar la aplicación del genotipado de SNPs en el PGT-SR para poder diferenciar los embriones portadores equilibrados de la reorganización cromosómica de los no portadores.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se han estudiado muestras de trofoectodermo de 46 blastocistos procedentes de 11 ciclos de PGT-SR por translocaciones recíprocas. La media de edad materna de este estudio es de 35.2 años.

Tras una amplificación total del genoma por desplazamientos múltiples (MDA) en las muestras analizadas, los productos de amplificación obtenidos se han analizado mediante genotipado de SNPs (HumanKaryomap, Illumina) para el estudio de la reorganización cromosómica y de anomalías cromosómicas numéricas. Las muestras de los embriones que resultaron no portadores o portadores equilibrados de la reorganización cromosómica han sido analizadas mediante NGS para detectar y cuantificar posibles embriones mosaicos, no detectables mediante el genotipado de SNPs.

## RESULTADOS:

Del estudio de la translocación recíproca, 15 embriones resultaron desequilibrados (32.6%), 17 portadores equilibrados (37%) y 14 no portadores (30.4%).

Del total de embriones portadores equilibrados o no portadores (31), 20 embriones (43.5%) resultaron potencialmente transferibles tras el análisis de anomalías cromosómicas numéricas (se incluyen 5 embriones diagnosticados como mosaicos).

Según el sexo del portador del cariotipo alterado, en 5 casos de PGT-SR (21 embriones) la mujer es la portadora y en 6 casos (25 embriones) el portador es el hombre. No se observan diferencias entre la tasa de embriones portadores (38.1% vs. 36%), no portadores (33.3% vs. 28%), desequilibrados (28.6% vs. 36%) y transferibles (47.6% vs. 40%) en función del sexo del portador.

Respecto a las anomalías cromosómicas numéricas, 16 embriones (34.8%) presentaban aneuploidías meióticas, todos con 1 única aneuploidía excepto 1 embrión que presenta 2y1 poliploide. De ellos, 12 eventos aneuploides son de origen materno (75%) (3 en casos de mujeres portadoras de translocación y 9 en casos de hombres portadores) y 4 paternos (25%) (2 en casos de mujeres portadoras y 2 en casos de hombres).

## CONCLUSIONES:

Esta metodología permite diferenciar de forma sencilla y fiable entre embriones portadores equilibrados y no portadores en casos de PGT-SR. Los resultados preliminares de este estudio no parecen indicar que haya una segregación preferente dentro de la segregación alternante, que da lugar a los portadores equilibrados y los no portadores. Este dato puede ser interesante para el asesoramiento de otras parejas portadoras de translocaciones recíprocas que realizan el análisis mediante NGS que no permite dicha diferenciación.

Por ello, proponemos esta metodología como técnica de elección en casos de translocaciones heredadas dónde los pacientes deseen conocer el estatus de portador/no portador del embrión transferido y en reorganizaciones en las que el punto de ruptura haya supuesto la disrupción de un gen y los portadores equilibrados puedan presentar un fenotipo alterado.

## ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS EN EMBRIONES DE PACIENTES CON FISH EN ESPERMATOZOIDES ALTERADO

**J. Barkin Astillero, D. Campos Rodero, E. Toro Toro, E. Garcia Guixé, R. Noró Pi, C. Giménez, E. Fernández García, M. Sandalinas Alabert.**  
Reprogenetics - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La infertilidad masculina afecta aproximadamente al 6% de hombres en edad reproductiva. Varios estudios han encontrado una relación entre infertilidad en el varón y anomalías cromosómicas en los espermatozoides. Por este motivo, en parejas que presentan infertilidad de causa desconocida o que han tenido abortos o fallos en ciclos de FIV sin causa femenina aparente, está indicado un diagnóstico genético en espermatozoides (DGE), sobre todo en aquellos casos en que el varón presente parámetros seminales alterados. En caso de resultado alterado, sería recomendable la realización de un test genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A). No obstante, hay pocos estudios que profundicen en si los espermatozoides aneuploides tienen una influencia directa en las anomalías cromosómicas encontradas en los embriones.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es determinar la posible relación entre los resultados de DGE alterado y la tasa de aneuploidías en embriones que provienen de ciclos de FIV-PGT-A.

### MATERIAL Y MÉTODO:

El DGE fue realizado mediante la técnica de FISH (Hibridación in situ de fluorescencia) en espermatozoides en parejas con abortos previos o de repetición, fallos repetidos de FIV o parámetros seminales alterados. El grupo de estudio está formado por pacientes con DGE alterado (n=93) que realizaron al menos un ciclo de FIV-PGT-A en biopsias de trofoectodermo y fueron analizados mediante NGS entre enero de 2018 y marzo de 2021. En el DGE se estudiaron los cromosomas sexuales, 13, 14, 15, 18, 20, 21 y 22. Se consideró un DGE alterado en pacientes que presentaban un valor de disomías para alguno de los cromosomas estudiados o de espermatozoides diploides estadísticamente significativo respecto a la población control ( $p < 0.05$ ) mediante Test  $\chi^2$ .

En cuanto a los resultados de PGT-A, para evitar un sesgo creado por la edad materna avanzada en la población, se consideran exclusivamente pacientes con una edad materna de hasta 34 años y sin factor masculino. Los resultados se clasifican en: euploides, mosaicos simples (1 o 2 cromosomas implicados), mosaicos complejos ( $\geq 3$  cromosomas implicados), aneuploides-mosaicos, aneuploides (1 o 2 cromosomas con anomalías) y anormales complejos ( $\geq 3$  cromosomas). De la misma manera, se crea una población control en la cual se consideran los ciclos con PGT-A por elección propia del paciente y misma edad materna (n=165).

### RESULTADOS:

La media de edad materna en la población problema es de 29,5 años, mientras que la de la población control es de 28,3 años. En los resultados de PGT-A de la población problema se obtienen 491 embriones: 244 euploides (49,7%), 69 mosaicos simples (14,1%), 7 mosaicos complejos (1,4%), 42 aneuploides-mosaicos (8,5%), 102 aneuploides (20,8%) y 27 anormales complejos (5,5%).

Los embriones incluidos en la población control (n=817) se clasifican de la siguiente manera: 423 euploides (51,8%), 118 mosaicos simples (14,5%), 40 mosaicos complejos (4,9%), 73 aneuploides-mosaicos (8,9%), 131 aneuploides (16,0%) y 32 anormales complejos (3,9%).

Se observa que el grupo de pacientes con DGE alterado presenta un incremento estadísticamente significativo de embriones anormales (aneuploides, aneuploides-mosaicos y anormales complejos) respecto a la población control: 34,8% vs. 28,8% respectivamente ( $p=0.0289$ ).

### CONCLUSIONES:

Según los resultados obtenidos en este estudio, el grupo de pacientes que presentan DGE alterado tiene una tasa de aneuploidías en embriones en ciclos de PGT-A superior a la que le correspondería por grupo de edad materna. Por este motivo, se recomienda el estudio de FISH a los pacientes que presentan abortos recurrentes o ciclos de FIV fallidos sin ser el factor femenino aparentemente el origen.

## EL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE EMBRIONES HUMANOS BLOQUEADOS EN ESTADIOS TEMPRANOS

**D. Beltrán Torregrosa (1), M. Pérez Sánchez (1), F. Insua (1), A. Quiñonero Villora (2), F. Domínguez Hernández (2), A. Mercader Bayarri (1), MJ. De los Santos Molina (1)**

(1) IIRMA - Valencia (Valencia), (2) Fundación IVI, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

Durante el cultivo embrionario pueden desencadenarse situaciones de estrés que pueden afectar a la viabilidad embrionaria. Una de esas situaciones es compatible con el bloqueo del desarrollo embrionario en estadios tempranos del desarrollo. Los embriones bloqueados experimentan un incremento en la síntesis de ADNmt por encima de lo esperado según su desarrollo (Pérez-Sánchez, ESHRE 2019). Este incremento en el contenido de ADNmt podría ser un reflejo de un metabolismo basal alto para poder compensar el bloqueo en el ritmo de división (Leese, 2012). El estudio del perfil transcripcional durante el desarrollo del embrión humano proporcionará más información sobre los procesos moleculares claves implicados en la detención del desarrollo embrionario temprano.

### OBJETIVO:

Determinar cuáles son las vías moleculares sobreactivadas en embriones bloqueados.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo en un total de 15 embriones donados a investigación: 10 embriones de día 3 evolutivos (edad media = 29,9 años) y 5 embriones bloqueados en entre día 2 y día 3 desarrollo (edad media = 38,8 años). Todas las muestras se desvitrificaron y se incluyeron en tubos de PCR con 2 µl de tampón adecuado para el protocolo de secuenciación de ARN.

Las muestras se analizaron mediante secuenciación de ARN (RNA-seq). Se realizaron estudios de correlación, componentes principales y análisis de expresión diferencial con el paquete DESeq2. Los análisis de expresión génica diferencial se realizaron mediante la prueba paramétrica de Wald, con corrección de

prueba múltiple de Benjamini-Hochberg (padj). Finalmente, se utilizó el algoritmo Fgsea para el análisis de enriquecimiento en las vías de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y en los términos de Gene Ontology (GO).

### RESULTADOS:

Al comparar los embriones bloqueados con los embriones evolutivos, observamos varias vías relacionadas con la producción de ATP (ensamblaje de la cadena transportadora de electrones, fosforilación oxidativa, formación de crestas, síntesis de ATP, etc.) y vías de apoptosis relacionadas con mitocondrias (regulación de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa involucrada en la vía de señalización apoptótica, respuesta al estrés del retículo endoplásmico, etc.) significativamente ( $P < .05$ ) reguladas al alza en embriones bloqueados.

Por tanto, los embriones humanos bloqueados en paralelo con el aumento en el contenido de ADNmt muestran una regulación positiva de la actividad mitocondrial y el estrés celular que está en línea con el metabolismo hiperactivo esperado de los embriones no viables.

### CONCLUSIONES:

Existe una regulación positiva de la actividad mitocondrial y de las vías relacionadas con el estrés celular en embriones bloqueados, lo que está de acuerdo con la "hipótesis silenciosa". Este estudio evidencia la relación entre el aumento extremo del contenido de ADNmt y la identificación de las vías involucradas en el metabolismo activo y la apoptosis en embriones humanos estresados. Dado que la mayoría de los embriones bloqueados en estadios tempranos de división tienen anomalías cromosómicas queda por resolver la relación causa-efecto de este perfil transcripcional y la configuración cromosómica de los embriones bloqueados.

## ¿EL TRATAMIENTO DE LA DISBIOSIS ENDOMETRIAL MEJORA LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA?

**X. Pérez Martín, M. Rodríguez Alonso, F. López-Roibal Mourelle, B. García García, A. Durán Boo, R. Devesa Hermida, S. García-Oro.**

Equipo Ron, Hospital Quirónsalud A Coruña - A Coruña (A Coruña)

### INTRODUCCIÓN:

Estudios realizados en los últimos años mediante secuenciación del ARN-r 16S bacteriano han revelado cierta correlación entre el microbioma endometrial y los resultados reproductivos. Algunos autores han relacionado determinados perfiles microbianos con la implantación embrionaria, de forma que los ambientes uterinos en los que predomina el *Lactobacillus* tendrían mejor pronóstico, en comparación con aquellos en los que la presencia de otras bacterias ha desplazado al *Lactobacillus*. Actualmente existen test que nos permiten estudiar el microbioma endometrial, aportándonos información que podría ayudar en la personalización de las transferencias embrionarias.

### OBJETIVO:

Valorar la utilidad de los análisis de microbioma endometrial en los tratamientos de reproducción asistida.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se ha realizado un estudio retrospectivo observacional en pacientes que han realizado en nuestro centro algún ciclo de FIV/ICSI con ovocitos propios o donados, con al menos dos transferencias de embriones de día 5/6 con resultado negativo. En todos los casos las transferencias habían sido diferidas (criotransferencias) y de un único blastocisto.

A estas pacientes se les realizó, entre otras pruebas diagnósticas, un Análisis Metagenómico de la Microbioma Endometrial (EMMA) (Igenomix S.L.) entre enero del 2019 y marzo de 2021. Aquellas que presentaron una microbiota endometrial alterada se trataron con probióticos solo o en combinación con antibióticos, según los resultados.

Durante el seguimiento posterior de estas pacientes se ha tenido en cuenta el restablecimiento de la microbiota endometrial a valores normales (alto porcentaje de *Lactobacillus*) así como el resultado de hasta dos criotransferencias posteriores al tratamiento.

### RESULTADOS:

De las 58 pacientes que se realizaron el test EMMA, 39 (68,4%) presentaron una microbiota alterada. Después del tratamiento correspondiente, se ha transferido al menos un blastocisto a 26 de estas pacientes, consiguiendo una tasa de gestación e implantación del 38,5 % tras la primera criotransferencia, y una tasa de gestación e implantación acumulada del 50 % después de dos transferencias.

Al estudiar a las pacientes con presencia de disbiosis endometrial, encontramos un primer grupo formado por 14 pacientes que presentaban una disbiosis leve y que solo han necesitado probióticos para restablecer su microbiota. Un segundo grupo incluye a pacientes con una disbiosis más severa (12 pacientes) y que han necesitado el uso de antibióticos además de los probióticos. La diferencia principal entre ambos grupos es el tiempo que tardan en restablecer la microbiota, siendo superior en las pacientes que necesitan tratamiento antibiótico debido a la duración del mismo. A nivel de resultados reproductivos no hemos encontrado ninguna diferencia entre ambos.

### CONCLUSIONES:

A pesar de que el número de pacientes incluidas en este estudio es limitado, a la vista de los resultados presentados, el tratamiento de la disbiosis endometrial parece tener un claro impacto positivo en las tasas de gestación e implantación. La posibilidad de evaluar el microbioma endometrial nos abre una nueva vía para personalizar la transferencia embrionaria y optimizar, de esta manera, los resultados reproductivos.

## ¿ES POSIBLE PREDECIR EL COLAPSO BLASTOCÉLICO A PARTIR DE LOS PARÁMETROS TIME-LAPSE?

**J. Sarquella Ventura (1), M. Grossmann Camps (2), M. Hugas Mulà (1), L. Julià Andrés (1), M. Fernández Reig (1), M. Dalmau Quera (1), E. Pinart Nadal (3)**

(1) Unitat de Reproducció Humana. Clínica Girona - Girona (Girona), (2) BarcelonaIVF - Barcelona (Barcelona), (3) Universitat de Girona - Girona (Girona)

### INTRODUCCIÓN:

Estudios recientes demuestran que los blastocistos humanos obtenidos en programas de reproducción asistida pueden sufrir contracciones seguidas de expansión poco antes de su eclosión. La intensidad y número de contracciones es variable, mientras que las causas del colapso y sus consecuencias sobre la capacidad de implantación y desarrollo embrionario son objeto de debate. Algunos estudios sugieren que el colapso podría estar relacionado con las características morfocinéticas del blastocisto.

### OBJETIVO:

Determinar la relación existente entre la presencia y número de colapsos y los parámetros cinéticos y de calidad del blastocisto.

### MATERIAL Y MÉTODO:

En el estudio se incluyeron 134 parejas de nuestro programa de FIV/ICSI, con un total de 142 ciclos. Para la estimulación ovárica se utilizaron gonadotropinas de origen recombinante y análogos de la GnRH. Los ovocitos fueron fecundados mediante ICSI y cultivados a 37°C, 6,5% CO<sub>2</sub> y 7% O<sub>2</sub>, en medio único GLOBAL® o SAGE® en un incubador time-lapse (TL) Embryoscope® hasta el estadio de blastocisto eclosionado (HB); los fotogramas se obtuvieron a intervalos de 20 min. Se analizaron 261 blastocistos, valorándose los parámetros TL: tPB2, tPNa, tPNf, t2-t8, tM, tSB, tB, tEB, tHB, tECC2, tECC3 y VP. La evaluación morfológica se realizó siguiendo los criterios ASEBIR, a partir de la determinación del grado del trofotodermo y la masa celular interna (MCI) y el score embrionario. Para la determinación del patrón de colapso se utilizó la aplicación Elypse del Embryowiewer, identificándose tres tipos de colapso: 1) tipo I, con un patrón de una o varias contracciones y reducción de menos del 50% del volumen blastocélico, 2) tipo II, con una o varias contracciones y reducción igual o superior al 50% del volumen blastocélico, y 3) tipo III, en el que se incluyó cualquier otra combinación de colapsos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de análisis de la varianza, con una significación  $P < 0,05$ .

### RESULTADOS:

El porcentaje de blastocistos eclosionados en los que se observó un patrón de colapso seguido de expansión fue del 48,3%. (n = 126), de los cuales el 62,7% (n = 79) mostraron un único colapso y el 37,3% (n = 47) dos o más colapsos. El patrón de colapso fue de tipo I en un 69,3% de los blastocistos y de tipo II y III en un 22,1% y un 8,7%, respectivamente.

Los blastocistos eclosionados con y sin colapso no difirieron en los parámetros time-lapse ( $P > 0,05$ ), aunque se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en el score embrionario ( $P < 0,0005$ ), así como en el grado del trofotodermo ( $P < 0,0005$ ) y la MCI ( $P = 0,004$ ). Así pues, el 65,5% de los blastocistos de grado A no colapsaron, mientras que el 61,5% y 65,5% de los blastocistos de grado B y C, respectivamente, presentaron como mínimo un colapso. La calidad morfológica del blastocisto no afectó a su patrón de colapso, de modo que para cualquier score embrionario y grado de la MCI y del trofotodermo el patrón de tipo I se manifestó con una incidencia  $\geq 65\%$ .

El número de colapsos no dependió de la cinética time-lapse ( $P > 0,05$ ), pero sí de la puntuación del blastocisto ( $P < 0,0005$ ) y del grado del trofotodermo ( $P < 0,0005$ ) y la masa celular interna ( $P < 0,0005$ ).

### CONCLUSIONES:

El colapso blastocélico tiene una incidencia notable en el conjunto de embriones que eclosionan.

La presencia y número de colapsos dependen de la calidad embrionaria, de manera que la mayoría de los blastocistos de grado A eclosionados no muestran colapso.

La cinética embrionaria no permite predecir ni la presencia ni el número y tipo de colapso blastocélico.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

**Tabla 1.** Resultados en función del incubador empleado

		muestras informativas* (n)	muestras concordantes (n)	concordancia (%)
time-lapse	EmbryoScope	37	32	86,5
convencional	K-System	112	95	84,8
	Heracell	8	7	87,5
	Minc	40	33	82,5
	ASTECC	6	5	83,3
	Miri	18	15	83,3

p = NS

**Tabla 2.** Resultados en función del medio de cultivo empleado

		muestras informativas* (n)	muestras concordantes (n)	concordancia (%)
único	Global total	84	69	82,1
	CSCM	66	57	86,4
	G-TL	37	33	89,2
	Sage-1	48	42	87,5
secuenciales	Sage ART-1529	11	9	81,8
	G5plus	8	7	87,5

p = NS

\* Consideramos informativas aquellas parejas de muestras en las que fue posible obtener un diagnóstico en ambas.

P-035 ▶

## UTILIDAD DEL PGT PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS TRASLOCACIONES SUBTELOMÉRICAS CRÍPTICAS EN PACIENTES CON ABORTO DE REPETICIÓN

B. Lledó Bosch, R. Morales Sabater, JA. Ortiz Salcedo, A. Cascales Hernández, A. Fabregat Reolid, J. Ten Morro, B. Moliner Renau, A. Fuentes Rozalén, A. Bernabéu García, R. Bernabéu Pérez.  
Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

Las traslocaciones cromosómicas se asocian con frecuencia con defectos congénitos, pérdidas espontáneas del embarazo e infertilidad. Sin embargo, las traslocaciones submicroscópicas (las denominadas traslocaciones crípticas) son demasiado pequeñas para ser detectadas en el cariotipo convencional. Debido a que se trata de alteraciones balanceadas, las técnicas moleculares de alta resolución como arrayCGH no son capaces de identificarlas. Por lo tanto, la detección de traslocaciones crípticas es un desafío.

El PGT puede detectar CNVs (cambios en el número de copias) de regiones cromosómicas con una resolución más alta que el cariotipo convencional. Por tanto, el diagnóstico repetido de una misma CNV a nivel embrionario podría sugerir una traslocación parental submicroscópica.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es investigar la viabilidad de utilizar PGT como método para identificar traslocaciones crípticas equilibradas en pacientes que sufren abortos de repetición.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se incluyeron tres parejas que se sometieron a PGT por abortos de repetición (RPL) en nuestra clínica desde febrero de 2020 hasta noviembre de 2020. Las causas comunes de RPL (anomalías uterinas, síndrome antifosfolípido, trastornos inmunológicos, hormonales y metabólicos) se descartaron previamente. Los cariotipos de la pareja fueron normales. Veintitrés embriones de esas parejas se biopsiaron en estadio de blastocisto y se analizaron para la detección de CNVs utilizando NGS de genoma completo de baja profundidad (Veriseq-NGS (Illumina)). Se realizó una hibridación fluorescente in situ (FISH) utilizando muestras de sangre de los padres para validar el origen de la CNVs submicroscópica. Se seleccionaron sondas específicas subteloméricas disponibles comercialmente de acuerdo con la CNV identificada. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante.

## RESULTADOS:

Se detectaron CNVs terminales que implican derivados de traslocaciones desequilibradas en el 43,5% de los embriones biopsiados. Para la pareja 1, 4 de cada 5 embriones (80%) presentaban delección de la región telomérica en los cromosomas 5 y 21. Tres de los 6 embriones biopsiados (50%) fueron diagnosticados con CNVs submicroscópica en la región telomérica en los cromosomas 6 y 16 para la pareja 2. En el caso de

la pareja 3, tres de los 12 embriones (25%) eran portadores de CNVs en la región subtelomérica de los cromosomas 2 y 6. El tamaño de las CNVs detectadas varió de 8 Mb a 20 Mb. Mediante FISH se realizó un diagnóstico preciso de los padres. La combinación de sondas para detectar la alteración cromosómica estructural fueron: Tel5qter-LSI21q, Tel6pter-CEP16 y Tel6pter-CEP6 para cada pareja respectivamente. Los estudios FISH revelaron que las CNVs se heredaron de uno de los progenitores que era portador de la traslocación críptica equilibrada. Finalmente, el cariotipo anormal del padre portador fue 46, XY, t (5; 21) (q33.2; q21.2) para la pareja 1, 46, XY, t (6; 16) (p22.3; q22. 1) para la pareja 2 y 46, XY, t (2; 6) (p25.1; p24.2) para la pareja 3. Por último, cada pareja realizó una criotransferencia de un solo embrión normal balanceado, y como resultado hay dos embarazos en curso.

## CONCLUSIONES:

Este estudio pone de manifiesto la utilidad del PGT para RPL de origen desconocido, seguido de FISH parental para caracterizar mejor las CNVs e identificar parejas en las que uno de los miembros es portador de una translocación críptica. El diagnóstico preciso de la translocación cromosómica de los padres se puede lograr únicamente con FISH, pero el FISH no se realizaría a menos que PGT mostrara una CNV sospechosa. Por lo tanto, el PGT es una potente herramienta para detectar traslocaciones crípticas subteloméricas balanceadas que permiten establecer la etiología del aborto recurrente. Y un asesoramiento genético posterior.

P-036 ▶

## CORRELACIÓN ENTRE UN SISTEMA AUTOMATIZADO DE CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES CON SU MORFOLOGÍA (ASEBIR), SU POTENCIAL DE LLEGADA A BLASTOCISTO E IMPLANTACIÓN

**B. Aparicio Ruiz (1), S. Pérez Albalá (1), M. Valera Cerdá (2), C. Albert Rodríguez (1), D. Beltrán Torregrosa (1), A. Galán Rivas (1), T. Viloría Samochin (1), M. Meseguer Escribá (1)**

(1) IV Valencia - Valencia (Valencia), (2) Fundación IV - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

El primer algoritmo Eeva (Early Embryo Viability Assessment) estaba basado únicamente en la combinación de dos parámetros calculados automáticamente por el sistema:  $P2=t3-t2$  y  $P3=t4-t3$ . Este algoritmo ya fue propuesto por Wong et al (2010). Varios grupos han demostrado la utilidad de esta clasificación obteniéndose mejoras en la selección embrionaria

y disminuyendo la variabilidad entre embriólogos (VerMilyea et al 2014, Conaghan et al 2013, Aparicio-Ruiz et al 2016). Actualmente, una versión mejorada del algoritmo (Eeva Xtend®) permite clasificar los embriones en 5 categorías. Además de tener en cuenta los valores de P2 y P3, incorpora la edad de los ovocitos, número de células en D3 y un análisis de la textura del embrión (relacionado con la fragmentación) para clasificar los embriones.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

Analizar correlación entre la clasificación automática proporcionada el día 3 de desarrollo por el sistema del algoritmo Eeva Xtend (Evaluación de viabilidad embrionaria temprana) con el porcentaje de embriones viables, blastocistos (y la calidad de los mismos), tasa de implantación.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio de cohorte retrospectivo, observacional.

El estudio incluyó 693 pacientes. Un total de 5490 embriones generados por ICSI se incubaron en sistema con time-lapse GERI (Genea, Australia) que incluye un software automático (Eeva, Xtend) que clasifica los embriones del 1 al 5 utilizando: P2 (t3-t2), P3 (t4-t3), edad del ovocito, número de células en día 3 y un análisis de imagen de la textura (correlacionado con la fragmentación). Los blastocistos se clasificaron según la morfología de la masa celular interna y el trofotodermo (ASEBIR). Analizamos para la implantación aquellos casos en los que el número de sacos gestacionales coincidía con el número de embriones transferidos (KID).

## RESULTADOS:

La distribución de los embriones según la clasificación Xtend fue: 1: 25,2%; 2: 20,2%; 3: 15,8%; 4: 17,7%; 5: 21,1%.

Dentro de cada categoría Xtend, evaluamos la distribución de los embriones según la clasificación morfológica de ASEBIR (Tabla 1 p<0.001).

El porcentaje de embriones viables (transferidos o vitrificados) en cada categoría fue: 1: 66,6%, 2: 56,7%, 3: 50%, 4: 35,5%, 5:

11,8% (p <0,0001). De los 5490 embriones categorizados, 3720 alcanzaron el estadio de blastocisto. La tasa de blastocistos en cada categoría fue: 1: 87,5%, 2: 83%, 3: 75,2%, 4: 60,7%, 5: 30,2% (p <0,0001). También analizamos la morfología de los blastocistos (categorizados A-B ASEBIR) en cada categoría Xtend. 1: 54,8%, 2: 45,3%, 3: 34,5%, 4: 24,7%, 5: 6,5% (p <0,0005). La tasa de implantación de los embriones KID (n = 1070) fue: 1: 53,5%, 2: 52,8%, 3: 41,1%, 4: 37,4%, 5: 27%. (p <0,0001). Si distinguimos entre embriones frescos y congelados, la tasa de implantación fue: CONGELADOS 1: 55,6%, 2: 50%, 3: 36,7%, 4: 38,9%, 5: 28,9% (p = 0,004); FRESCO 1: 48,9%, 2: 61,1%, 3: 49,2%, 4: 33,3%, 5: 22,2% (p = 0,008). También realizamos un modelo de regresión logística para la implantación, en el que se incluyó el IMC, el tipo de ciclo y la morfología ASEBIR del blastocisto. El modelo reveló una OR 3,20 (IC95% 1,57-6,50) (p = 0,001) comparando Xtend 1 vs 5 y una OR 2,52 (IC95% 1,23-5,19) (p = 0,012).

## CONCLUSIONES:

Observamos que dentro de cada categoría ASEBIR, el porcentaje de embriones clasificados con las mejores categorías Xtend aumenta conforme a la morfología del blastocisto.

Existe una correlación directa entre las categorías Xtend, porcentaje de embriones viables, tasa de blastocistos y tasa de blastocistos de buena morfología. En cuanto a la tasa de implantación total, observamos diferencias significativas entre categorías, incluso cuando distinguimos entre embriones frescos y congelados. El presente estudio está reforzado por el tamaño de muestra más grande utilizando este algoritmo hasta la fecha. Además, un análisis multivariable confirmó la magnitud de los resultados. El presente estudio fortalece la utilización de manera complementaria de la morfología y las clasificaciones automáticas basadas en la morfocinética con el fin de mejorar el proceso de selección de blastocistos con mayor potencial de éxito.

CAT EXTEND		CALIDAD D5/6 (ASEBIR)				
		A	B	C	D	N
1	n	129	627	303	319	1378
	% EXTEND	9,40%	45,50%	22,00%	23,10%	25,17%
2	n	58	444	246	360	1108
	% EXTEND	5,20%	40,10%	22,20%	32,50%	20,24%
3	n	32	266	206	360	864
	% EXTEND	3,70%	30,80%	23,80%	41,70%	15,78%
4	n	13	227	175	553	968
	% EXTEND	1,30%	23,50%	18,10%	57,10%	17,68%
5	n	6	70	103	977	1156
	% EXTEND	0,50%	6,10%	8,90%	84,50%	21,12%
TOTAL	n	238	1634	1033	2569	5474
	% EXTEND	4,30%	29,90%	18,90%	46,93%	100,00%



## ICSI POR PRESIÓN O ASPIRACIÓN Y SU POSIBLE IMPACTO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

**M. Benavent Martínez (1), C. Miret Lucio (1), M. Escribá Suárez (1), D. González Abreu (1), A. García Esteve (1), M. Lozano Zamora (1), N. Costa Borges (2), G. Calderón de la Olla (2), J. Crespo Simó (1), J. Teruel López (1)**

(1) Equipo Médico Crespo - Valencia (Valencia), (2) Embryotools - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La técnica de inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) se incorporó en los laboratorios de FIV a principios de los 90, constituyendo uno de los grandes hitos de la reproducción humana. Diseñada para el tratamiento del factor masculino grave, se introdujo de forma inmediata como técnica de rutina en los laboratorios de FIV por su alta eficacia. En la mayoría de laboratorios, para romper la membrana ovocitaria, se utiliza preferentemente la aspiración en lugar de la presión.

### OBJETIVO:

En este estudio se ha establecido como objetivo principal evaluar el impacto de dos métodos de microinyección (aspiración y presión) en la calidad y desarrollo de los embriones generados.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se trata de un estudio prospectivo randomizado que analizó un total de 801 ovocitos en metafase II procedentes de 67 ciclos de ovodonación realizados entre enero y diciembre del 2020. Los embriones se cultivaron en medio único y el ICSI se llevó a cabo con la ayuda de un sistema de micromanipulación Takanome™ (Narishige, Japón). Se microinyectaron de forma randomizada la mitad de los ovocitos de cada receptora, por presión (grupo P) o por aspiración (grupo A). En el grupo P, tras la microinyección, se observó que en el 77,9% de los ovocitos la rotura de la membrana se producía por presión (RP). En los ovocitos en los que se tuvo que aspirar para romper la membrana se observaron distintos grados de aspiración: A1 (leve), A2 (media), A3 (alta) y RT (rotura inmediata de la membrana). En el grupo A se anotó de igual modo el grado de aspiración utilizado para romper la membrana (A1, A2, A3 y RT) siendo el más frecuente la aspiración A2 (81,9%).

Una vez generados los embriones se cultivaron hasta estadio de blastocisto anotando su calidad en día 2, 3 y 5 de desarrollo, así como su destino: congelación, transferencia o no viable.

El análisis estadístico se realizó mediante Chi-cuadrado.

### RESULTADOS:

En el estudio se microinyectaron 801 ovocitos; 403 asignados al grupo P y 398 al grupo A. De los 403 del grupo P, 314 se rompieron realmente por presión RP (77,92%) y en el grupo A en 326 se utilizó la aspiración tipo A2 (81,93%). Éstos dos subgrupos representan los métodos de rotura más frecuentes y por lo tanto se realizó el estudio comparativo entre ellos. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a las tasas de fecundación (87,26% RP vs 86,81% A2), tasas de fecundación anómala (3,51% RP vs 5,21% A2) y tasas de degeneración (2,87% RP vs 4,29% A2). Tampoco se encontraron diferencias significativas en las tasas de embriones de buena calidad en día 2 (67,51% RP vs 67,35% A2) y día 3 (58,76% RP vs 56,89%). Sin embargo, sí que se observaron diferencias significativas a favor del grupo (RP) respecto a (A2) en cuanto a la tasa de formación de blastocisto (73,7% RP vs 65,4% A2) ( $p=0,032$ ) y de blastocisto útil (59,5% RP vs A2 50,9%) ( $p=0,041$ ).

Se observó que los ovocitos que no ofrecieron resistencia a la microinyección (grupo RT) presentaron una alta tasa de degeneración (15,8%), menor tasa de fecundación (68,4%) y menor tasa de blastocisto útil (42,3%).

### CONCLUSIONES:

Los resultados de nuestro estudio indican que las técnicas de microinyección por aspiración o presión presentan resultados similares en lo que se refiere a tasas de fecundación, y calidad embrionaria en los días 2 y 3 de desarrollo, pero sí existen diferencias significativas en cuanto a la tasa de formación de blastocisto y blastocisto útil a favor de la técnica de presión.

## LOS RESULTADOS CLÍNICOS DE LOS EMBRIONES MOSAICO SON INDEPENDIENTES DE LA EDAD MATERNA

**A. Cascales Hernández, R. Morales Sabater, B. Lledó Bosch, JA. Ortiz Salcedo, J. Guerrero Villena, J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu Pérez.**

Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

Es frecuente encontrar alteraciones cromosómicas en los embriones procedentes de ciclos de fecundación in vitro analizados por PGT-A. Una de estas alteraciones es el mosaicismo, que consiste en la presencia de dos o más líneas celulares diferentes.

Distintos estudios afirman que los embriones mosaico presentan una menor tasa de implantación y de embarazo evolutivo. Sin embargo, los factores que afectan a la implantación, así como al desarrollo de los embriones mosaico son controvertidos. Recientemente, Victor et al. (2019) exponían en su trabajo que los embriones mosaico generados a partir de ovocitos de mujeres jóvenes mostraban mejores resultados que aquellos que procedían de mujeres más mayores.

### OBJETIVO:

El objetivo principal del estudio ha sido evaluar el efecto de la edad materna en los resultados clínicos de las transferencias de embriones mosaico.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Para conseguir nuestro objetivo, se llevó a cabo un estudio retrospectivo. Fueron incluidos un total de 136 embriones mosaico procedentes de ciclos con PGT-A realizados entre mayo de 2014 y octubre de 2020 en nuestra clínica de reproducción asistida. Solamente fueron incluidos ciclos con un único embrión transferido.

Los parámetros clínicos evaluados fueron los valores de la  $\beta$ -hCG, tasa de implantación y embarazo evolutivo. La  $\beta$ -hCG fue medida en sangre 14 días después de la transferencia embrionaria y se consideró positiva con un valor superior a 2mUI/ml.

Los embriones fueron biopsiados en día 5 o 6 de desarrollo y analizados genéticamente mediante microarrays (Agilent SurePrint G3 8x60K) o por secuenciación masiva (Veriseq, Illumina). El embrión fue considerado mosaico cuando el porcentaje de células aneuploides fue del 25-50% en aCGH o del 20-50% en NGS. La mayoría de los blastocistos incluidos en el estudio fueron analizados por NGS (n=109; 69,9%), mientras que por aCGH lo hicieron 47 (30,1%).

Para evaluar la relación entre la edad materna y los distintos resultados clínicos, se realizó un análisis estadístico mediante SPSSv20.0. La calidad embrionaria, el porcentaje de mosaicismo, el mosaicismo segmentario, así como si el embrión transferido fue o no vitrificado previamente se introdujeron como variables de confusión.

### RESULTADOS:

En primer lugar, evaluamos si el porcentaje de mosaicismo o si el mosaicismo segmentario podría estar afectando a la capacidad de implantación de estos embriones. Ninguno de estos dos factores se correlacionó con los valores de la  $\beta$ -hCG, tasa de implantación y embarazo evolutivo.

Para evaluar el impacto de la edad materna en los resultados clínicos, establecimos dos grupos diferentes dependiendo de si los embriones fueron generados a partir de ovocitos procedentes de mujeres jóvenes ( $\leq 35$  años; n=62) o mayores ( $>35$  años; n=74).

No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos y la tasa de  $\beta$ -hCG positiva (45,2% en el grupo de  $\leq 35$  años vs 54,1% en el de  $>35$  años; p=0,476), la tasa de implantación (30,6% vs 39,2%; p=0,855) y la tasa de embarazo evolutivo (19,4% vs 35,1%; p=0,245).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONES:

A diferencia de lo que concluyen otros estudios, nuestros resultados muestran que la edad materna no se correlaciona con los resultados clínicos tras la transferencia de un embrión mosaico. Por lo tanto, en ausencia de embriones euploides, los embriones mosaico deberían ser considerados para su transferencia independientemente de la edad materna, obteniéndose resultados similares.

## BIBLIOGRAFÍA:

Victor AR, Tyndall JC, Brake AJ, Lepkowsky LT, Murphy AE, Griffin DK, McCoy RC, Barnes FL, Zouves CG, Viotti M. One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in healthy pregnancies. *Fertil Steril.* 2019 Feb;111(2):280-293. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.019. PMID: 30691630

**Tabla 1.** Resultados POC en función de la edad materna

	Edad materna ≤35 años	Edad materna >35 años
Número de casos (%)	258 (49,2)	266 (50,8)
Edad materna media	31,7± 3,2	38,8± 2,0
MCC (solo tejido materno)	51 (19,8)	54 (20,3)
Aneuploides	96 (37,2)	132 (49,6)
Triploides	13 (5,0)	10 (3,8)
X0	19 (7,4) <sup>(*)</sup>	11(4,1) <sup>(*)</sup>
Trisomía 15	7 (2,7) <sup>(**)</sup>	24 (9,0) <sup>(**)</sup>
Trisomía 16	9 (3,5)	16 (6,0)
Trisomía 22	6 (1,9)	12 (4,5)
Trisomía 21	8 (3,1)	12 (4,5)

(\*) p=0,0323

(\*\*) p=0,0494

MCC: contaminación con células maternas (*Maternal Cell Contamination*)

## EFECTO DE LA EDAD PATERNA EN EL SEX RATIO EN FECUNDACIÓN IN VITRO.

**C. Cordero Rosales, S. Cortés Gallego, C. Andrés Santé, R. Pandolfi, M. Saladino, C. Rodríguez Roque, A. Almoyna Matix**  
Clínica Tambre - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

Existe evidencia científica de que el sex ratio depende de dos factores, de la proporción de cigotos de cada sexo y del estrés materno, siendo este el responsable de la mayor pérdida de los fetos varones.

Entre los estudios encontrados existe controversia entre los efectos la utilización de las técnicas de ICSI y cultivo embrionario, sugiriendo un posible efecto de la concentración de oxígeno empleada durante el cultivo embrionario sobre el sex ratio, debido a una mayor sensibilidad de los embriones femeninos al efecto negativo de los radicales libres de oxígeno (ROS) y una mayor velocidad de desarrollo de los embriones masculinos.

Muchos investigadores están de acuerdo en que la calidad espermática disminuye con el aumento de la edad paterna, pudiendo influir directamente en la tasa de llegada de los embriones a blastocisto y a la tasa de embarazo. Sin embargo, no hay evidencias científicas que sugieran que la edad paterna per sé afecte al sex ratio de parejas que han sido sometidas a tratamientos de reproducción asistida.

### OBJETIVO:

El objetivo del presente estudio es la evaluación del posible efecto de la edad paterna sobre el sex ratio de los niños nacidos por fecundación in vitro.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Este es un estudio retrospectivo que analiza la distribución del sex-ratio en 283 nacimientos procedentes de tratamientos de reproducción asistida: FIV e ICSI con cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto, tanto en ovocitos propios como en ovocitos de donante desde enero hasta noviembre de 2017.

La edad de distribución de una curva normalizada se verificó con una media del test Kolmogorov-Smirnov con una desviación de la media de 0.01 debido al tamaño de la muestra.

La comparación de las medias de edad materna y paterna con el sexo de los recién nacidos fue analizado usando una T de Student's y la comparación de porcentajes en variables dicotómicas se hizo usando el test de Chi cuadrado. En ambos casos se utilizó un nivel de significancia de 0.05.

### RESULTADOS:

No se encontraron diferencias significativas en la edad paterna con respecto a los niños y niñas, con medias de edad de 41.2 (95%CI: 39.94-42.46) y 40.53 (95% CI: 39.29-41.77) respectivamente (p: 0.458).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la edad de embarazo de las mujeres (40.62 vs 41.10 años, p:0.397) ni en el porcentaje de niñas encontrado de acuerdo con el origen de los ovocitos (46.7% con ovocitos propios vs 49.2% con ovodonación, p:0.759) ni con el tipo de embarazo (52.4% embarazo único vs 41.5% embarazo doble p: 0.084).

Por medias de la regresión logística binaria podemos afirmar que el sexo de los recién nacidos no está relacionado con la edad paterna (Wald test:0.554 p: 457) y que esto solo explica el 0.26 % de la variabilidad de sexo. (Rsquare of Nagelkerke).

EL modelo de regresión logística binaria multivariable ofrece resultados similares sin significancia estadística para ninguna de las covariables (p: 0.227 para la edad del padre, 0.467 para la edad de gestación de la mujer, 0.555 para el origen de los ovocitos y 0.099 para el tipo de gestación).

### CONCLUSIONES:

El sex ratio generado tras tratamientos de reproducción asistida, tanto en ovocitos propios como en ovocitos de donante, no se ve afectado por la edad paterna.

Aunque el sex ratio de los nacimientos producidos por técnicas de reproducción asistida no estaba afectados por el aumento de la edad paterna, la influenciad e la edad paterna en el desarrollo obstétrico de los recién nacidos no ha sido estudiada.

## EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA AROMATASA EN CICLOS DE ESTIMULACIÓN DE LA OVULACIÓN EN UN PROGRAMA DE CRIOPRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD FEMENINA

**N. Morales Rincón (1), N. Sarasquete Martínez (1), A. Clavero Gilabert (1), E. Fernández Sierra (1), MJ. Lupiáñez Giner (1), A. Muñoz Oyonarte (1), N. Molina Morales (2), A. Romo Bermúdez (1), CJ. Rodríguez Izquierdo (1), P. Navas Bastida (3)**

(1) Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs. - Granada (Granada), (2) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada - Granada (Granada), (3) CEIFER biobanco-NextClinics - Córdoba (Córdoba)

### INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, el aumento de las tasas de supervivencia de las mujeres con cáncer de mama estrógeno-dependiente requiere la adaptación de los programas de criopreservación de la fertilidad femenina, de forma que sean seguros también para estas pacientes. El principal riesgo al que se exponen dichas mujeres al someterse a los tratamientos de estimulación de la ovulación de los programas de criopreservación de la fertilidad, está relacionado con la elevación de las concentraciones de estradiol sérico que se produce, ya que puede dar lugar a un mayor crecimiento de las células tumorales cuando éstas son estrógeno-dependientes. Para el aumento del estradiol sérico es necesaria la participación de la enzima aromatasa, que utiliza los andrógenos para sintetizar dicho estradiol. Por tanto, la forma de reducir el aumento de estrógenos en los tratamientos de estimulación ovárica podría ser mediante la inhibición de la aromatasa.

### OBJETIVO:

El principal objetivo de este trabajo es determinar el efecto de los inhibidores de la aromatasa sobre el número y la calidad de los ovocitos obtenidos tras la estimulación de la ovulación en mujeres de un programa de criopreservación de la fertilidad.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realiza un estudio observacional de cohortes retrospectivo, con una muestra de 112 mujeres con edades entre 18 y 40 años que, por diversas patologías y/o tratamientos, verán afectada su capacidad reproductiva. Estas mujeres fueron incluidas en un programa de criopreservación de la fertilidad femenina entre 2009 y 2020. Así pues, en nuestro estudio se compara un grupo de 59 mujeres que recibieron inhibidor de la aromatasa (Letrozole) en el protocolo de estimulación de la ovulación frente a otro grupo de 53 mujeres que no lo recibieron.

### RESULTADOS:

Los resultados que hemos obtenido tras la comparación de múltiples variables (de estimulación ovárica, de laboratorio y de calidad ovocitaria principalmente) indican que no hay diferencias significativas entre ambos grupos en el porcentaje de ciclos cancelados (sin Letrozole 9,4% vs. con Letrozole 6,8%;  $p=0,61$ ), tampoco en el número de días de estimulación (sin Letrozole  $11,6 \pm 1,9$  días vs. con Letrozole  $11,0 \pm 2,1$  días;  $p=0,15$ ), ni en la cantidad de ovocitos obtenidos (sin Letrozole vs. con Letrozole:  $10 \pm 8,9$  vs.  $10 \pm 6,4$ ;  $p=1$ ), número de ovocitos maduros ( $8,3 \pm 7,2$  vs.  $8 \pm 5,1$ ;  $p=0,8$ ), tasa de ovocitos maduros ( $84,4\% \pm 17$  vs.  $82,4 \pm 19,6$ ;  $p=0,6$ ), número de ovocitos vitrificados ( $8,3 \pm 7,2$  vs.  $7,4 \pm 5,2$ ;  $p=0,46$ )] y calidad ovocitaria (porcentaje de dimorfismos en ovocitos maduros: sin Letrozole 15,8% vs. con Letrozole 12%;  $p=0,11$ ).

Pero, por otro lado, la concentración de estradiol sérico ( $2129,1 \pm 1296,7$  pg/mL vs.  $576,5 \pm 454,0$  pg/mL;  $p < 0,001$ ) y la dosis de FSH por nº de ovocitos obtenidos ( $574,9 \pm 796,6$  UI vs.  $307,8 \pm 318,7$  UI;  $p < 0,05$ ) sí resultaron ser significativamente menores al administrar Letrozole.

### CONCLUSIONES:

El Letrozole aumenta la sensibilidad folicular a la FSH en la estimulación de la ovulación, sin alterar el número y calidad de los ovocitos obtenidos. Por tanto, la conclusión tras este estudio es que incluir Letrozole en los protocolos de criopreservación de la fertilidad femenina en mujeres con cáncer de mama estrógeno-dependientes permite aumentar la seguridad de dichos tratamientos en estas mujeres al reducir la concentración sérica media de estradiol.

## ¿SE PUEDEN OPTIMIZAR LOS CICLOS DE OVODONACIÓN PARA REDUCIR EL NUMERO DE EMBRIONES SOBRANTES?

L. Medrano López-Tello, Y. Galiana Briones, A. García Sifre, A. Bosch Villegas, J. Aizpurua  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

La reproducción asistida ha avanzado substancialmente desde el nacimiento del primer bebe hace más de 30 años. En los últimos años debido a la evolución en los tratamientos de ovodonación, los bancos de las clínicas se están llenando de embriones sobrantes sin un destino reproductivo claro. Es por ello que optimizar el número de ovocitos donados a cada paciente para obtener una tasa de éxito acumulada elevada es un fin al que se debería tender para optimizar los recursos y disminuir la acumulación de embriones sobrantes.

### OBJETIVO:

Calcular el número medio de ovocitos y de blastocistos necesarios en ovodonación con PGT-A y sin PGT-A para obtener la tasa acumulada máxima de gestación en aquellos pacientes que quedan gestantes tras un ciclo de ovodonación.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo (entre 2019-2020) llevado a cabo en 296 pacientes que consiguieron al menos un embarazo durante 1 ciclo de reproducción asistida con y sin PGT-A (PGT-A=185 y no PGT-A= 111). En todos los casos la fecundación se llevó a cabo mediante ICSI, y los embriones fueron cultivados en medio único (CSC-Continuous Single Culture Complete with HSA, FUJIFILM Irvine Scientific) en incubador benchtop hasta día 5-6 de desarrollo. Todos los embriones se vitrificaron y desvitrificaron usando los medios Vit Kit-Freeze y Vit Kit-Thaw (FUJIFILM Irvine Scientific) respectivamente. De cada ciclo se obtuvo la tasa de implantación (semana 12 de embarazo), el número de blastocistos útiles necesarios para conseguir al menos una gestación y el número necesario de ovocitos MII para conseguir dichos blastocistos.

### RESULTADOS:

En los ciclos de ovodonación en los que se había conseguido al menos una gestación en el primer ciclo, se obtuvo una tasa de implantación que era significativamente mayor ( $P= 0,012$ ) con PGT-A  $88,74\% \pm 1,95$  que sin PGT-A  $80,33\% \pm 2,68$ . En cuanto a la tasa de blastocistos necesarios para conseguir al menos 1 saco, el número de embriones fue significativamente menor ( $p=0,045$ ) en ovodonación con PGT-A  $1,29 \pm 0,45$  que sin PGT-A  $1,44 \pm 0,05$ . Por último, en cuanto al número necesario de ovocitos para conseguir un blastocisto con fin reproductivo, no se encontraron diferencias significativas ( $P=0,96$ ) entre los ciclos con PGT-A ( $4,27 \pm 0,22$ ) y sin PGT-A ( $4,25 \pm 0,25$ ).

### CONCLUSIONES:

Según los resultados obtenidos, se necesitaría una media de 5 ovocitos en ciclos de ovodonación, independientemente de si se realiza o no PGT-A. En el caso de blastocistos analizados con PGT-A, el número de embriones necesarios para conseguir un embarazo es menor; esto puede deberse a la selección de embriones euploides que se lleva a cabo. El hecho de tener el PGT-A hecho en ciclos de ovodonación, también conlleva una tasa de implantación por embrión transferido mayor, con lo cual se alcanza la gestación con un menor número de transferencias. Los datos analizados muestran como en aquellos casos de ovodonación donde la paciente tiene la capacidad de quedarse embarazada, el número de ovocitos a asignar es bajo, por lo si se optimizara la asignación de ovocitos a este valor, nos permitiría reducir el número de embriones sobrantes y los consecuentes problemas éticos y de almacenaje.

## MACHINE LEARNING TO PREDICT BLASTOCYST FORMATION: THE DEVELOPMENT OF AN IN-HOUSE ALGORITHM

**M. Méndez Justo (1), C. González Trigo (2), C. López Gallardo (2), A. Piñol Bonet (2), F. Oliva Cuyas (3), S. Cívico Vallejos (1)**

(1) Hospital Clínic de Barcelona - Barcelona (Barcelona), (2) Universidad de Barcelona - Barcelona (Barcelona), (3) Departamento de Genética y Microbiología y Estadística, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCTION:

The introduction of time-lapse technology in the IVF laboratory has led to the study of human embryo kinetics as a potential non-invasive tool for embryo selection. However, controversy still exists regarding whether these amounts of data imply further predictive power given the great range of confounding factors reported in the literature. Here we present the process of modelling an in-house machine learning model to predict blastocyst formation and its proper validation.

### OBJECTIVE:

Assess whether kinetics from embryos with the competence to properly reach the blastocyst stage (meet morphology to be transferred or frozen) differ from those that failed to reach this stage.

Moreover, we present the evolution/steps to develop an in-house algorithm from a machine learning perspective, adjusting for the most widely reported confounding factors.

### MATERIAL AND METHOD:

A total of 181 embryos from donation cycles were included to model the algorithm. Kinetic parameters annotated by a single observer included in the study were time of extrusion of the second polar body (tPB2), time of appearance and disappearance of pronuclei (tPNa, tPNf), and time of cell divisions (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8) and its differences between them. Furthermore, categorization using conditional inference trees of kinetic variables were also applied due to the asymmetry of the variables. A selection among all the possible kinetic variables to include in the model was performed with principal component analysis (PCA). Different machine learning methods (logistic regression, random forest, boosting and support vector machine (SVM) were trained and assessed using leave-one-out cross-validation (LOOCV), 5-fold cross-validation and resubstitution).

Second, the robustness of the algorithm was tested with a new embryo cohort with same clinical features, but in this case with cycles using own oocytes. Third, the algorithm was re-tested in distinct cohorts of embryos from different patient ages and cause of sterility to evaluate its overall performance.

Statistical analyses were performed with R software v4.0.1.

### RESULT:

A total of 55 kinetic variables were first included in the study. When comparing variances, means and medians between the viable (V) and non-viable embryos (NV) groups, a lot of the variables showed significant differences, suggesting the complexity of the present data. Cut-off points for the categorization using conditional inference trees were performed. Moreover, a selection of 20 variables out of 55 was done by PCA. From predictive modelling, the higher accuracy rates correspond to the SVM models with specific kernels. Concrete variable sub-groups presented a robust percentage of correct classification for example SVM with radial kernel using 9 quantitative and 5 categorical variables with an AUC of 0.86 (0.81-0.92) in donation cycles. This algorithm performed well in cycles with own oocytes with <35 years with a percentage of correct classification of 0.745.

### CONCLUSIONS:

A methodology for the establishment and evaluation of human embryo kinetic parameters, reaching proper cut off for variable categorization is settled down. The application of predictive machine learning techniques shows promising results in embryo selection.

## ¿HAY QUE TRANSFERIR EN FRESCO LOS EMBRIONES QUE ALCANZAN EL ESTADIO DE BLASTOCISTO EN D+6 O ES MEJOR VITRIFICARLOS Y TRANSFERIRLOS EN UN CICLO DIFERIDO CUANDO SON LOS ÚNICOS APTOS PARA TRANSFERENCIA?

P. Belchin Fernández (1), Y. Cabello Vives (2), M. Sánchez de Burgos (1), E. Izquierdo Trechera (1), A. García Enguídanos (1), E. López Gallego (1), D. Ordóñez Pérez (1)

(1) Hospital Ruber Juan Bravo Quironsalud - Madrid (Madrid), (2) Overture Life - Alcobendas (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

La transferencia de blastocistos en las técnicas de reproducción asistida supone ventajas como la selección de embrión único, simula el proceso natural de implantación y permite la autoselección del embrión tras la activación del genoma embrionario en el día 3. Sin embargo, no está claro si los blastocistos de día 6 tienen tasas de embarazo similares a las del día 5 independientemente del día de fase lútea en que se encuentra el endometrio.

### OBJETIVO:

Evaluar si los blastocistos de D+6, tanto frescos como vitrificados procedentes de ovocitos propios, tienen tasas similares de embarazo a los de D+5 teniendo en cuenta el día de preparación endometrial, con embriones de calidades equiparables (A ó B) y de pacientes con edad media de 37,8 años, de manera que se puedan establecer estrategias clínicas y asesoramiento en cuanto a la transferencia embrionaria a los pacientes de nuestra unidad para conseguir unos resultados óptimos en cada caso.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se han revisado las transferencias en fresco y de criopreservados de embrión único realizadas entre los años 2018 y 2020. Se realizaron un total de 135 transferencias en fresco de blastocistos: 12 de D+6 y 123 de D+5 y 91 criotransferencias: 78 en D+5 y 13 con embriones de D+6, pero realizadas en su quinto día de progesterona en ciclo sustitutivo de preparación endometrial.

Se realizó un test  $\chi^2$  para comparar las tasas de embarazo bioquímico y clínico tras la transferencia embrionaria en fresco o vitrificado. No se ha evaluado la tasa de nacidos vivos o aborto, ya que se desconocen aún todos los resultados del año 2020.

### RESULTADOS:

De las 12 transferencias en fresco realizadas en D+6, se obtuvo una tasa de embarazo bioquímico del 25% (3/12) y clínico del

16,6% (2/12). En D+5 las tasas fueron del 61,7% (76/123) y del 54,5% (67/123) respectivamente. Comparando ambos grupos, existen diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de embarazo bioquímico ( $p=0,013$ ) y las tasas de embarazo clínico ( $p=0,012$ ) entre las transferencias realizadas en D+5 y D+6.

En las criotransferencias (CT) de blastocistos vitrificados en D+6 y transferidos en D+5 del ciclo diferido, se obtuvo una beta positiva en el 46,1% de los casos (6/13) y embarazo clínico del 30,7% (4/13). En las CT de blastocistos de D+5 la tasa de embarazo bioquímico fue 53,8% (42/78) y la de clínico de 43,7% (38/78).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambas tasas de embarazo ( $p=0,61$  y  $p=0,23$  respectivamente) entre embriones criopreservados en D+5 vs D+6 pero transferidos tras 5 días de fase lútea.

### CONCLUSIONES:

Las transferencias en fresco con embriones de D+6 tienen menor potencial de implantación frente a las transferencias que se realizan en D+5, probablemente porque la ventana de implantación se vea desplazada.

Sin embargo, no hay diferencias entre embriones de D+5 ó D+6 de desarrollo si estos se transfieren en un ciclo diferido en el que el endometrio se encuentra en D+5 de fase lútea, siempre que los embriones sean de buena calidad a la hora de vitrificarlos (blastocistos A ó B).

A pesar de tener pocos casos en los que todos los embriones transferibles han alcanzado el estadio de blastocisto en D+6 y no tener ninguno en D+5 a partir de la misma cohorte de ovocitos, deberíamos tomar en consideración la estrategia de vitrificar estos embriones desarrollados tardíamente y transferirlos en un ciclo diferido y por supuesto, elegir siempre para transferir blastocistos de D+5 si los hubiera.



## MACHINE LEARNING MORFOCINÉTICO: MODELO MULTIALGORÍTMICO PARA LA PREDICCIÓN DE “NACIDOS VIVOS SANOS” VS “ANEUPLOIDES”

E. Güell Penas, A. Vives Perelló, J. Ruiz Romero, M. Mladenova Koleva, RM. Ibarz Serrat, M. López Rodríguez, JM. Ibarz Batet.

Conceptum - Reus (Tarragona)

### INTRODUCCIÓN:

La implementación de la inteligencia artificial (AI) en tecnología time-lapse (TLT) ha avanzado hacia la automatización de imágenes/vídeos, pero los modelos conseguidos aún quedan lejos de establecer la AI morfocinética como gold standard para la selección embrionaria. No hay publicaciones sobre morfocinética que contemplen la aplicación simultánea de distintos algoritmos de Machine Learning (ML) con datos en D+3 para clasificar los embriones en “Nacido Vivo Sano” o “Aneuploide”.

### OBJETIVO:

Comprobar si la tecnología de ML puede, a partir de variables numéricas, confeccionar un modelo predictivo multialgorítmico que optimice el Scoring Embrionario y la toma de decisiones en D+3 de cultivo.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo con n=186 embriones procedentes de 85 ciclos FIV-ICSI (72 pacientes, 2014-2019). Se incluyeron los embriones que dieron lugar a nacidos vivos sanos (NVS) con información conocida de nacido ( $n^{\circ}$ nacidos =  $n^{\circ}$ embriones transferidos) y los embriones con diagnóstico Aneuploide tras PGT-A (D+3). Todos fueron cultivados en incubador convencional (37°C, 6%CO<sub>2</sub>) con TLT (Primo Vision). Se anotaron manualmente los parámetros morfocinéticos tPnf, t2, t3, t4, t5, t8 y los tiempos de desaparición de núcleo a estadio de 2 y 4 células (tNfCc2a, tNfCc3a). Se excluyeron 19 embriones con algún marcador sin informar y/o con fenómenos morfodinámicos detectados hasta h=69 hpi (DC, TTM, CF). Estos biomarcadores morfocinéticos dieron lugar a 52 variables, siendo 17 las seleccionadas para la confección (RStudio) de 6 algoritmos predictivos ML (3x GBM, 1x rF, 1x XGB, 1x kNN). La priorización de variables se realizó mediante la comparación de medias entre grupos de la variable respuesta RESULTADO (NVS vs Aneuploide), vía t-Student o U de Mann-Whitney según la distribución de cada variable,  $p < 0,05$ ; PCA y matriz de correlación (descartando variables con alto grado de correlación por la reducida aportación que pudieran acarrear). Se realizó la V-fold Cross-Validation (V-fold CV) para la obtención

de las métricas de referencia (Positive Class = Aneuploide, AUC, Accuracy, F1-Score, Precision o PPV, Recall o Sensitivity, TP, TN, FP, FN, Specificity, NPV, CI 95%). Se ensamblaron los algoritmos mediante la media ponderada del resultado predicho (Aneuploide=1, NVS=0) según el valor predictivo del nivel predicho en la respectiva V-fold CV. Se realizó LOOCV (Leave-One-Out Cross-Validation) para validar el modelo final considerando las mismas métricas de referencia. Los embriones con predicciones contradictorias entre algoritmos fueron cuantificados, clasificados como “Sin Pronóstico” y considerados por separado.

### RESULTADOS:

AUC de los algoritmos individualmente: GBM#1 y GBM#2 (0,75); rF (0,74); XGB, kNN y GBM#3 (0,73). El modelo definitivo ensamblado consiguió predecir el 76,4% de los embriones (126/167) con los siguientes resultados: AUC=0,829 (0,758-0,899); Accuracy=80,2% (72,1-86,7); F1-score=80,6%; Precision=72,2%; Recall=91,2%; Specificity = 71,0%; NPV = 90,7%. TP = 52, FP = 20, FN = 5, TN = 49.

Los embriones “Sin Pronóstico” representaron el 24,6% del total (41/167), Accuracy=52,6%, F1-score=35,7%, Precision=62,5%, Recall=25%

### CONCLUSIONES:

Hemos conseguido conformar un modelo predictivo inédito por las variables morfocinéticas incluidas, la variable respuesta estudiada (NVS vs Aneuploide) y la finalización en D+3 de desarrollo, que permite identificar correctamente a la mayoría de embriones estudiados con una AUC superior a 0,82. Sin embargo, el modelo ha sido incapaz de pronosticar al 24,6% de los embriones. Sería conveniente realizar un seguimiento sobre la tasa de implantación en caso de priorizar la transferencia de embriones con perfil NVS. Cabría puntualizar que el modelo podría estar detectando perfiles morfocinéticos contrarios a NVS sin que eso implicase que el embrión sea totalmente aneuploide: Por una parte, FP y FN podrían ser mosaicos, pero el PGT-A en D+3 limitaría este diagnóstico (NVS y Aneuploide no serían niveles excluyentes); por otra parte, un perfil morfocinético clasificado como NO-NVS podría deberse a otras razones relacionadas con la competencia embrionaria sin alteraciones cromosómicas.

## TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (PGT) DE ENFERMEDADES POR ALTERACIÓN DE LA IMPRONTA GENÉTICA: SÍNDROMES DE KAGAMI-OGATA Y DE TEMPLE.

**E. Toro Toro (1), E. García-Guixé (1), A. Gómez Duro (2), L. Marquès Soler (3), J. Sabrià Bach (4), C. Giménez Sevilla (1)**

(1) Reprogenetics Spain - Barcelona (Barcelona), (2) - Madrid (Madrid), (3) CRA Barcelona - Barcelona (Barcelona), (4) BCNatal, Barcelona Center for Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, Hospital Sant Joan de Déu y Hospital Clinic - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La impronta genética favorece la expresión de un alelo sobre el otro, para un determinado loci, en función de su origen parental. Las enfermedades por alteración de la impronta generalmente se producen por disomía uniparental, defectos de impronta o presencia de microdeleciones que afectan a genes improntados.

Los síndromes de Kagami-Ogata (KOS14) y de Temple (TS14) son dos trastornos asociados con alteraciones recíprocas dentro del dominio improntado chr14q32 que incluye genes tanto de expresión paterna como materna.

Presentamos un caso en el que la probando fue diagnosticada de KOS14 a causa de una microdeleción de 108kb en el cromosoma 14 (14q32:g.101190852\_101299552del), heredada por vía materna. La madre del caso índice presentaba TS14, compatible con el hecho de haber heredado la microdeleción por vía paterna. Se solicitó la realización de un test genético preimplantacional para descartar la enfermedad en la descendencia.

### OBJETIVO:

Establecer una estrategia diagnóstica que permita la realización de un Test Genético Preimplantacional (PGT) en un caso de enfermedad por alteración de la impronta genética.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Previo a la realización del ciclo de PGT-M se realizó un estudio pre-test mediante un genotipado de SNPs (Illumina Infinium Human Karyomap kit) según el protocolo indicado por la casa comercial para confirmar la presencia de SNPs informativos colindantes a la región delecionada (2Mb). El análisis de los datos se realizó mediante el software BlueFuse Multi de Illumina. Para la realización de este estudio se emplearon muestras de ADN de ambos miembros de la pareja y del caso índice, que se utilizó como referencia para establecer el haplotipo de riesgo mediante comparativa familiar.

Posteriormente, se procedió con el ciclo de fecundación in vitro (FIV) y PGT-M. Se realizó biopsia de trofoectodermo mediante láser y posterior amplificación mediante "Multiple Displacement Amplification" MDA (Repli-G Single Cell Kit, Qiagen) según el protocolo indicado por la casa comercial. Se realizó Karyomapping en las muestras embrionarias para determinar el haplotipo de riesgo asociado a la anomalía cromosómica. El genotipado de SNPs permite también detectar gran parte de las anomalías cromosómicas embrionarias. Los embriones no afectados para la enfermedad hereditaria y en los que no se observaron anomalías cromosómicas tras el análisis con Karyomapping, fueron analizados mediante técnicas de secuenciación masiva para el estudio de la euploidía. El análisis de los resultados se realizó mediante el software BlueFuse Multi de Illumina.

### RESULTADOS:

En el estudio pre-test, se evaluaron un total de 614 SNPs mediante Karyomapping. Los resultados obtenidos objetivaron la presencia de 69 SNPs informativos maternos (ninguno en la región delecionada, 37 en la región flanqueante "upstream" y 32 en la "downstream") y 143 SNPs informativos paternos (5 en la región de interés, 78 en la región flanqueante "upstream" y 60 en la "downstream").

Se realizaron tres ciclos de estimulación ovárica e ICSI en una mujer de 37 años, obteniéndose un total de 10 embriones. Cuatro embriones fueron diagnosticados como afectados, dos como afectados y aneuploides, tres como no afectados y aneuploides y un solo embrión como no afecto y euploide. Su transferencia resultó en un embarazo a término con el nacimiento de un niño sano. La ausencia de la microdeleción se confirmó en un estudio post-natal.

### CONCLUSIONES:

Este trabajo pudo identificar una microdeleción responsable de KOS14 y TS14 en una familia en la que los portadores tienen un riesgo del 50% de transmitir la deleción a su descendencia. El genotipado de SNPs mediante la técnica de Karyomapping ha demostrado que el PGT-M puede ofrecerse con éxito a parejas con enfermedades de impronta causadas por anomalías genéticas.

**EM. García Hernández, B. Lledó Bosch, R. Morales Sabater, JA. Ortiz Salcedo, A. Turienzo Díez, F. Lozano García, A. Fabregat Reolid, J. Llácer Aparicio, R. Bernabéu García**  
Instituto Bernabeu - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

En un 50% de los casos, la infertilidad se debe a un problema de factor masculino. Aunque las causas que pueden generar estos problemas en el varón son realmente heterogéneas, las causas genéticas constituyen aproximadamente el 30% de los casos. Algunos fenotipos de infertilidad en los varones se han asociado con anomalías genéticas específicas como las cromosómicas, microdeleciones del cromosoma Y o mutaciones en el gen CFTR. Sin embargo, según la literatura, este tipo de estudios genéticos sólo justifican un 4% de las causas genéticas probables. Por tanto, estos datos indican que las herramientas para el diagnóstico de infertilidad masculina son limitadas. Abordar el estudio de los genes implicados en el proceso de gametogénesis es un proceso complejo, ya que son muchos los genes que participan en el proceso. Gracias a la aparición de la técnica de secuenciación masiva (NGS), el número de genes a estudiar en pacientes con infertilidad idiopática, aumenta considerablemente ya que nos permite secuenciar un número elevado de genes.

### OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo fue elaborar un panel de genes que nos ayude a diagnosticar la infertilidad masculina de origen idiopático.

### MATERIAL Y MÉTODO:

El panel desarrollado evalúa los principales genes implicados en el proceso de espermatogénesis, concretamente consta de 426 genes. Se han incluido en el estudio 10 pacientes de nuestra clínica con parámetros seminales alterados severos en los que se ha descartado las causas genéticas conocidas. Se realizó una extracción de ADN genómico a partir de sangre-EDTA de los pacientes empleando el kit comercial MagMax DNA MultiSample Ultra y el extractor automático King-Fisher (ThermoFisher®). La

secuenciación del panel para la identificación de variantes genéticas se realizó utilizando la tecnología Nextera Enrichment (Illumina®). Los datos de FASTAQ se procesaron mediante algoritmos BWA y GATK. Los archivos VCF se analizaron utilizando el software Variant Interpreter.

### RESULTADOS:

Tras el análisis de los datos, se observó que tres, de los diez pacientes evaluados, eran portadores de mutaciones en algunos de los genes incluidos en el panel. En el primer paciente, se identificaron las mutaciones c.298G>A y c.10781delT en el gen DNAH1. Se trata de una mutación missense, que produce un cambio aminoacídico en la proteína Asp100Asn, y otra mutación que produce un cambio en el marco de lectura (frameshift) Leu3594ProfsTer26. En el segundo paciente se identificaron las mutaciones c.3877G>A en el gen DNAH1 y la mutación c.3665G>A en el gen PLXNA1, ambas mutaciones fueron mutaciones missense Asp1293Asn y Arg1222Gln, respectivamente. En el último paciente se identificó en el gen PLXNA1 la misma mutación (c.3665G>A) que en el paciente anterior.

### CONCLUSIONES:

Este panel supone un avance en los estudios realizados al varón con parámetros seminales alterados, ya que nos permite estudiar un elevado número de genes implicados en el proceso de espermatogénesis. Este tipo de análisis puede tener una clara aplicación en la práctica clínica con el objetivo de poder elaborar un diagnóstico en varones con infertilidad de origen idiopático y realizar, por lo tanto, un tratamiento personalizado.

## TRANSFERENCIA DE BLASTOCISTOS DÍA 5 VERSUS DÍA 6

**P. del Campo Peña.**

GINEMED Madrid Pardo de Aravaca - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

Desde la aparición de los incubadores time-lapse y el uso del medio único la tasa de llegada a blastocisto en los laboratorios de reproducción es cada vez mayor. La llegada a blastocisto de los embriones en día 5 o 6 nos genera la duda de cómo seleccionarlos a la hora de transferir.

### OBJETIVO:

Realizar diferentes comparaciones de los resultados obtenidos tras transferir embriones de día 5 y día 6 tanto en fresco como en vitrificado.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio de cohorte retrospectivo realizado en nuestro centro de los resultados obtenidos al transferir embriones procedentes de óvulos propios y óvulos de donante en día 5 y día 6 tanto en fresco como en vitrificado. El estudio abarca desde enero de 2018 hasta diciembre de 2019.

### RESULTADOS:

Transferencia en fresco de embriones procedentes de óvulos propios. Se obtiene una tasa de implantación significativamente superior cuando la transferencia se realiza en día 5 en comparación con el día 6 [139/240 (57.9%) versus 6/18 (33.3%);  $p < 0.05$ ].

Transferencia de embriones vitrificados procedente de óvulos propios. La tasa de gestación clínica aumentó significativamente en el grupo día 5 en comparación con el grupo día 6 [373/832 (44.8%) versus 52/180 (28.9%);  $p < 0.05$ ].

Transferencia de embriones vitrificados procedente de óvulos de donante. La tasa de gestación clínica aumentó significativamente en el grupo día 5 en comparación con el grupo día 6 [127/277 (45.8%) versus 25/76 (32.9%);  $p < 0.05$ ].

Transferencia de embriones vitrificados de buena calidad procedente de óvulos propios. Se obtiene una tasa de implantación significativamente superior cuando la transferencia se realiza en día 5 en comparación con el día 6 con embriones de buena calidad [400/620 (64.5%) versus 43/86 (50%);  $p < 0.05$ ].

Transferencia de embriones vitrificados de buena calidad procedente de óvulos de donante. Se obtiene una tasa de implantación superior cuando la transferencia se realiza en día 5 en comparación con el día 6 [149/242 (61.6%) versus 23/42 (54.8%);  $p > 0.05$ ], pero la diferencia no es estadísticamente significativa.

Transferencia de embriones de peor calidad vitrificados en día 5 y embriones de mejor calidad en día 6 (óvulos propios). La tasa de gestación clínica aumentó en el grupo día 6 en comparación con el grupo día 5 [73/212 (34.4%) versus 34/86 (33.7%);  $p > 0.05$ ], pero no es una diferencia estadísticamente significativa.

Transferencia de embriones de peor calidad vitrificados en día 5 y embriones de mejor calidad en día 6 (óvulos de donante). La tasa de gestación clínica aumentó en el grupo día 6 en comparación con el grupo día 5 [24/73 (32.9%) versus 15/38 (39.5%);  $p > 0.05$ ], pero no es una diferencia estadísticamente significativa.

### CONCLUSIONES:

Criopreservar los embriones que alcancen el estado de blastocisto en día 6 en lugar de realizar la transferencia en fresco para evitar asincronía endometrial.

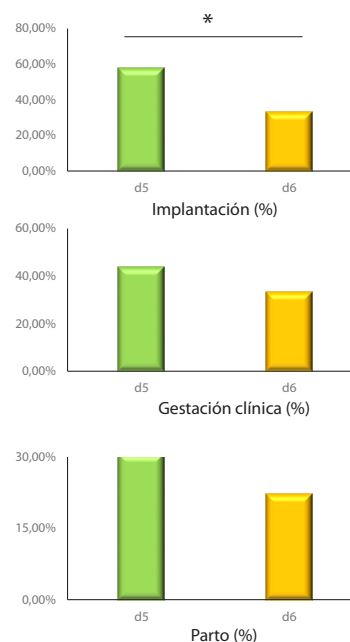
En aquellos ciclos de transferencias con embriones de buena calidad vitrificados en día 5 y día 6 transferir primero los embriones de día 5.

En aquellos ciclos de transferencias con embriones vitrificados en día 5 con peor calidad y embriones de mejor calidad en día 6 es cuando se podrían transferir primero los embriones de mejor calidad del día 6.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

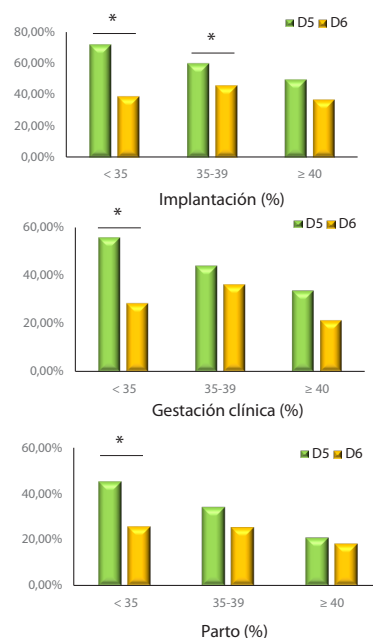
Transferencia en fresco de embriones procedentes de óvulos propios.

	Día 5 SET	Día 6 SET	p-valor
Transferencias	240	18	-
<35	52	2	-
35-39	116	8	-
≥ 40	72	8	-
Implantación, n (%)	139/240 (57.9%)	6/18 (33.3%)	0.043
<35	39/52 (75.0%)	2/2 (100.0%)	0.417
35-39	66/116 (56.9%)	2/8 (25.0%)	0.080
≥ 40	34/72 (47.2%)	2/8 (25.0%)	0.231
Gestación clínica, n (%)	105/240 (43.8%)	6/18 (33.3%)	0.389
<35	30/52 (57.7%)	2/2 (100.0%)	0.232
35-39	51/116 (44.0%)	2/8 (25.0%)	0.294
≥ 40	24/72 (33.3%)	2/8 (25.0%)	0.633
Parto, n (%)	74/240 (30.8%)	4/18 (22.2%)	0.443
<35	25/52 (48.1%)	1/2 (50.0%)	0.957
35-39	33/116 (28.4%)	1/8 (12.5%)	0.328
≥ 40	16/72 (22.2%)	1/8 (12.5%)	0.860
Aborto, n (%)	30/240 (12.5%)	2/18 (11.1%)	0.863
<35	5/52 (9.6%)	1/2 (50.0%)	0.242
35-39	17/116 (14.7%)	1/8 (12.5%)	0.867
≥ 40	8/72 (11.1%)	0/8 (50.0%)	0.320



Transferencia de embriones vitrificados procedente de óvulos propios.

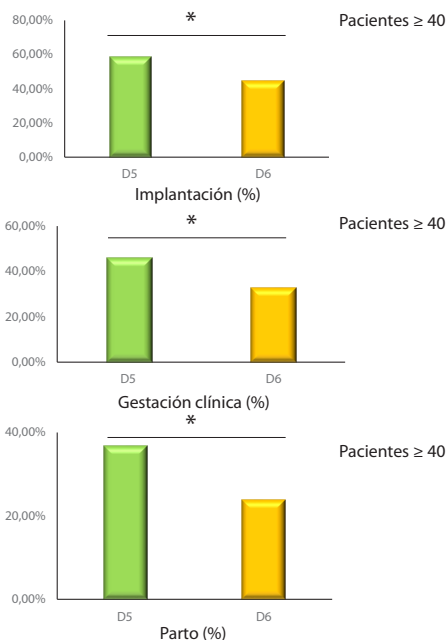
	Día 5 SET	Día 6 SET	p-valor
Transferencias	832	180	-
<35	240	39	-
35-39	376	75	-
≥ 40	216	66	-
Implantación, n (%)	504/832 (60.6%)	73/180 (40.6%)	0.000
<35	172/240 (71.7%)	15/39 (38.5%)	0.000
35-39	225/376 (59.8%)	34/75 (45.3%)	0.020
≥ 40	107/216 (49.5%)	24/66 (36.4%)	0.060
Gestación clínica, n (%)	373/832 (44.8%)	52/180 (28.9%)	0.000
<35	134/240 (55.8%)	11/39 (28.2%)	0.001
35-39	166/376 (44.1%)	27/75 (36.0%)	0.193
≥ 40	73/216 (33.8%)	14/66 (21.2%)	0.053
Parto, n (%)	284/832 (34.1%)	41/180 (22.8%)	0.003
<35	108/240 (45.0%)	10/39 (25.6%)	0.023
35-39	131/376 (34.8%)	19/75 (25.3%)	0.111
≥ 40	45/216 (20.8%)	12/66 (18.2%)	0.639
Aborto, n (%)	90/832 (10.8%)	11/180 (6.1%)	0.056
<35	27/240 (11.3%)	1/39 (2.6%)	0.094
35-39	35/376 (9.3%)	8/75 (10.7%)	0.715
≥ 40	28/216 (13.3%)	2/66 (3.0%)	0.022



# COMUNICACIONES PÓSTERS

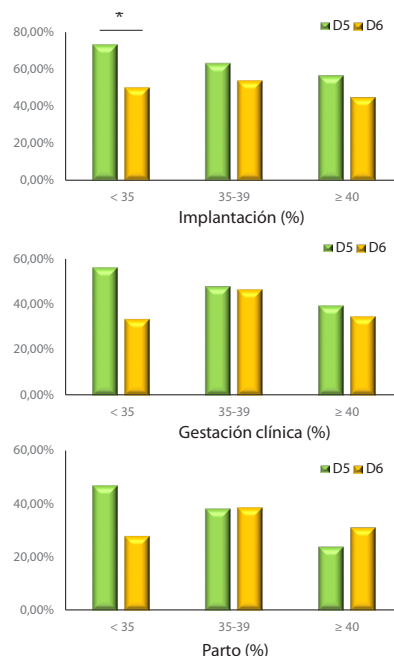
Transferencia de embriones vitrificados procedente de óvulos de donante.

	Día 5 SET	Día 6 SET	p-valor
Transferencias	326	82	-
<35	12	3	-
35-39	37	3	-
≥ 40	277	76	-
Implantación, n (%)	188/326 (57.7%)	39/82 (47.6%)	0.100
<35	7/12 (58.3%)	3/3 (100%)	0.171
35-39	19/37 (51.4%)	2/3 (66.7%)	0.609
≥ 40	162/277 (58.5%)	34/76 (44.7%)	0.033
Gestación clínica, n (%)	148/326 (45.4%)	27/82 (32.9%)	0.041
<35	5/12 (41.7%)	1/3 (33.3%)	0.792
35-39	16/37 (43.2%)	1/3 (33.3%)	0.738
≥ 40	127/277 (45.8%)	25/76 (32.9%)	0.043
Parto, n (%)	115/326 (35.3%)	19/82 (23.2%)	0.037
<35	4/12 (33.3%)	1/3 (33.3%)	1.000
35-39	9/37 (24.3%)	0/3 (0.0%)	0.332
≥ 40	102/277 (36.8%)	18/76 (23.7%)	0.032
Aborto, n (%)	33/326 (10.1%)	8/82 (9.8%)	0.921
<35	1/12 (8.3%)	0/3 (0.0%)	0.605
35-39	7/37 (18.9%)	1/3 (33.3%)	0.548
≥ 40	25/277 (9.0%)	7/76 (9.2%)	0.960



Transferencia de embriones vitrificados de buena calidad procedente de óvulos propios

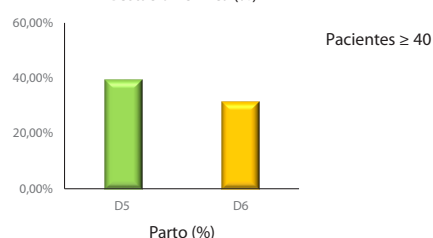
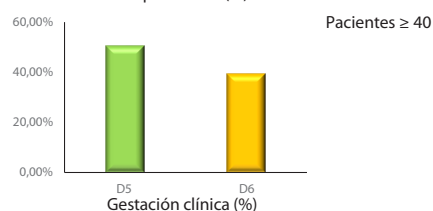
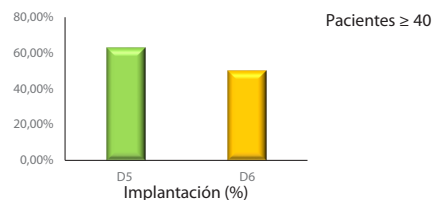
	Día 5 SET	Día 6 SET	p-valor
Transferencias	620	86	-
<35	189	18	-
35-39	284	39	-
≥ 40	147	29	-
Implantación, n (%)	400/620 (64.5%)	43/86 (50.0%)	0.009
<35	138/189 (73.0%)	9/18 (50.0%)	0.040
35-39	179/284 (63.0%)	21/39 (53.8%)	0.268
≥ 40	83/147 (56.5%)	13/29 (44.8%)	0.250
Gestación clínica, n (%)	300/620 (48.4%)	34/86 (39.5%)	0.123
<35	106/189 (56.1%)	6/18 (33.3%)	0.064
35-39	136/284 (47.9%)	18/39 (46.2%)	0.839
≥ 40	58/147 (39.5%)	10/29 (34.5%)	0.615
Parto, n (%)	231/620 (37.3%)	29/86 (33.7%)	0.524
<35	88/189 (46.6%)	5/18 (27.8%)	0.126
35-39	108/284 (38.0%)	15/39 (38.5%)	0.958
≥ 40	35/147 (23.8%)	9/29 (31.0%)	0.412
Aborto, n (%)	70/620 (11.3%)	5/86 (5.8%)	0.122
<35	19/189 (10.1%)	1/18 (5.6%)	0.537
35-39	28/284 (9.9%)	3/39 (7.7%)	0.667
≥ 40	23/147 (15.6%)	1/29 (3.4%)	0.080



# COMUNICACIONES PÓSTERS

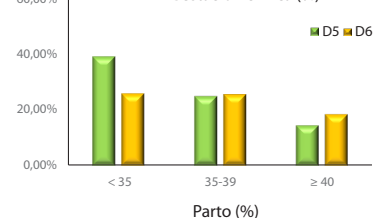
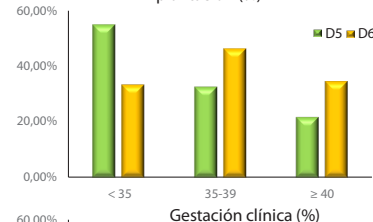
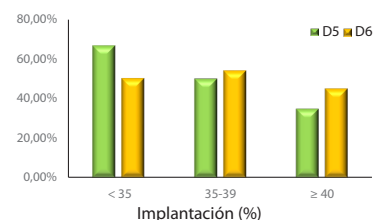
Transfancia de embriones vitrificados de buena calidad procedente de óvulos de donante

	Día 5 SET	Día 6 SET	p-valor
Transferencias	242	42	-
<35	10	2	-
35-39	28	2	-
≥ 40	204	38	-
Implantación, n (%)	149/242 (61.6%)	23/42 (54.8%)	0.405
<35	6/10 (60.0%)	2/2 (100.0%)	0.515
35-39	15/28 (53.6%)	2/2 (100.0%)	0.492
≥ 40	128/204 (62.7%)	19/38 (50.0%)	0.140
Gestación clínica, n (%)	121/242 (50.0%)	16/42 (38.1%)	0.154
<35	4/10 (40.0%)	0/2 (0.0%)	0.515
35-39	14/28 (50.0%)	1/2 (50.0%)	1.000
≥ 40	103/204 (50.5%)	15/38 (39.5%)	0.212
Parto, n (%)	92/242 (38.0%)	12/42 (28.6%)	0.241
<35	4/10 (40.0%)	0/2 (0.0%)	0.273
35-39	8/28 (28.6%)	0/2 (0.0%)	0.377
≥ 40	80/204 (39.2%)	12/38 (31.6%)	0.373
Aborto, n (%)	29/242 (12.0%)	4/42 (9.5%)	0.646
<35	0/10 (0.0%)	0/2 (0.0%)	-
35-39	6/28 (21.4%)	1/2 (50%)	0.418
≥ 40	23/204 (11.3%)	3/38 (7.9%)	0.537



Transfancia de embriones de peor calidad vitrificados en día 5 y embriones de mejor calidad en día 6 (óvulos propios)

	Día 5 SET	Día 6 SET	p-valor
Transferencias	212	86	-
<35	51	18	-
35-39	92	39	-
≥ 40	69	29	-
Implantación, n (%)	104/212 (49.1%)	43/86 (50.0%)	0.883
<35	34/51 (66.7%)	9/18 (50.0%)	0.210
35-39	46/92 (50.0%)	21/39 (53.8%)	0.687
≥ 40	24/69 (34.8%)	13/29 (44.8%)	0.349
Gestación clínica, n (%)	73/212 (34.4%)	34/86 (39.5%)	0.406
<35	28/51 (54.9%)	6/18 (33.3%)	0.116
35-39	30/92 (32.6%)	18/39 (46.2%)	0.141
≥ 40	15/69 (21.7%)	10/29 (34.5%)	0.187
Parto, n (%)	53/212 (25.0%)	29/86 (33.7%)	0.127
<35	20/51 (39.2%)	5/18 (27.8%)	0.385
35-39	23/92 (25.0%)	15/39 (38.5%)	0.121
≥ 40	10/69 (14.5%)	9/29 (31.0%)	0.059
Aborto, n (%)	20/212 (9.4%)	5/86 (5.8%)	0.307
<35	8/51 (15.7%)	1/18 (5.6%)	0.273
35-39	7/92 (7.6%)	3/39 (7.7%)	0.987
≥ 40	5/69 (7.2%)	1/29 (3.4%)	0.474

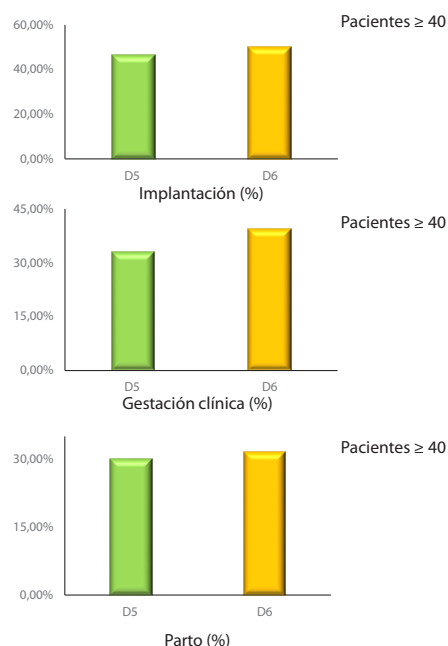


# COMUNICACIONES PÓSTERS

Transferencia de embriones de peor calidad vitrificados en día 5 y embriones de mejor calidad en día 6 (óvulos de donante)

	Día 5 SET	Día 6 SET	p-valor
Transferencias	84	42	-
<35	2	2	-
35-39	9	2	-
≥ 40	73	38	-
Implantación, n (%)	39/84 (46.4%)	23/42 (54.8%)	0.378
<35	1/2 (50.0%)	2/2 (100.0%)	0.248
35-39	4/9 (44.4%)	2/2 (100.0%)	0.154
≥ 40	34/73 (46.6%)	19/38 (50.0%)	0.732
Gestación clínica, n (%)	27/84 (32.1%)	16/42 (38.1%)	0.506
<35	1/2 (50.0%)	0/2 (0.0%)	0.248
35-39	2/9 (22.2%)	1/2 (50.0%)	0.425
≥ 40	24/73 (32.9%)	15/38 (39.5%)	0.490
Parto, n (%)	23/84 (27.4%)	12/42 (28.6%)	0.888
<35	1/2 (100%)	0/2 (0.0%)	-
35-39	1/9 (11.1%)	0/2 (0.0%)	0.621
≥ 40	22/73 (30.1%)	12/38 (31.6%)	0.876
Aborto, n (%)	4/84 (4.8%)	4/42 (9.5%)	0.315
<35	0/2 (0.0%)	0/2 (0.0%)	-
35-39	1/9 (11.1%)	1/2 (50%)	-
≥ 40	2/73 (2.7%)	3/38 (7.9%)	0.336

- Resultados de TEV de buena calidad D+6 > TEV mala calidad D+5



P-048 ▶

## IMPACTO DE LA EDAD PATERNA AVANZADA EN LA PLOIDIA EMBRIONARIA

M. De Las Heras Martínez, E. Martínez Sanz, O. Gómez Picado, O. Aguirre Landaluze, R. Celis García, I. Romero Romeo, G. Barrentxea Ziarrusta  
Reproduccion Bilbao - Bilbao (Bizkaia)

### INTRODUCCIÓN:

Con mayor frecuencia las parejas que han realizado varios ciclos de PGT-A con embriones originarios de gametos propios y con resultados fallidos, reclaman realizar también PGT-A cuando pasan al programa de ovodonación. La edad materna en estos casos no debería ser un factor agravante y tampoco el cariotipo paterno, ya que fue normal en el 100% de los casos. Por lo que cabe estudiar si la edad paterna puede tener algún impacto en los resultados del tratamiento.

### OBJETIVO:

Evaluar el factor edad paterna avanzada como posible indicación para realizar PGT-A

### MATERIAL Y MÉTODO:

168 embriones pertenecientes al programa de ovodonación fueron biopsiados en estadio de blastocisto y analizados mediante tecnología NGS. El 100% de los embriones fueron cultivados en sistema video time-lapse para controlar el momento óptimo de biopsia, esta se realizó mediante con ayuda del láser Saturn 5 Laser System.

Agrupamos los resultados en función de la edad paterna Grupo 1 <35 años (N=34), Grupo 2 =36-45 años (N=108), Grupo 3 >45 años (N=26). Se evaluaron resultados los siguientes resultados tasa de blastocisto, euploidía, mosaicismo y tasa de aneuploidías. Los datos fueron analizados mediante test Chi 2.



# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

La tasa de blastocisto observada fue (60.71% vs 64,34 vs 40%)  $p < 0.05$  (0,027). La tasa de euploidía (26,47% vs 44,66 % vs 23,08 %)  $p > 0.05$  (0,072) La tasa de embriones aneuploides observada fue (55,88 % vs 26,21 vs 26,92 %)  $p > 0.05$  (0,062) y la tasa de mosaicismo fue (17,65 % vs 30.1% vs 50%)  $p > 0.05$  (0,065)

## CONCLUSIONES:

Aunque en el grupo 3, se ha observado un ligero aumento en la tasa de embriones mosaicos y un descenso en la tasa de embriones euploides ninguno de estos resultados presenta diferencias significativas con respecto a los grupos de menor edad.

La edad paterna avanzada tiene impacto negativo en el éxito del ciclo reproductivo, pero no parece que sea a nivel de la ploidía embrionaria, los resultados obtenidos indican que influye en la tasa de blastocistos biopsiables, lo que reduciría las posibilidades contar con embriones euploides. La bibliografía consultada sugiere conclusiones similares, aunque parece apuntar al descenso en la fecundación como la principal causa del impacto negativo en lugar de a la tasa de embriones que logran llegar a estadio de blastocisto [1 y 2].

Los pacientes deberían ser informados en consulta que la edad paterna si tiene consecuencias negativas en el éxito reproductivo,

aunque no sean tan drásticas como la edad materna avanzada. Está ampliamente documentado en la bibliografía científica que la edad paterna avanzada aumenta las tasa de aborto, fallos de implantación, [3] y la incidencia en enfermedades ligadas a origen epigenético como trastorno bipolar o la esquizofrenia [4].

Han de tenerse en cuenta las limitaciones del estudio observacional que son el bajo recuento de embriones biopsiados y la calidad seminal macroscópica que puede no ser óptima en algunos de los ciclos.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. *Is there a correlation between paternal age and aneuploidy rate? An analysis of 3,118 embryos derived from young egg donors.* Michal Dviri et al. *Fertil Steril* 2020.
2. *Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risk to Offspring.* Rakesh Sharma et al. *Reprod Biol Endocrinol* 2015.
3. *Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: a systematic review and meta-analysis.* Du Fossé NA, et al. *Hum Reprod* 2020.
4. *Advanced paternal age effects in neurodevelopmental disorders review of potential underlying mechanisms.* Janecka M, et al *Transl Psychiatry* 2017.

P-049 ▶

## ¿CUÁNDO TENDRÉ UNA RESPUESTA DE LA CNRHA?

**C. Giménez Sevilla (1), CM. Armada Sánchez (1), O. Martínez-Passarell (2), A. Gómez Duro (3), E. Garcia-Guixé (1), E. Toro Toro (1)**

(1) Reprogenetics Spain - Barcelona (Barcelona), (2) Fundació Puigvert - Barcelona (Barcelona), (3) Reprogenetics Spain - Madrid (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

La aparición y el uso de técnicas diagnósticas como los arrays o la NGS conllevan la detección de anomalías no detectables mediante medios convencionales y que no han sido observadas con anterioridad. En algunos casos, no es evidente que la anomalía objetivada sea causa de la sintomatología que presenta la persona afectada porque no ha sido posible establecer su significancia clínica. Al mismo tiempo, a menudo, se desconoce su penetrancia, expresividad, etc.

Ante estas situaciones aparece la duda de si podemos utilizar técnicas de PGT para evitar la transmisión de la anomalía a la descendencia.

La Ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida (Art.12) indica cuando podemos realizar un PGT. Así, en enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz, no susceptibles de tratamiento curativo posnatal (art.12.1.a), o para la detección de alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del preembrión (art.12.1.b), podemos realizar un PGT. Cuando no

# COMUNICACIONES PÓSTERS

se cumplen estas circunstancias, se requiere la autorización por parte de la Consejería de Salud de la comunidad autónoma a la que pertenece el centro de FIV junto con informe favorable de la CNRHA. Sin embargo, desde septiembre de 2017, se aprobó la emisión de informes directamente desde la Secretaría de la CNRHA para determinadas enfermedades (por ejemplo, cáncer de mama/ovario hereditario (BROVCA) o síndrome de Lynch (HNPCC)), siempre que cumplieran los criterios generales de inclusión.

La existencia de la CNRHA, formada por profesionales de diferente índole, es una ayuda inmejorable e imprescindible para los profesionales de la genética reproductiva, ya que resuelve casos en los que puede haber dudas sobre la aplicación de la Ley.

¿Dónde radica el problema pues? En el tiempo de respuesta.

## OBJETIVO:

Determinar el tiempo de resolución de las solicitudes remitidas a la CNRHA.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se han revisado retrospectivamente 46 solicitudes remitidas a la CNRHA desde 06/2016-10/2020. Se analiza la edad de las pacientes, indicación, fecha de solicitud y fecha de resolución.

## RESULTADOS:

De las 46 resoluciones remitidas, 32 (69,5%) eran para patologías con emisión de informes desde la secretaría.

Globalmente, la media de días entre la solicitud y la resolución fue de 144 días (tiempo mínimo de 49 y máximo de 667 días). La mediana fue de 117 días (3,9 meses). Teniendo en consideración estos datos, la edad media de las pacientes en el momento de la solicitud fue de 33,4 años y de 33,8 en el de la resolución.

Las solicitudes en casos de BROVCA tardaron una media de 103 días en resolverse (3,4 meses) con un mínimo de 49 (1,6 meses) y un máximo de 232 días (7,7 meses). La edad media de las pacientes en el momento de la solicitud y la resolución fue de 32,6 y de 33,1 años, respectivamente. Cuando el gen implicado fue BRCA1, el tiempo de resolución fue de 3,8 meses (114 días), y para BRCA2, 3 meses (90 días) antes de obtener la resolución.

Para HNPCC, el tiempo hasta obtener la resolución fue de 4,4 meses (132 días). En casos de anemia falciforme junto con tipaje HLA, 5,2 meses (156 días). Para otras patologías el tiempo medio entre solicitud y resolución fue de 8,3 meses (248 días).

## CONCLUSIONES:

A tenor de los resultados obtenidos, podemos concluir que, para esta serie de datos, el tiempo necesario en obtener una resolución es de aproximadamente cuatro meses para patologías donde el informe se emite desde la secretaría de la CNRHA. Para otras patologías, el tiempo aproximado para obtener una resolución es de 8 meses. Aunque la media de edad de las pacientes era <35 años, cabe esperar que en pacientes con edad materna avanzada el tiempo de espera para obtener una resolución impacte de forma negativa en su pronóstico reproductivo.

P-050 ▶

## EL TIEMPO DE BORRADO DE PRONÚCLEOS (PNFANDING) ES UNA VARIABLE MORFOCINÉTICA DEPENDIENTE DEL ORIGEN DE LOS GAMETOS

**V. Antequera Durán, P. Muñoz Soriano, E. Ferrer Robles, I. Navarro Morillo, C. Calatayud Lliso, M. Ruiz Jorro, M. Ferrer Buitrago**

CREA MEDICINA DE LA REPRODUCCIÓN - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

La tecnología time-lapse permite evaluar los eventos del desarrollo embrionario bajo una dimensión temporal además de morfológica. En los últimos años se han determinado parámetros morfofocinéticos asociados al desarrollo embrionario

estableciéndose su posible relación con la viabilidad y capacidad de implantación. La mayoría de los estudios evalúan la morfofocinética embrionaria de manera independiente en cada embrión. No obstante, algunos autores resaltan la importancia de estudiar los embriones de un mismo ciclo en su conjunto, puesto que tanto las características de la paciente como la de sus ciclos de

# COMUNICACIONES PÓSTERS

estimulación pueden ser factores de confusión a la hora de hacer una valoración pronóstica. El estudio de la variabilidad de los parámetros morfocinéticos entre los embriones de una misma paciente en un mismo ciclo (intra-ciclo) y entre embriones de diferentes ciclos (inter-ciclo), permite conocer si un determinado parámetro caracteriza de forma individualizada a cada embrión o si existe un efecto cohorte que hace que siempre sea similar en los cigotos obtenidos a partir de los gametos de una misma pareja.

## OBJETIVO:

Análisis de variabilidad intra e inter-individual del parámetro morfocinético PN fading (PNf) y su relación con el origen de los gametos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Análisis retrospectivo de 527 ciclos de estimulación correspondientes a un total de 374 pacientes y 48 donantes. En primer lugar, se determinó la variabilidad intra-ciclo, valorando el tiempo PNf por ovocito y por ciclo de estimulación. Seguidamente se determinó la variabilidad inter-ciclo en pacientes y donantes que habían realizado más de 2 ciclos de estimulación y tenían más de 3 cigotos en total. Las pacientes estudiadas presentaron distintas pautas de estimulación ovárica. Para valorar la variabilidad del tiempo PNf se utilizó el estadístico de Levene y se estudió la homocedasticidad de las varianzas para un nivel de significancia de 0,05. También se calculó el coeficiente de variación (CV; cociente de la desviación típica y la media del valor PNf) intra- e inter-ciclo. Todos los cigotos estudiados se cultivaron en medio único G-TL (Vitrolife) y se incubaron en el sistema Geri time-lapse (Genea). En todos los ciclos de donación se utilizaron ovocitos vitrificados.

## RESULTADOS:

El análisis revela la homogeneidad de los valores de tiempo PNf tanto entre los cigotos de una misma paciente cuando se utilizaron ovocitos propios (baja variabilidad intra-ciclo;  $p$  0,779) como entre los cigotos de varios ciclos de una misma paciente (baja variabilidad inter-ciclo;  $p$  0,647). Los CV mostraron valores medios del 9,7 % para el análisis intra-ciclo, y del 5,7% para el análisis inter-ciclo. En el caso de ciclos de ovodonación también se observó una baja variabilidad intra-ciclo ( $p$  0,804) con un valor medio del CV del 11,7%.

El CV inter-ciclo con ovocitos de donantes en los que se usaron diferentes muestras de semen fue del 11,8%, mostrando una mayor heterogeneidad en el resultado si bien no alcanzó la significancia estadística ( $p$  0,053). Además, el valor PNf también se comparó los ciclos de 2 pacientes que utilizaron ovocitos propios y posteriormente realizaron ovodonación. El valor medio PNf varió en ambos casos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSIONES:

El presente análisis muestra que el tiempo de borrado de pronúcleos (PNf) es una variable morfocinética homogénea y que depende del origen de los gametos. Nuestras observaciones revelan una heterogeneidad inter-ciclo en aquellos casos en los que se realizó un cambio de gameto. Esto hace sospechar que esta variable morfocinética puede verse influenciada tanto por las características específicas del gameto masculino como del femenino y evidencia la dificultad de establecer valores de referencia de normalidad extrapolables de forma universal. Son necesarios futuros estudios para corroborar estos resultados.

## BIBLIOGRAFÍA:

Mumusoglu, S. et al. Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient- and ovarian stimulation-related factors are taken into account with the use of clustered data analysis. *Fertil. Steril.* 107, 413-421.e4 (2017).

## EL COLOR DE LA LUZ AMBIENTAL EN EL LABORATORIO DE FIV NO AFECTA LAS TASAS DE NACIDO VIVO

V. Montalvo Pallès, J. Masso Hernáez, A. García-Faura Cirera, B. Marquès López-Teijón, M. López-Teijón Pérez.  
Institut Marquès - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La luz es uno de los factores ambientales a considerar en un laboratorio de FIV. La mayoría de laboratorios trabajan en un ambiente de poca luz, tratando de replicar el ambiente en el que los embriones se encontrarían de manera natural. Sin embargo, el 95% de la luz a la que están expuestos los embriones no proviene del ambiente sino del microscopio.

La implantación de las tecnologías time-lapse en los laboratorios de FIV permite mantener unas condiciones de cultivo más estables y reducir la cantidad de luz que incide en los embriones durante su desarrollo in vitro.

De manera clásica se ha descrito que la exposición extrema a la luz es detrimental para los embriones via photo-oxidación o mediante la creación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, no hay ningún estudio que evalúe el efecto de las diferentes longitudes de onda sobre los resultados de los tratamientos de FIV.

### OBJETIVO:

Determinar si diferentes longitudes de onda en la luz ambiental afectan las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio prospectivo realizado desde enero de 2019 hasta febrero de 2020. Cada 60 días se modificaba la longitud de onda emitida por las luces LED instaladas en el laboratorio de FIV. Se realizaron 6 grupos: cian (470nm), verde (550nm), amarillo (600nm), naranja (625nm), luz blanca y luz blanca de muy baja intensidad como grupo control.

Se incluyeron en el estudio 572 ciclos de donación de ovocitos con 355 transferencias realizadas. En todos los ciclos se realizó ICSI

y cultivo en Time Lapse (Embryoscope, Vitrolife), se excluyeron los tratamientos con PGT. Los ovocitos/embriones fueron expuestos a la luz ambiente durante la punción, la decumulación, el ICSI y la transferencia embrionaria.

### RESULTADOS:

La exposición de los embriones y gametos a la luz ambiental durante la manipulación es inevitable. Las tasas comúnmente analizadas para evaluar el éxito de los tratamientos de FIV fueron analizadas. Ni el color de la luz ni la intensidad de esta afectaron ninguno de los parámetros.

No se encontraron diferencias significativas entre las edades maternas, la edad de la receptora, el diagnóstico, ni el número de ovocitos recibidos entre los 6 grupos ( $p > 0,05$ ). Tampoco se encontraron diferencias entre las tasas de fecundación (C= 77.04%; G= 73.72%; Y= 75.64%; O= 78.1%; WL=76.4%; WH=75.2%;  $p=0,216$ ) ni la tasa de blastocisto utilizable (C= 57.35%; G= 57.37%; Y= 62.30%; O= 59.75%; WL=63.28%; WH=60.55%;  $p=0,234$ ). En cuanto a las tasas de implantación (C= 61.67%; G= 52.89%; Y= 55.10%; O= 66.18%; WL=66.00%; WH=53.55%;  $p=0,194$ ) y aborto (C= 24.32%; G= 19.15%; Y= 11.11%; O= 24.44%; WL=15.15%; WH=8.11%;  $p=0,301$ ) tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos. No se encontraron diferencias entre las tasas de nacido de los diferentes grupos (C= 51.85%; G= 50.00%; Y= 52.17%; O= 53.97%; WL=57.14%; WH=50.75%;  $p=0,168$ ).

### CONCLUSIONES:

Este estudio demuestra que, con los actuales avances en las condiciones de cultivo embrionario, ni la intensidad de la luz ni las diferentes longitudes de onda a los que pueden estar expuestos los gametos/embriones durante la manipulación tienen efecto alguno sobre las tasas de éxito.

## RELEVANCIA DE LA TÉCNICA ICSI, TIME-LAPSE Y CULTIVO A BLASTOCISTO EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS CON FACTOR MASCULINO

**A. Aragonés Esteve (1), S. Sánchez Macho (2), M. Poveda García (1), R. López Sánchez (1), E. Moya Gutiérrez (1), JM. Moreno García (1), R. Núñez Calonge (3), JJ. López Gálvez (1)**

(1) Unidad de Reproducción Clínica Vistahermosa - Alicante (Alicante), (2) Unidad de Reproducción Montpellier - Zaragoza (Zaragoza), (3) Unidad de Reproducción Clínica Moncloa - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

El factor masculino representa aproximadamente un 40% de las causas de infertilidad y, la presencia del mismo, puede reducir considerablemente la probabilidad de embarazo natural. Es por ello que en la actualidad se emplean de forma habitual diferentes técnicas de selección espermática en los tratamientos de reproducción asistida con el fin de minimizar el impacto del mismo y maximizar la probabilidad de éxito.

### OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es valorar si el uso recurrente de la técnica de microinyección intra-citoplasmática (ICSI), el sistema de incubación time-lapse y la transferencia en blastocisto en pacientes con factor masculino equipara la probabilidad de éxito a la de pacientes normozoospermicos.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo de 283 ciclos de recepción de ovocitos de donante en fresco y con más de seis ovocitos por ciclo, realizados con ICSI, incubación en time-lapse y transferencia en blastocisto, comprendidos entre el 2017 y el 2020. De los 283 ciclos estudiados, 127 fueron con varones normozoospermicos y 156 con factor masculino. Se ha comparado la tasa de fecundación, blastocisto e implantación entre los dos grupos diferenciándose entre transferencias únicas y de dos blastocistos.

Para calcular la tasa de fecundación y la tasa de blastocisto se ha aplicado el test U de Mann-Witney debido a la ausencia de normalidad de las muestras. La tasa de implantación se ha calculado a partir de tablas de contingencia y test Chi-cuadrado.

### RESULTADOS:

No se han observado diferencias significativas en la tasa de fecundación entre pacientes con factor masculino versus normozoospermicos (73% vs 74%). Tampoco hay diferencias separando las distintas categorías espermáticas (OA,T,OA, OT,AT y OAT).

No hay diferencias significativas en la tasa de blastocisto entre ambos grupos (51% en pacientes con factor masculino vs 53% en pacientes normozoospermicos). Tampoco se observan diferencias separando las distintas categorías espermáticas.

Por último, no hay diferencias en la tasa de implantación entre los dos grupos cuando se transfiere un embrión (55% en normozoospermicos vs 39% en factor masculino) o en el transfer de dos embriones (68% en normozoospermicos vs 74% en factor masculino).

### CONCLUSIONES:

Basándonos en los resultados obtenidos podemos concluir que la combinación de la técnica ICSI, incubación en time-lapse y cultivo a blastocisto permite equiparar los resultados en pacientes con factor masculino con los normozoospermicos.

## COMUNICACIONES PÓSTERS

PACIENTES	N	T.FECUND.	M-W	T.BLT	M-W
<b>NORMO</b>	127	74%	-	53%	-
O	13	66%	0,096	55%	0,68
OA	11	75%	0,828	51%	0,852
OT	7	59%	0,057	57%	0,572
A	50	73%	0,513	53%	0,815
AT	19	70%	0,608	52%	0,815
T	43	79%	0,143	49%	0,181
OAT	13	69%	0,297	45%	0,099
<b>TOTAL ALTERADOS</b>	156	73%	0,539	51%	0,362

PACIENTES	T. IMPLANTACIÓN					
	N (74)	1 EMB	Sig.	N (209)	2 EMB	Sig.
<b>NORMO</b>	33	55%	-	94	68%	-
<b>TOTAL ALTERADOS</b>	41	39%	0,183	115	74%	0,354

P-055 ▶

### MALE EMBRYOS TAKE LONGER TO DEVELOP TO THE BLASTOCYSTS STAGE

JJ Fraire Zamora, M Martínez, D García, R Vassena, A Rodríguez  
EUGIN - Barcelona (Barcelona)

#### INTRODUCTION:

Differences in gene expression and metabolic uptake between male and female preimplantation embryos have been found in animal models and humans. These differences could affect the developmental timings of embryos resulting in differences in either sex. Morphokinetic parameters can precisely assess developmental timings. Only a few studies have analyzed morphokinetic parameters between male and female preimplantation embryos and no consensus has been reached on whether there is any sex-specific difference.

#### OBJECTIVE:

To compare morphokinetic parameters between male and female preimplantation embryos in order to determine any sex-specific developmental differences and avoid selection biases during embryo transfers in ART clinics.

#### MATERIAL AND METHOD:

This study included retrospective time-lapse data (February 2018 to February 2020) from 102 preimplantation embryos giving rise to 51 baby boys and 51 baby girls, as seen at birth. This is a single-center

# COMUNICACIONES PÓSTERS

study with standardized culture conditions. Embryos in both study groups issued from cycles with donated oocytes. Only elective blastocyst stage single-embryo transfers (SET) on day 5 were assessed. The morphokinetic parameters obtained from time-lapse records of each embryo were: time to pronuclear fading (tPNf), times to 2–8 cells (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8), time to start of blastulation (tSB) and time to full blastocyst stage (tB). A two-tailed Student's t-test was used to compare morphokinetic parameters between embryo sexes. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULT:

A tendency to statistical difference ( $p = [0.1-0.05]$ ) was observed for blastocyst-related morphokinetic parameters: tSB (mean time was  $89.6 \pm 6.3$  hours in male embryos vs.  $86.9 \pm 8.1$  hours in female embryos,  $p = 0.06$ ) and tB ( $100.2 \pm 5.9$  hours versus  $97.9 \pm 6.5$  hours,  $p = 0.07$ ). Male embryos showed an increased average time of 2.7 hours to tSB and 2.3 hours to tB, while no differences were found in the mean times of all the other morphokinetic parameters measured ( $p > 0.50$ ): tPNf ( $\sim 21.8 \pm 3.0$  hours); t2 ( $\sim 24.4 \pm 3.2$  hours); t3 ( $\sim 35.6 \pm 3.9$  hours); t4 ( $\sim 36.6 \pm 4.6$  hours); t5 ( $\sim 46.9 \pm 6.0$  hours); t6 ( $\sim 53.5 \pm 7.0$  hours); t7 ( $\sim 54.1 \pm 7.3$  hours) and t8 ( $\sim 54.1 \pm 7.3$  hours).

## CONCLUSION:

Our results suggest a sex-specific difference, with male embryos taking longer to reach blastocyst stage. If confirmed in a larger sample, this sex-specific developmental difference should be taken into account to avoid embryo selection biases for transfers in ART clinics.

## BIBLIOGRAPHY:

Gardner D. K., et al, (2010). Sex-related physiology of the preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 16(8): 539-547.

Luna M. et al, (2007). Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertil Steril* 87(3): 519-523.

Weston G. et al, (2009). Blastocyst transfer does not cause a sex-ratio imbalance. *Fertil Steril* 92(4): 1302-1305.

Bodri D. et al, (2016). Time-lapse variables and embryo gender: a retrospective analysis of 81 live births obtained following minimal stimulation and single embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 33(5): 589-596.

P-056 ▶

## TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO ELECTIVO EN D+3 VS D+5 EN UN HOSPITAL PÚBLICO

M. López Regalado, B. López Lería, L. Martínez Granados, E. Cano Oliva, L. Baños Gavilán, S. Mora Estrada  
Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

La transferencia de embrión único electivo (eSET) está relacionada con la disminución del embarazo múltiple, sin embargo, en el último registro de la SEF de 2018, sólo el 44.0% de las transferencias realizadas fueron de un embrión. Además, el 72.0% de las transferencias realizadas a nivel nacional fueron en D+2/D+3.

## OBJETIVO:

Nos planteamos analizar si el eSET en D+3, tiene utilidad en los centros de reproducción, que no tienen la posibilidad de hacer cultivo largo de embriones.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se analizan retrospectivamente las tasas de gestación clínica obtenidas de 51 transferencias realizadas entre enero de 2019 y enero 2020. Del total de transferencias, 21 fue en D+3 y 30 en D+5. Los criterios de inclusión en el grupo de eSET en D+3 son: pacientes menores de 38 años, sin anomalías uterinas ni endometriosis severa, entre 3 y 4 fecundados y con al menos dos embriones de buena calidad según la clasificación de ASEBIR (A o B). En el grupo de eSET en D+5 los criterios son: tener al menos 5 fecundados y 1 blastocisto (A, B o C, según la clasificación de ASEBIR). Se realiza un test de Chi cuadrado para conocer la significación de los resultados.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

Las tasas de gestación en D+3 y D+5 fueron de 38% (8/21) y 40% (12/30), respectivamente. No se observan diferencias significativas entre las tasas de gestación al realizar eSET en D+3 en un grupo de pacientes seleccionadas frente a realizar eSET en D+5.

## CONCLUSIONES:

Es posible realizar transferencias electivas de embrión único en D+3, en pacientes seleccionadas de manera análoga a la transferencia de embrión único en D+5. No tener la posibilidad de hacer cultivo largo, no impide realizar eSET y reducir los riesgos del embarazo múltiple.

P-057 ▶

## GRADO DE EXPANSIÓN EN LA VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA Y SU IMPLICACIÓN EN RESULTADOS CLÍNICOS

**N. Ruiz Espinosa (1), Á. Linares Bernabéu (1), J. Bartolomé García (1), JA. Ortiz Salcedo (2), J. Ten Morro (3), L. Luque Martínez (1), R. Bernabéu Pérez (3)**

(1) Instituto Bernabéu - Albacete (Albacete), (2) Instituto Bernabéu Biotech - Alicante (Alicante), (3) Instituto Bernabéu Alicante - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

La selección del embrión con mayor capacidad para dar lugar a una gestación evolutiva constituye uno de los mayores retos en la práctica clínica diaria de los embriólogos. Categorizar el potencial implantatorio de los embriones supone disminuir el tiempo hasta conseguir el recién nacido vivo en casa, optimizando la tasa de éxito del tratamiento.

A pesar de que se ha establecido que existe una asociación directa entre la cinética del desarrollo embrionario y las tasas clínicas del tratamiento, la calidad otorgada por el grado de expansión puede verse afectada por su calidad morfológica.

## OBJETIVO:

El propósito de este estudio consiste en establecer y analizar qué grado de expansión puede verse comprometido por el proceso de vitrificación embrionaria, buscando discernir aquel grado de expansión con mayor probabilidad de éxito clínico, frente a una misma calidad morfológica.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo de cohortes realizado entre julio de 2017 y junio de 2020 en pacientes que realizaron un ciclo de Fecundación In Vitro (FIV). Se incluyeron 2290 tratamientos de ovodonación y transferencia de un único blastocisto en

ciclo diferido. Se excluyeron pacientes con patología uterina, espermatozoides testiculares y ciclos de diagnóstico genético preimplantacional. Se valoró la asociación entre el grado de expansión previo a la vitrificación: compactado/ iniciando cavitación, blastocisto temprano, en expansión, expandido, iniciando eclosión y eclosionado; y la B-hCG positiva (>5 mUI/mL) en suero sanguíneo, gestación clínica, aborto clínico y recién nacido vivo.

La clasificación de la calidad embrionaria fue establecida siguiendo los criterios de ASEBIR (2015) y Gardner y Schoolcraft (1999).

La vitrificación y desvitrificación embrionaria se realizó empleando el protocolo y medios de Irvine Scientific® (Fujifilm IrvineScientific) en soporte cerrado HSV (Cryo Bio System). Los embriones se cultivaron en incubadoras tipo benchtop al 7.2% CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub> y 86.8% N<sub>2</sub>, en medio de cultivo Global Total® (Cooper Surgical) suplementado con seroalbúmina humana (HSA, SAGE media) al 5%.

El grado de expansión embrionaria como predictor del éxito clínico se evaluó mediante una regresión logística binaria corregida por calidad embrionaria (A, B o C), día de desarrollo (5, 6 ó 7), tipo de ovocito (fresco/congelado) y origen seminal (cónyuge/donante y fresco/congelado). El tratamiento estadístico fue realizado usando el paquete estadístico SPSS 20.0.



# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

La edad media de las receptoras de ovodonación y de las donantes de ovocitos fue de  $42.39 \pm 4.14$  y  $23.75 \pm 4.24$  años, respectivamente. La distribución del grado de expansión fue: 5.6% compactado/ iniciando cavitación, 6.5% blastocisto temprano, 31.7% en expansión, 33.0% expandido, 21.2% iniciando eclosión y 2% eclosionado.

Las tasas clínicas de los ciclos de FIV fueron: 39.4% B-hCG en suero positiva, 33.8% gestación clínica, 9.1% aborto clínico y 24.7% recién nacido vivo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grado de expansión embrionaria antes de la criopreservación y los resultados clínicos tras la criotransferencia: B-hCG positiva ( $p=0.061$ ), gestación clínica ( $p=0.164$ ), aborto clínico ( $p=0.382$ ) y recién nacido vivo ( $p=0.425$ ).

Comparando entre estadios tempranos del desarrollo (compactado/ iniciando cavitación) con aquellos más evolucionados (blastocisto expandido) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a: B-hCG (OR= 1.831, IC 95% [0.861-3.892], ( $p=0.116$ ), gestación clínica (OR= 1.669, IC 95% [0.712-3.911], ( $p=0.238$ ), aborto clínico (OR= 0.192, IC 95% [0.030-1.232], ( $p=0.082$ ) y recién nacido vivo (OR= 0.954, IC 95% [0.788-1.154], ( $p=0.382$ ).

## CONCLUSIONES:

Los resultados evaluados no muestran una relación significativa entre el grado de expansión y los resultados clínicos tras corregir por calidad morfológica. Los datos obtenidos en este estudio permitirían priorizar la selección embrionaria en base a la calidad morfológica en detrimento de la evolución en términos de expansión. Se requeriría de estudios prospectivos más amplios que incluyan cohortes homogéneas para corroborar nuestros resultados iniciales.

P-058 ▶

## ¿FIV CONVENCIONAL O ICSI TRAS FRACASO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL?

**JM. Molina Villar, JM. Fernández Gómez, AI. Expósito Navarro, JA. Gobernado Tejedor, L. Rodríguez-Taberneró Martín, L. Barrero Real, AB. Casas Marcos, D. Zautúa Romero, R. Velázquez Barbado, C. del Pino Ortega**  
Hospital Clínico Universitario - Valladolid (Valladolid)

## INTRODUCCIÓN:

Desde el descubrimiento de la ICSI, la FIV convencional se ha visto relegada a un segundo plano e incluso anulada en muchos centros de reproducción. La adecuada indicación de la técnica de fecundación in vitro a utilizar es vital para maximizar los resultados obtenidos y minimizar los riesgos y los costes. En la bibliografía existente podemos encontrar indicaciones claras para la realización de la técnica de FIV convencional, como es el caso del factor tubárico o el factor masculino moderado o leve, mientras que existen otras indicaciones en cuyo uso es controvertido, como es el caso de las parejas que no han gestado tras Inseminación Artificial.

## OBJETIVO:

Determinar si existen diferencias significativas en el éxito de un tratamiento de fecundación in vitro realizando FIV convencional o ICSI tras fracasar con la técnica de Inseminación Artificial.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio prospectivo aleatorizado, realizado desde enero de 2020 hasta la actualidad. Se seleccionaron 40 pacientes con al menos 4 ciclos de Inseminación Artificial fallidos a las cuales se las derivó a realizar su primer ciclo de fecundación in vitro, y se aleatorizaron para FIV convencional y para ICSI, 20 pacientes en cada brazo. Las muestras seminales se capacitaron por gradientes de densidad, y los ovocitos tras ser fecundados se cultivaron en medio de cultivo único G-TL (Vitrolife®), valorándose la fecundación al día siguiente y diferenciando entre fecundación normal con 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares, y fecundación anómala cuando se obtuvo un pronúcleo o tres o más pronúcleos. Se cultivaron hasta estadio de blastocisto, realizándose la transferencia embrionaria en el caso de tener embriones evolutivos de buena calidad y de no estar contraindicada la transferencia en fresco, y se vitrificaron los blastocistos sobrantes de buena calidad. Dos semanas después, se realizó la determinación de  $\beta$ -HCG para determinar si habían gestado ( $\beta$ -HCG  $\geq 50$ ). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney y el test de Chi cuadrado.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

Los grupos obtenidos fueron comparables, siendo homogéneos en cuanto a edad de la paciente, valor de REM de la muestra seminal, y número de ovocitos extraídos. Los porcentajes de fecundación se calcularon con respecto al número de ovocitos extraídos para comparar la fecundación obtenida con ICSI de la obtenida con FIV donde se desconoce el número de ovocitos maduros, resultando una tasa de fecundación en FIV de 66,38% frente al 48,79% en ICSI, mostrando diferencias significativas en la tasa de fecundación entre ambas técnicas ( $p=0,033$ ). Sin embargo, ni la tasa de evolución a blastocisto, ni la tasa de gestación mostraron diferencias estadísticas. El número de cigotos anómalos

obtenidos sí presentó diferencias significativas ( $p=0,026$ ), siendo en FIV de 1,15 y de 0,4 en ICSI. Al comparar la tasa de gestación con los distintos parámetros estudiados, tan solo se observó correlación entre la tasa de gestación y la tasa de fecundación en ICSI ( $p=0,028$ ).

## CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos apoyan el uso de la técnica de FIV convencional en las pacientes que no han conseguido una gestación tras Inseminación Artificial, siendo semejantes e incluso mejores en algunos parámetros a los obtenidos por ICSI. Por tanto, el Fracaso de Inseminación Artificial debería incluirse como una indicación para FIV convencional.

P-059 ▶

## CARIOTIPO EN DONANTES DE GAMETOS: ALTERACIONES Y POLIMORFISMOS CROMOSÓMICOS

**M. Molina Romero (1), M. Guzmán Bellido (2), JA. Castilla Alcalá (1), S. Rodríguez Guirado (2), CJ. Rodríguez Izquierdo (2), MJ. Lupiáñez Giner (2), ML. Bellido Díaz (3), M. Pérez Sánchez (3), N. Morales Rincón (2), A. Romo Bermúdez (2)**

(1) Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs. - Granada (Granada), (2) Unidad de Reproducción, Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada), (3) Unidad gestión clínica, Laboratorio clínico, Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada)

## INTRODUCCIÓN:

No existen criterios unánimes en cuanto a la realización de cariotipos en donantes de gametos según las diferentes sociedades científicas. La prevalencia de alteraciones cromosómicas descritas varía entre los distintos autores, no existiendo un consenso establecido de cómo interpretar estos resultados. Pudiendo ser la interpretación de estas variantes polimórficas parte fundamental de estas discrepancias.

## OBJETIVO:

Determinar la prevalencia y tipo de alteraciones cromosómicas en donantes de ovocitos y semen, así como de polimorfismos cromosómicos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Entre enero 2017 y agosto 2020, se realiza el cariotipo a 895 donantes de semen y 923 de ovocitos, que cumplen los

criterios de aceptación establecidos por el banco de gametos. Los donantes de semen presentaron normalidad en la exploración física, historia clínica personal y familiar, y al menos 3 análisis de semen ( $>50$  millones de espermatozoides/mL,  $>50\%$  movilidad espermática,  $>4\%$  de espermatozoides con morfología normal), mientras que las donantes de ovocitos, presentaron normalidad en historia clínica personal y familiar, una exploración física general y ginecológica, y recuento ecográfico de folículos antrales. El análisis cromosómico se realiza en linfocitos de sangre periférica obtenida en tubo heparina sódica, cultivo por técnica convencional con fitohemaglutinina (PHA) y sacrificio del cultivo por adición de colchicina, aplicándose técnica de bandejo GTG mediante protocolo estándar y se analizan un total de 20 metafases con el análisis completo de cinco cariotipos. Se distinguen por un lado las alteraciones cromosómicas consideradas con posibilidad de fracaso de las Técnicas de Reproducción Asistida y por otro los polimorfismos. Las frecuencias observadas se compararon mediante test de Chi cuadrado, y en caso de no cumplir condiciones de validez, el test de Fischer.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

La prevalencia de alteraciones cromosómicas que se encontraron en donantes de semen y ovocitos fue del 0.34% y 0.7%, respectivamente, viéndose afectados principalmente los autosomas en ambos grupos. En donantes de semen las alteraciones cromosómicas más frecuentes fueron las translocaciones robertsonianas con un caso 45,XY,rob(13;14)(q10;q10) y otro 45,XY,rob(14;21)(q10;q10) y en donantes de ovocitos fue la translocación del cromosoma 2, siendo un caso de 46,XX,t(2,3)(p12;q26.1) y otro de 46,XX,t(2;7)(p24;p21). En relación a los polimorfismos, en donantes de semen se encontraron un 1.2% de cariotipos con polimorfismos cromosómicos, y en donantes de ovocitos este porcentaje fue del 1.08%, siendo el polimorfismo que se encontró con más frecuencia la inv(9)(p11q13) para ambos tipos de donantes. En donantes de

semen se encontró como polimorfismo en gonosomas la inv(Y) y no se encontraron polimorfismos en gonosomas en donantes de ovocitos. No se encontraron diferencias significativas entre donantes de semen y donantes de ovocitos en la prevalencia de cariotipos alterados por gonosomas y autosomas, tanto alteraciones numéricas como estructurales.

## CONCLUSIONES:

En nuestra opinión, los donantes con translocaciones deberían ser rechazados porque este tipo de alteraciones dan lugar a segregaciones anómalas que pueden producir gametos desequilibrados. Por otro lado, ante la controversia sobre el efecto de los polimorfismos cromosómicos en Técnicas de Reproducción asistida y a la mayor seguridad que se le debe exigir a estas técnicas que utilizan gametos donados, pensamos que los donantes que presentan estos polimorfismos deberían ser rechazados.

P-060 ▶

## LA IMPORTANCIA DEL MEDIO DE ICSI Y SU INFLUENCIA EN EL ÉXITO DEL TRATAMIENTO

**A. Bosch Villegas, LL. Medrano López, P. Pastor Navarro, A. Parrella, L. Ortega López, J. Aizpurua.**  
IVF SPAIN ALICANTE - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

En el laboratorio de reproducción asistida se realizan técnicas que requieren un estricto control para asegurar el mantenimiento de la homeostasis celular de gametos y controlar su influencia sobre el desarrollo embrionario. Tradicionalmente para el manejo de ovocitos fuera del incubador se ha utilizado medio suplementado con buffer HEPES, pero existe cierta controversia debido a los posibles efectos tóxicos sobre este gameto. Es por ello que algunos grupos han estudiado el efecto de otros medios durante el ICSI, como los suplementados con bicarbonato, y se ha visto que su uso podría mejorar los resultados del tratamiento, aunque siendo más sensible a las alteraciones ambientales. Otra alternativa al uso del medio con HEPES, buscando solventar los déficits encontrados, sería el medio suplementado con buffer dual, HEPES y MOPS, creando un ambiente estable y con menor toxicidad para los ovocitos.

## OBJETIVO:

Evaluar el impacto de dos medios utilizados en ICSI, buffer dual (BD) y buffer bicarbonato (BB), en las tasas de fecundación, blastocisto y embarazo clínico; tanto en ciclos de ovocitos de donante como de ovocitos propios.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Este estudio prospectivo incluyó 47 parejas sometidas a 47 ciclos de ICSI (Diciembre 2019-Diciembre 2020). Se microinyectaron un total de 400 ovocitos de donante, en 32 ciclos, y 160 ovocitos propios, en 15 ciclos. El ICSI se realizó de forma equivalente en cada cohorte ovocitaria con medio BD y medio BB. A lo largo del estudio el embriólogo fue el mismo y se colocaron un máximo de 4 ovocitos por placa de ICSI para que el tiempo de exposición fuera menor a 4min, con el objetivo de evitar variaciones ambientales. Todos los embriones fueron cultivados hasta día 5-6 en medio

## COMUNICACIONES PÓSTERS

de cultivo continuo y los blastocistos obtenidos se clasificaron según la catalogación de Gardner et al., 1999. Las tasas de fecundación, blastocisto y embarazo clínico fueron registradas y analizadas mediante el test estadístico Chi-cuadrado y regresión logística.

### RESULTADOS:

En los ciclos con ovocitos de donante, la fecundación media global fue de 76,8% (307/400). Entre los grupos de estudio, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de fecundación, obteniendo 78,2% (158/202) con BD y 75,3% (149/198) con BB (P=0,483). Tampoco se obtuvieron diferencias (P=0,187) en la tasa de blastocisto con BD 46,8% (74/158) y con BB 34,4% (81/149). De estos 32 pacientes, 29 realizaron una transferencia, alcanzando una tasa de embarazo clínico de 58,3% (7/12) con BD y 70,6% (12/17) con BB; no encontrando diferencias significativas (P=0,468).

En ciclos con ovocitos propios, un total de 15 parejas (edad mujer <37 años) obtuvieron una tasa de fecundación total del 72,5% (116/160). Los resultados obtenidos de la tasa de fecundación

no mostraron diferencias significativas (P=0,608) entre BD 74,4% (58/78) y BB 70,7% (58/82). Aunque sí se encontraron diferencias en la tasa de blastocisto, siendo significativamente mayor con BD 41,4% (24/58) frente a 22,4% (13/58) cuando se utilizó BB (P=0,025). Asimismo, los datos muestran que el riesgo de obtener menos embriones en ciclos de ovocitos propios cuando se utiliza el medio BD es estadísticamente similar al de ciclos con ovocitos de donante (P=0,018; OR=0,424); con un contraste de potencia próximo al 70% (-1,038 estimación). Las 8 parejas que realizaron transferencia alcanzaron una tasa de embarazo clínico de 40,0% (2/5) con BD y 33,3% (1/3) con BB (P=0,036).

### CONCLUSIONES:

Pese a que este estudio incluye un número limitado de pacientes, nuestros resultados muestran que la óptima selección del medio de ICSI tiene un impacto en la tasa de blastocisto en tratamientos con ovocitos propios. Así, el uso de BD en estos ciclos incrementa la cantidad de blastocistos disponibles y, por tanto, podría incrementar la tasa de embarazo acumulada y el recién nacido vivo por ciclo.

P-061 ▶

### ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INCIDEN EN LA FRECUENCIA DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN RESTOS FETALES DE PÉRDIDAS GESTACIONES ESPONTÁNEAS (POC)

**I. Campos Galindo, A. Martínez Fernández, B. Hontangas Martínez, C. Simón Vallés, C. Rubio Lluesa, L. Rodrigo Vivó.**

IGENOMIX - Paterna (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

El análisis cromosómico de restos fetales de pérdidas gestacionales espontáneas (POC) permite determinar la causa de dicha pérdida. La presencia de tejido materno (MCC) junto con tejido fetal puede comprometer la informatividad del estudio. El procedimiento de recogida del POC (legrado convencional, aborto espontáneo o biopsia dirigida), el origen de la gestación (espontánea o reproducción asistida - TRA), la edad materna y la edad gestacional podrían ser determinantes de la informatividad y del resultado del POC.

### OBJETIVO:

Determinar el papel de la edad materna, la edad gestacional y el origen de la gestación en el tipo y la tasa de anomalías cromosómicas de un POC.

Determinar la influencia del procedimiento de recogida del POC y la edad gestacional sobre el éxito en la obtención de tejido exclusivamente fetal.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo (junio-2016 a febrero-2021) en el que se incluyeron 524 POC. El estudio cromosómico se realizó mediante secuenciación masiva (NGS) (Thermo Fisher Scientific, USA) con un algoritmo interno para su diagnóstico que detecta ganancias y/o pérdidas cromosómicas  $\geq 10$  Mb. La poliploidía y la presencia de MCC se determinó mediante STRs (AmpFISTR Identifier Plus, Life technologies). Para la edad materna se estableció un grupo de  $\leq 35$  años ( $n=258$ ) y otro de  $>35$  años ( $n=266$ ). La edad gestacional se organizó en 4 intervalos:  $\leq 6$  semanas ( $n=51$ ),  $7-\leq 12$  semanas ( $n=414$ ),  $12-20$  semanas ( $n=27$ ) y  $\geq 20$  semanas ( $n=6$ ). El procedimiento de recogida del POC incluyó aborto espontáneo ( $n=62$ ), legrado convencional ( $n=222$ ) y biopsia dirigida ( $n=15$ ). De los POC recibidos, 164 procedían de gestaciones espontáneas y 111 de gestaciones de TRA. Para las comparaciones estadísticas se utilizó test Chi-cuadrado ( $p<0,05$ ).

## RESULTADOS:

En el 80% de los POC se obtuvo información fetal, y el 20% resultaron no concluyentes por MCC. La tasa global de aneuploidía fue del 54,7%, principalmente monosomía X, trisomías 15, 16, 21 ó 22 y triploidía. No se detectaron aneuploidías para los cromosomas 1 y 19.

### Respecto a la edad materna:

En pacientes  $\leq 35$  años ( $31.7 \pm 3.2$  años) el 19,8% de los POC fueron MCC y el 37,2% de los POC de origen fetal fueron aneuploides. En  $>35$  años ( $38.8 \pm 2.0$  años), el 20,3% de los POC fueron MCC y el 49,6% aneuploides. La monosomía X y la trisomía 15 mostraron una diferencia estadísticamente significativa en función de la edad materna ( $p<0,05$ ). (Tabla 1)

### Respecto a la edad gestacional:

Se observó una disminución gradual de muestras POC con MCC con el aumento de la edad gestacional (29,4% en  $\leq 6$  semanas; 19,6% en  $7-\leq 12$  semanas; 1,2% en  $12-20$  semanas). La incidencia de resultado anormal fue mayor en los POC de  $7-\leq 12$  semanas (47,6%) que en los de  $\leq 6$  semanas (25,5%) y de  $12-20$  semanas (22,2%) ( $p<0,05$ , respectivamente).

### Respecto al procedimiento de recogida del POC:

La incidencia de POC en los que se obtuvo información fetal fue significativamente mayor en legrados convencionales que en abortos espontáneos (82,5% vs. 62,9%;  $p<0,05$ , respectivamente). No se detectó MCC en ningún POC obtenido mediante biopsia dirigida.

### Respecto al origen de la gestación:

Se observó una tendencia mayor de POC triploides en gestaciones espontáneas que en gestaciones de TRA (6,7% vs. 2,8%; NS).

## CONCLUSIONES:

Las anomalías cromosómicas justifican la pérdida gestacional espontánea en más de la mitad de los POC, principalmente en pacientes mayores de 35 años, siendo infrecuente en gestaciones superiores a semana 12. La monosomía X fue la aneuploidía más frecuente en pacientes  $\leq 35$  años, y la trisomía 15 la más frecuente en mayores de 35 años.

La informatividad del estudio depende en gran medida de la edad gestacional y el procedimiento de recogida del POC, siendo la presencia de tejido materno el principal factor limitante en POC de menos de 6 semanas.

## ¿ES NECESARIO SELECCIONAR MORFOLÓGICAMENTE CUANDO REALIZAMOS PGT-A?

L. Medrano López-Tello, Y. Galiana Briones, B. Ramos Mas, L. Van Os Galdós, J. Aizpurua  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

El objetivo principal de los tratamientos de reproducción asistida es seleccionar el embrión con mejor calidad para la transferencia con el objetivo de conseguir el nacimiento de un niño sano. La selección embrionaria ha ido evolucionando en los últimos años, pasando de ser únicamente morfológica a ser combinación de otros recursos como la cinética del desarrollo y euploidía tras PGT-A. En los últimos años, en la selección morfológica, se ha priorizado la selección de un buen trofoectodermo (TE) frente a una buena masa celular interna (MCI). En el caso de embriones euploides, también se sigue este criterio aun sabiendo que, la biopsia en estadio de blastocisto conlleva una alteración del TE que puede mermar su calidad y por lo tanto la selección embrionaria podría verse comprometida.

### OBJETIVO:

Estudiar la tasa embarazo bioquímico (EBQ) y la tasa de embarazo evolutivo (EE) en función de la calidad de MCI y TE en embriones euploides frente a embriones transferidos en diferido, con el objetivo de evaluar si el criterio de selección embrionaria primando el TE es extrapolable a embriones euploides.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo (entre 2019-2021) llevado a cabo en 1018 embriones, sin PGT-A (Grupo-A; N=465) y con PGT-A y euploides (Grupo-B; N=553) con transferencia en diferido de un embrión (tras vitrificación-desvitrificación), en los que se ha evaluado el impacto de la morfología embrionaria pre-vitrificación (Gardner et al, 1999) en EBQ (N=1018) y de EE (N=608). Los ovocitos (de donante y propios) fueron fecundados mediante ICSI y cultivados en medio único en incubador benchtop hasta día 5-6 de desarrollo. Para evaluar la morfología se comparó entre embriones con MCI tipo A (MCI-A) y los que no la tienen (MCI-NA), embriones con TE tipo A (TE-A) y los que no lo tienen (TE-NA) y embriones de muy buena calidad (AA, AB y BA) y los de buena calidad (BB y BC).

### RESULTADOS:

Los grupos de estudio (A y B) eran comparables tanto por edad ( $28,38 \pm 0,24$  vs  $28,56 \pm 0,24$  respectivamente;  $P=0,611$ ), como por la distribución en el origen de los ovocitos ( $P=0,177$ ). En cuanto a los resultados de EBQ, las tasas eran significativamente ( $P<0,001$ ) mayores si el embrión pertenecía al grupo-B (64,9%) frente al grupo-A (53,8%).

Al analizar la morfología del grupo-A, se observa que aquellos embriones que presentaban una MCI-A tenían unas tasas de EBQ similares ( $P=0,137$ ) a MCI-NA (MCI-A=57,3% vs MCI-NA=50,4%), pero unas tasas de EE significativamente mayores en embriones MCI-A que el resto (MCI-A=84,3% vs MCI-NA=73,6%;  $P=0,040$ ); en la evaluación del TE, aquellos TE-A presentaban similares tasas en EBQ que los TE-NA (58,2% vs 51,7% respectivamente;  $P=0,203$ ); y lo mismo sucedía para EE (TE-A=84,6% vs TE-NA=76,2%;  $P=0,132$ ). Al agrupar las calidades embrionarias en muy buena calidad y buena calidad se obtuvieron diferencias significativas en EBQ ( $P=0,036$ ) (54,1% vs 48,4% respectivamente) y en EE ( $P=0,022$ ) (83,9% vs 71,8%).

En el grupo-B, al analizar la MCI no se encontraron diferencias en EBQ (MCI-A=64,9% vs MCI-NA=64,7%;  $P=0,968$ ) ni en EE (MCI-A=78,7% vs MCI-NA=78,0%;  $P=0,884$ ). Respecto al TE, no se observaron diferencias en EBQ ni en EE (EBQ: TE-A=64,1% vs TE-NA=65,1%;  $P=0,834$ ; EE: TE-A=77,8% vs TE-NA=78,4%;  $P=0,894$ ); Por último, tampoco se encontraron diferencias en EBQ entre embriones de muy buena calidad y de buena calidad (64,9% vs 64,7% respectivamente;  $P=0,953$ ), ni en EE (76,6% vs 79,8% respectivamente;  $P=0,470$ ).

### CONCLUSIONES:

Según los resultados obtenidos en embriones euploides, biopsiados en D5-D6, la selección mediante morfología no es determinante y no se relaciona directamente con las tasas de EBQ y EE. Por otra parte, en el grupo de embriones sin PGT-A, la selección preferente por MCI permite una mejor selección embrionaria, y por tanto una mayor tasa de EE.

## ALTERACIÓN DEL CORPÚSCULO POLAR EN OVOCITOS DESVITRIFICADOS DE DONANTE COMO PREDICTOR DE VIABILIDAD EMBRIONARIA

J. Ballester Balaguer (1), L. Medrano López-Tello (1), B. Ramos Mas (1), L. Ortega López (1), J. Aizpurua (1)  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

La criopreservación de ovocitos humanos es una técnica de gran importancia que permite preservar la fertilidad en mujeres, ya sea por necesidad de ser sometidas a terapia gonadotóxica, cirugías ováricas, o incluso por motivos sociales. Actualmente no existen muchos indicadores que nos ayuden a evaluar las consecuencias moleculares que la vitrificación puede provocar en el ovocito. Una de las modificaciones más visibles que los ovocitos pueden sufrir en este proceso es la degeneración del corpúsculo polar. Éste puede llegar a ser uno de los parámetros que arrojen información acerca de la calidad ovocitaria tras la desvitrificación y la posibilidad de generar embriones de buena calidad.

### OBJETIVO:

El objetivo de nuestro estudio es valorar la posible relación entre la degeneración del corpúsculo polar tras la vitrificación frente a la tasa de fecundación y la tasa de formación de blastocisto de buena calidad.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Es un estudio de cohorte prospectivo en el que se han incluido un total de 504 ovocitos MII obtenidos de 41 donantes de entre 18 y 32 años. Previo a su uso los ovocitos fueron vitrificados y desvitrificados. Tras la desvitrificación, la degeneración del corpúsculo polar (CP) fue evaluada mediante un microscopio invertido inmediatamente antes de proceder a la realización del ICSI y se catalogaron en dos grupos según el estado de su 1er CP: CP degenerado (CPD) si el CP se visualizaba degenerado y CP íntegro (CPI) si no se observaban signos de degeneración en el CP. El cultivo embrionario hasta día 5-6 se realizó en incubador tipo Benchtop y con medio de cultivo continuo. La fecundación

se evaluó 18-20 h tras la ICSI y la calidad embrionaria se evaluó en estadio de blastocisto usando los criterios de clasificación de Gardner et al, 1999; considerando embriones útiles las siguientes calidades: AA, AB, BA, BB, AC, BC. El test estadístico empleado para analizar los datos fue el chi-cuadrado, la edad media de las donantes incluidas en el estudio se expresó como media y error estándar y la tasa de fecundación y de blastocisto se dieron como porcentajes.

### RESULTADOS:

Se analizaron un total de 504 ovocitos MII desvitrificados, obtenidos de 41 donantes con una edad media de  $24,48 \pm 3,82$ . La evaluación del primer CP distribuyó los ovocitos en dos categorías con los siguientes porcentajes: CPD 15,7% (n=79), CPI 84,3% (n=424). El análisis de la tasa de fecundación de los dos grupos de estudio indicó que, en CPD fecundaron un 70,9% (56/79) mientras que en CPI 74,1% (314/424), no siendo significativa la diferencia entre ellos (P=0,557). En cuanto a la tasa de formación de blastocisto, en el grupo CPD el 39,3% de los ovocitos fecundados llegaron a blastocisto útil (22/ 56), y en el grupo CPI llegaron un 37,6% de los ovocitos fecundados (117/314) no siendo significativa la diferencia entre los dos grupos de estudio (P=0,773).

### CONCLUSIONES:

A pesar de que el grupo que conforma los ovocitos con el corpúsculo degenerado es menor y que por lo tanto los grupos de estudio están desequilibrados, los hallazgos encontrados indican que esta característica morfológica, presente en 1 de cada 6-7 ovocitos, no tiene efecto en su capacidad fecundante ni en su tasa de llegada a blastocisto. Es por ello que estos ovocitos se pueden usar de la misma manera que se usan el resto de ovocitos cuyos corpúsculos permanecen intactos tras la desvitrificación.

## PATOLOGÍA ASOCIADA A FMR1: COMPLEJIDAD DE SU GESTIÓN EN EL ENTORNO DE FIV-PGT-M

CM. Armada Sánchez, E. Toro Toro, A. Gómez Duro, E. García Guixé, C. Giménez Sevilla  
Reprogenetics Spain - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

La patología asociada a FMR1 generalmente se debe a variaciones polimórficas de la repetición (CGG) en la región no traducida del extremo 5'. En función del número de repeticiones, los alelos se clasifican como: **normales** (~5-44), **intermedios** (45-54), **pre-mutados** (55-200) y **mutados** (>200). Solamente estos últimos causan el Síndrome de X-Frágil (FXS).

Los alelos pre-mutados pueden causar síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X-frágil (FXTAS), insuficiencia ovárica primaria asociada al cromosoma X-frágil (FXPOI) y desórdenes neuropsiquiátricos asociados a X-frágil (FXAND). Sin embargo, estos alelos son inestables y pueden expandirse de una generación a la siguiente pudiendo causar FXS, si la expansión alcanza la mutación completa.

La inestabilidad de la repetición, comúnmente observada en transmisiones maternas de alelos pre-mutados, está fuertemente influenciada por el **tamaño de la repetición** (a mayor tamaño, mayor riesgo de expansión) y por la **presencia de interrupciones AGG** (confieren estabilidad).

Actualmente, los estudios genéticos para FMR1 no solamente se realizan en individuos con antecedentes familiares o personales de la enfermedad, sino también para el estudio del fallo ovárico precoz o en el contexto de test de portadores en el ámbito de la reproducción asistida. El hallazgo de alelos intermedios y pre-mutados implica un asesoramiento genético reproductivo que puede resultar complejo y puede tener un impacto negativo en los deseos reproductivos de la pareja por sus posibles repercusiones clínicas.

En casos con un elevado riesgo de expansión de pre-mutación a mutación completa, el Test Genético Preimplantacional (PGT-M) para FXS es una estrategia alternativa al diagnóstico prenatal. Sin embargo, en el PGT-M no se recomienda el estudio de

repeticiones (CGG) en la muestra analizada porque no se puede descartar la presencia de mosaicismo en el alelo pre-mutado. Por ello, la estrategia diagnóstica se basa en un estudio de ligamiento que hace estrictamente necesario disponer de estructura familiar y que conlleva al descarte de embriones portadores del cromosoma a riesgo que podrían ser fenotípicamente sanos.

### OBJETIVO:

Clasificar los casos consultados en nuestro centro para trastornos asociados a FMR1 en un período de 3,5 años en función del riesgo de FXS para la descendencia y del procedimiento propuesto.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se revisan 23 casos en los que se estima el riesgo de FXS para la descendencia en función del número de repeticiones CGG, del número de interrupciones AGG (si disponible) y de la edad materna según descrito por Yrigollen y colaboradores (2014). Los procedimientos propuestos se clasifican en: 1) PGT-M no indicado, 2) PGT-M indicado y 3) PGT-M con autorización por parte del Departamento de Sanidad previo informe favorable de la CNRHA.

### RESULTADOS:

De los 21 casos analizados, 6 eran portadoras de un alelo intermedio a las cuáles se les comunicó que el PGT no estaba indicado porque se consideraba que no había riesgo de expansión a mutación completa. Catorce eran portadoras de una pre-mutación y 1 presentaba una mutación completa. De los 14 casos con pre-mutación, se consideró que en 5 el riesgo de expansión a mutación completa era bajo (entre 0 y 1,6%). Solo en estos casos se solicitó autorización a las autoridades competentes. A fecha de hoy aún no hemos recibido resolución para estos casos.



# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONES:

El asesoramiento genético reproductivo en pacientes portadoras de alelos pre-mutados para FMR1 puede resultar especialmente complejo cuando hay bajo riesgo de descendencia con FXS. La estrategia diagnóstica aplicada en estos casos para PGT-M descarta embriones portadores del cromosoma X a riesgo, sin distinción de embriones con posibles alelos pre-mutados o con mutación completa.

Por ese motivo se hace necesario establecer un árbol de decisiones/ protocolo de actuación para casos de pre-mutación donde, en función del riesgo, será necesario o no, solicitar autorización a las autoridades competentes para realizar un ciclo de PGT-M.

P-065 ▶

## ¿SON COMPARABLES LOS RESULTADOS DE LABORATORIO ENTRE OVOCITOS VITRIFICADOS Y FRESCOS EN CICLOS COMBINADOS PROPIOS EN EDADES AVANZADAS?

**L. Cascales Romero (1), L. Herrero Grassa (1), M. Aparicio González (1), A. Herencia Rivero (1), E. M de la Torre Pérez (1), J. Llacer Aparicio (2), J. Ten Morro (2), R. Bernabéu Pérez (2)**

(1) Instituto Bernabéu - Madrid (Madrid), (2) Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

Dentro del laboratorio de fecundación in vitro (FIV), la vitrificación de ovocitos es una técnica ampliamente utilizada. Hoy en día, las altas tasas de supervivencia la han convertido en una técnica de gran valor a la hora de abordar un ciclo de reproducción asistida. Históricamente ha permitido la preservación ovocitaria en pacientes jóvenes o la coordinación en los ciclos de ovodonación. Sin embargo, actualmente, observamos un aumento en su uso en pacientes de mayor edad o con reservas ováricas limitadas.

Está ampliamente descrito que la calidad ovocitaria se ve afectada por la edad por lo que aún con los buenos resultados obtenidos en ciclos con ovocitos vitrificados de pacientes jóvenes, generalizar su uso en pacientes de mayor edad puede crear ciertas dudas.

El aumento de este tipo de ciclos de acumulación ovocitaria con el fin de conseguir transferencia o embriones aptos para PGTA en nuestro centro nos ha hecho preguntarnos si las cohortes procedentes de ovocitos vitrificados nos aportan resultados similares a los frescos y por lo tanto se trata de una estrategia adecuada para este tipo de pacientes.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es valorar la eficiencia del ovocito vitrificado frente al fresco en ciclos combinados en los que la vitrificación ovocitaria se plantea como estrategia para aumentar el número de embriones finales y de esta forma incrementar la probabilidad de éxito.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo de 157 ciclos combinados (ovocito fresco + ovocito vitrificado) entre julio del 2019 y abril de 2021 en el que se analizaron 1680 ovocitos (10.7 ovocitos/ciclo). La edad media de las pacientes fue de 38.9 años. Las variables estudiadas fueron: tasa de fecundación, tasa de embrión de buena calidad en D+3 (A+B), tasa de embrión de buena calidad en D+5 (A+B) y tasa de embrión útil final (transferido + vitrificado). Además, se analizaron las tasas de fecundación y de embrión útil para las pacientes de  $\geq 40$  años (850 ovocitos). Los datos fueron analizados utilizando SPSS (versión 20.0, SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

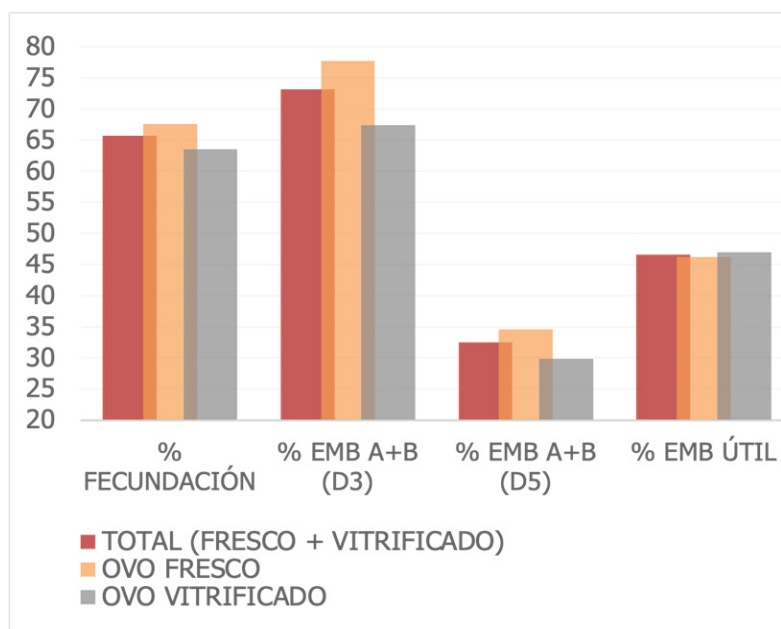
De los 1680 ovocitos, 1480 fueron aptos para microinyección (9.5 ovocitos /ciclo), se consiguieron 973 cigotos (6.3 cigotos / ciclo) y 453 embriones útiles finales (2.89 embriones / ciclo). La tasa de supervivencia tras desvitrificación fue del 94%. Ambos grupos (ovocito fresco vs ovocito vitrificado) mostraron unas tasas de fecundación (67.6% vs 63.49%;  $p=0.0958$ ), embrión de buena calidad en D+5 (34.55% vs 29.81%;  $p=0.1173$ ) y embrión útil final (46.25% vs 46.95%;  $p=0.8290$ ) similares. Sí que observamos diferencias estadísticamente significativas en la tasa de embrión de buena calidad en D+3 (77.7 vs 67.37  $p = 0.0003$ ) a favor del ovocito fresco. Al analizar los datos en pacientes de 40 años o más, encontramos unos resultados similares a los de la totalidad de la población estudiada inicialmente entre la cohorte de ovocitos vitrificados y frescos tanto en la tasa de fecundación (65.9% vs 61.3%;  $p=0.1999$ ) como de embrión útil (26.8% vs 25.2%;  $p=0.6055$ ), respectivamente.

## CONCLUSIONES:

Las tasas obtenidas son ligeramente inferiores en el ovocito vitrificado frente al fresco salvo en el caso de la calidad embrionaria en D+3 donde este detrimento es significativo en el caso del ovocito vitrificado. Sin embargo, dado nuestro protocolo de transferencia y vitrificación en estadio de blastocisto, este efecto no supone un perjuicio en el resultado final del ciclo. Aunque la población de estudio inicial ya es de edad avanzada, en pacientes mayores de 40 años la tasa de embrión útil disminuye, pero sin diferencias significativas entre grupos.

Por lo tanto, con nuestros resultados resulta plausible la estrategia de acumulación ovocitaria en estas pacientes con el fin de maximizar las posibilidades de éxito del ciclo de FIV.

**Figura.** Resultados de laboratorio o en ciclos combinados



## MEJORA EN LA SELECCIÓN EMBRIONARIA EN CICLOS SIN PGTA

**M. Velasco Álvarez (1), R. Fernández (1), M. Fernández (1), L. Ortega (2), E. Padilla (3), E. Rodríguez (1), J. Aizpurua (4)**

(1) IVF DONOSTIA - Donostia (Guipúzcoa), (2) IVF-SPAIN ALICANTE - Alicante (Alicante), (3) IVF-SPAIN MADRID - Madrid (Madrid), (4) IVF-LIFE - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

El estudio PGTA en los embriones, es sin duda, el único parámetro que actualmente nos ayuda a seleccionar de manera fiable aquellos embriones viables, que puede dar lugar a un niño sano en casa. Se sabe que las aneuploidías de los embriones aumentan con la edad materna, aun así, la probabilidad de tener embriones aneuploides en cualquier ciclo de óvulos propios, incluso en ovodonación, existe.

Son muchos los tratamientos que se realizan sin estudio genético de los embriones, debido a que no hay indicación médica o a que el coste del tratamiento se incrementa de forma considerable. En estos casos, en los que desconocemos la euploidia, la selección del mejor embrión para la transferencia se hace en base a otros parámetros, como la calidad morfológica del blastocisto, su día de desarrollo y la morfocinética, entre otros.

### OBJETIVO:

El primer objetivo de este estudio es, determinar si la probabilidad de presentar aneuploidías se relaciona con el día de biopsia o la calidad del blastocisto, independientemente a la edad del óvulo. Y el segundo objetivo es, valorar si estos criterios se pueden utilizar para realizar una mejor selección embrionaria en aquellos ciclos sin estudio PGTA.

### MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio retrospectivo, se han analizado un total de 934 ciclos con PGTA, 602 ciclos de óvulos propios con 1539 blastocistos y 332 ciclos de ovodonación con 1360 blastocistos. Las biopsias embrionarias se hicieron en D5 o D6 de desarrollo, analizadas por NGS, en blastocistos con hatching asistido. La calidad de los blastocistos se agrupó de la siguiente manera; calidad óptima AA, AB, BA, BB, y calidad subóptima AC, CA, BC, CB, CC.

El estudio estadístico de llevo a cabo mediante Chi cuadrado (se considera significativo con 1 grado de libertad y una  $p=0,05$ . El valor de Chi cuadrado deber ser  $>3,84$ ). Los grupos de estudio eran comparables.

### RESULTADOS:

Los resultados obtenidos para los tratamientos de óvulos propios, mostraron en D5, una tasa de euploidia significativamente superior comparando con D6, 49,18% vs 38,95% ( $\chi^2=16,31$ ) respectivamente. Estas diferencias en D5 y D6 también fueron significativas atendiendo solo a los blastocistos de calidad óptima 53,95% vs 47,40 ( $\chi^2=4,07$ ). No ocurre lo mismo con aquellos de calidad subóptima 32,39% vs 29,97% ( $\chi^2=0,32$ ). Al analizar la tasa de euploidia entre los blastocistos de calidad subóptima de D5 y calidad óptima de D6, las diferencias fueron significativas 32,39% vs 47,40% ( $\chi^2=11,11$ ) respectivamente, siendo mayor la euploidia en D6.

En cuanto a los resultados en ovodonación, no se observaron diferencias significativas en el total de blastocistos biopsiados en D5 y D6 73,09% vs 68,99 ( $\chi^2=2,73$ ), tampoco al diferenciarlos por calidades. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas en los blastocistos de calidad subóptima en D5 comparando con calidad óptima en D6 57,47% vs 71,76% ( $\chi^2=6,95$ ) respectivamente.

### CONCLUSIONES:

Actualmente en muchos centros, se prioriza la transferencia de blastocistos de D5 frente a D6. En general, los embriones de D5 presentan una probabilidad de ser euploides superior que los de D6. Sin embargo, no es suficiente con tener en cuenta el día de desarrollo del blastocisto. Un blastocisto de calidad subóptima de D5, presenta una probabilidad mayor de ser aneuploide que un blastocisto de calidad óptima de D6.

Con estos resultados, se puede concluir que priorizar siempre los blastocistos de D5 para la transferencia embrionaria, puede no ser la mejor opción. Ya que los blastocistos de D6 con calidades superiores a los de D5, tienen mayor posibilidad de dar lugar a un embarazo evolutivo, y por ende, a un niño sano en casa.

## IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS DE TRAZABILIDAD ELECTRÓNICOS EN LOS LABORATORIOS DE REPRODUCCION ASISTIDA

**JL. Gámez Prieto, M. Lierta Sancho, A. Millán García, A. Urries López**

Quirónsalud Zaragoza - Zaragoza (Zaragoza)

### INTRODUCCIÓN:

Año tras año, el número de pacientes que recurren a técnicas de reproducción asistida va aumentando en nuestro país, llegando a realizarse casi 150.000 ciclos en 2018 según los últimos datos publicados en el Registro SEF.

Como consecuencia de esta gran demanda, es casi imposible individualizar espaciotemporalmente cada proceso en nuestros laboratorios, lo que implica un riesgo de cometer errores en la trazabilidad de los gametos y embriones, como ya ha pasado en varios centros de distintos países en las últimas décadas.

Aunque el porcentaje de errores "conocidos" por ciclo es muy bajo, inferior al 0,05%, nuestro objetivo obligado debería ser el 0%.

Para intentar minimizar estos errores tenemos dos opciones, el "doble chequeo" que consiste en la comprobación de todos los pasos críticos de las técnicas de reproducción por parte de dos personas, o los actuales sistemas de trazabilidad electrónicos que realizan una comprobación electrónica y un registro informatizado.

Dado que la eficacia del doble chequeo ha sido cuestionada, ya que no elimina el error humano y acaba provocando continuas interrupciones y distracciones de los compañeros del trabajo, así como automatismos involuntarios, los nuevos sistemas electrónicos resultan ser una gran herramienta para minimizar al máximo este riesgo.

### OBJETIVO:

El objetivo del estudio fue comprobar en qué medida la integración de un sistema de trazabilidad detecta y previene errores críticos en un laboratorio de reproducción asistida.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo de 1450 ciclos de FIV, entre noviembre de 2018 y abril de 2021, en los que se hicieron 17.400 sesiones de escaneo mediante un sistema de trazabilidad electrónico (Gidget de Genea Biomedx). Una sesión de escaneo consiste en escanear la etiqueta del recipiente (tubos y placas) del que provienen los gametos o embriones y la etiqueta del recipiente al que van, quedando ambos enlazados.

El primer paso fue diseñar nuestro protocolo de trabajo en el sistema Gidget. El sistema asigna a cada paciente una etiqueta con código único para cada recipiente. Estas etiquetas son pegadas a los recipientes en los que vayamos a contener gametos o embriones. Fueron escaneados todos los procedimientos en los que había transferencia de gametos o embriones de un recipiente a otro. El sistema trabaja enlazando estos escaneos para monitorizar y registrar la trazabilidad.

El sistema alerta de dos tipos de error:

- No críticos: escaneo de una misma etiqueta para un procedimiento ya realizado o desviación del flujo de trabajo dentro de un mismo ciclo.

- Críticos: enlazado de etiquetas de distintas pacientes.

Si el sistema detecta que vas a cometer un error crítico, se bloquea y no deja seguir con el procedimiento hasta que es desbloqueado por un supervisor.

### RESULTADOS:

Durante el estudio, de los 17.400 escaneos, el sistema avisó de 33 posibles errores "no críticos" (0,18%) y de ningún error "crítico" (0%). Todos los avisos de un futuro error fueron por un escaneo de etiqueta para un procedimiento ya realizado.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONES:

En base a nuestros resultados, comprobamos que la probabilidad de error es prácticamente inexistente, siendo 0% la tasa de avisos de errores críticos tras más de 17.000 sesiones de escaneo. A pesar de ello, nuestro margen de error no debería ser nunca superior al cero absoluto, por

ello, si disponemos de una herramienta que nos advierta de un futurible error antes de que suceda, opinamos que ha sido muy satisfactoria su incorporación, ya que no solo genera un informe garantizando la trazabilidad de cada muestra, sino que, además, certifica con total transparencia el proceso, generando así confianza, tanto en los pacientes como en los profesionales.

P-068 ▶

## TIME LAPSE, MORFOCINÉTICA Y PLOIDÍA EMBRIONARIA

**R. López Sánchez (1), P. Alberola Cerdán (2), M. Poveda García (1), A. Aragonés Esteve (1), E. Moya Gutiérrez (1), JM. Moreno García (1), R. Nuñez Calongue (2), JJ. López Gálvez (1)**

(1) Unidad de Reproducción Clínica Vistahermosa - Alicante (Alicante), (2) Unidad de Reproducción Clínica Moncloa - Madrid (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

El uso de incubadores con la tecnología time lapse, ha permitido obtener una mejora en los resultados de las técnicas de fecundación in vitro.

Esto es debido a que nos proporciona una ventaja principal respecto al uso de los incubadores convencionales, ya que ofrece la posibilidad de analizar el desarrollo embrionario completo, mediante videos que recogen todos los fenómenos morfológicos y cinéticos del desarrollo del embrión, además de mantener las condiciones de cultivo intactas puesto que no hay necesidad de que los embriones salgan del incubador en ningún momento.

De este modo, el uso de esta nueva tecnología, nos permite recabar una gran cantidad de información muy valiosa a la hora de seleccionar los embriones con mayor potencial de implantación, además de ayudarnos a clasificarlos en base a los criterios morfológicos y cinéticos.

## OBJETIVO:

En este estudio se quiso estudiar los tiempos de división celular y relacionarlos con la categoría morfológica embrionaria; intentar relacionar cinética embrionaria con euploidía y extrapolar los datos a otros embriones con alto potencial de implantación (tipo A,B).

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se han utilizado dos incubadores (GERI y EMBRYOSCOPE) ambos, sistemas Time Lapse.

Se observó la morfocinética de 152 embriones, donde medimos el tiempo que tardan en ocurrir los diferentes eventos fundamentales en el desarrollo embrionario, (promedio de aparición de PN,T2-T8), la sincronía de los ciclos celulares (CC2,CC3) y así comparamos estos tiempos entre las diferentes categorías morfológicas. Además evaluamos de la misma manera, la cinética de 69 embriones que se les había realizado un análisis genético preimplantacional (PGT-A) y también se calculó el tiempo en que tardaban en realizar los diferentes ciclos celulares (CC1,CC2,CC3) y la sincronía de los mismos, de los embriones con categoría A y de aquellos embriones Euploides y Aneuploides.

## RESULTADOS:

La desaparición de PN se produce antes en embriones tipo (A,B), así como el promedio de división de 2 hasta 8 células es más temprano en embriones de mejor pronóstico, comenzando el CC2 entre las 10h y 11h y 30min post inseminación, y el CC3 entre las 12h y 14h post inseminación, siendo ambos ciclos celulares muy sincrónicos. Al observar la cinética de los embriones analizados genéticamente, el parámetro que más se diferencia entre euploides vs aneuploides es la sincronía celular, siendo 44% más sincrónicos los embriones euploides. Al extrapolar los datos del CC2 y CC3 de los embriones tipo (A,B) observamos que se encuentran dentro del rango de tiempo estudiado de los embriones euploides.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONES:

Al conocer la cinética y sincronía de los ciclos celulares de los embriones estudiados, y observar que los de mayor potencial de implantación se mueven en unos tiempos determinados,

siendo además coincidentes con los tiempos de división en euploides, se podrían utilizar como otro dato a tener en cuenta a la hora de elegir que embrión debemos transferir.

P-069 ▶

## ¿DEBERÍAMOS HACER ECLOSIÓN ASISTIDA TRAS DESVITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS?

**I. Cuevas Saiz, C. Olmedo Illueca, A. Pérez Esteban, P. Pascual Utiel, S. Royo Bolea, L. Abad Velasco.**

Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

El proceso de vitrificación puede producir cambios en la zona pelúcida de ovocitos y embriones, como el endurecimiento de la misma. Hay controversia en la bibliografía sobre el efecto de la eclosión asistida (EA) en el potencial de implantación del embrión. Existen distintos modos de realizar la EA: química, mecánica o mediante láser, siendo la última de ellas la menos dañina para el embrión.

## OBJETIVO:

Valorar el impacto de la EA en el resultado clínico de los ciclos de transferencia de embriones criopreservados.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Realizamos un análisis retrospectivo de los datos obtenidos de 329 transferencias únicas de blastocistos criopreservados en soporte Cryotip® procedentes de 226 pacientes que realizaron primer o segundo ciclo de fecundación in vitro entre septiembre de 2015 y octubre de 2020.

La EA se llevó a cabo mediante laser Lykos® (Hamilton Thorne, USA) realizando un orificio de 1/8 a 1/4 de la zona pelúcida tras la desvitrificación.

El estudio se dividió en 2 grupos en función de si se realizó o no EA tras la desvitrificación. Aquellos a los que se realizó EA (grupo 1; n=187) o sin realizar EA (grupo 2; n=142). La desvitrificación de los embriones se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante (Irvine Scientific, USA). El análisis estadístico se

hizo mediante SPSS (V25.0, IBM Statistics), usando t-Student para encontrar diferencias en la tasa de embarazos bioquímicos, clínicos y abortos bioquímico y clínico entre ambos grupos. Además, se tuvo en cuenta la calidad embrionaria siguiendo la clasificación propuesta por ASEBIR y la edad de las pacientes.

## RESULTADOS:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los embarazos bioquímicos (test de embarazo positivo) entre grupos, siendo para el grupo 1 de 52.4% (98/187) vs grupo 2 de 41.5% (59/142) aunque no había diferencias en cuanto a la calidad embrionaria. Sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas en el embarazo clínico entre el grupo 1 y 2 siendo el p-valor de 0.035. El aborto bioquímico no tuvo diferencias significativas entre grupos (grupo 1 12.2% (12/98) vs grupo 2 5.1% (3/59). El aborto clínico tampoco tuvo diferencias significativas entre grupos siendo 33.9% en el grupo 1 y 24.4% en el grupo 2. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad media de la mujer en el momento de la vitrificación entre grupos, siendo la edad en el grupo 1 ( $35.8 \pm 3.8$  años) frente a ( $34.3 \pm 3.8$  años) en el grupo 2.

## CONCLUSIONES:

Nuestros resultados muestran que aplicar la EA a todos los embriones que desvitrificamos podría ayudarnos a aumentar la tasa acumulada de embarazo.

Una de las limitaciones del estudio es el reducido número de ciclos de transferencia de embriones vitrificados incluidos en el estudio. El tamaño muestral debería aumentarse para confirmar estos resultados.

## IMPLICACIÓN CLÍNICA DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN DE EMBRIONES VITRIFICADOS

Á. Linares Bernabéu (1), N. Ruiz Espinosa (1), J. Bartolomé García (1), JA. Ortiz Salcedo (2), J. Ten Morro (3), L. Luque Martínez (1), R. Bernabéu Pérez (3)

(1) Instituto Bernabéu - Albacete (Albacete), (2) Instituto Bernabéu Biotech - Alicante (Alicante), (3) Instituto Bernabéu Alicante - Alicante (Alicante)

### INTRODUCCIÓN:

La criopreservación embrionaria se ha convertido en uno de los aspectos fundamentales de las técnicas de reproducción asistida humana, optimizando la tasa de embarazo acumulada. Es por ello que surge la necesidad de estudiar el impacto de las condiciones a las que se ve sometido el embrión hasta ser transferido al útero materno sin que se vea comprometida su viabilidad por el paso del tiempo.

El éxito de esta técnica requiere de concentraciones elevadas de crioprotectores y periodos extremadamente reducidos de enfriamiento y calentamiento. Sin embargo, pocos estudios han explorado la influencia del tiempo que permanece vitrificado el embrión a  $-196^{\circ}\text{C}$ , manteniendo inactivo su metabolismo celular, sobre los resultados clínicos.

### OBJETIVO:

El propósito de este estudio consiste en establecer y analizar la relación entre el tiempo que permanece el embrión vitrificado en tanques de nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  hasta que es transferido y los resultados clínicos del tratamiento.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo de cohortes realizado entre julio de 2017 y junio de 2020 en pacientes sometidas a ciclos de Fecundación In Vitro (FIV). Se incluyeron 2393 tratamientos de ovodonación y transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido. Se excluyeron aquellas pacientes con patología uterina, ciclos con espermatozoides procedentes de testículo y ciclos de diagnóstico genético preimplantacional. El estudio valoró la asociación entre el tiempo que permanece criopreservado el embrión previo a la transferencia y el éxito del ciclo en términos de: B-hCG positiva ( $>5$  mUI/mL) en suero sanguíneo, gestación clínica, aborto clínico y recién nacido vivo.

La vitrificación y desvitrificación embrionaria se realizó empleando el protocolo y medios de Irvine Scientific® (Fujifilm IrvineScientific) en soporte cerrado HSV (Cryo Bio System).

El cultivo de los embriones se llevó a cabo en incubadoras tipo benchtop al 7.2%  $\text{CO}_2$ , 6%  $\text{O}_2$  y 86.8%  $\text{N}_2$ , en medio de cultivo Global Total® (Cooper Surgical) suplementado con seroalbúmina humana (HSA, SAGE media) al 5%.

El tiempo que permanece criopreservado el embrión como predictor de los resultados clínicos de la FIV se evaluó mediante una regresión logística binaria corregida por calidad embrionaria (A, B o C), día de desarrollo del blastocisto (día 5 ó 6), tipo de ovocito donado (fresco/congelado) y origen seminal (cónyuge/donante y fresco/congelado). Se empleó el paquete estadístico SPSS 20.0.

### RESULTADOS:

La edad media de las pacientes receptoras de ovodonación fue de  $42.46 \pm 4.11$  años. Asimismo, la edad media de las donantes de ovocitos fue de  $24.91 \pm 3.39$  años. El tiempo medio de almacenamiento fue de  $180.47 \pm 177.36$  días desde que se criopreserva hasta que se desvitrifica el blastocisto.

Los resultados clínicos de los ciclos de FIV fueron: 41.9% B-hCG en suero positiva, 34.6% gestación clínica, 9.7% aborto clínico y 24.9% recién nacido vivo. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo que permanecieron los embriones almacenados y la B-hCG positiva (OR=0.999, IC 95% [0.999-1.000],  $p=0.081$ ), la gestación clínica (OR=1.000, IC 95% [0.999-1.000],  $p=0.241$ ), el aborto clínico (OR= 1.000, IC 95% [0.998-1.001],  $p=0.572$ ), y la tasa de nacido vivo (OR= 1.000, IC 95% [0.987-1.015],  $p=0.872$ ).

Dada la relevancia del parámetro recién nacido vivo, se establecieron cuartiles para el tiempo de almacenamiento. La tasa de B-hCG positiva fue: primer cuartil ( $\leq 52$  días) del 41.5%, segundo cuartil (53-113 días) del 45.9%, tercer cuartil (114-241 días) del 43.1% y cuarto cuartil ( $> 241$  días) del 40.4% ( $p=0.345$ ).

### CONCLUSIONES:

Los sistemas de almacenamiento actuales permiten una conservación embrionaria en condiciones estables que no afectan a los resultados clínicos posteriores. A pesar de la corrección por calidad embrionaria efectuada en el análisis, se requeriría de estudios prospectivos más amplios que incluyan cohortes homogéneas para corroborar nuestros resultados.

## DOES THE SITE OF SPERM PRODUCTION INFLUENCE IVF/ICSI CYCLE OUTCOME?

**E. Sevillano Martínez, M. Vergés Da Palma, R. Bravo Martín, C. Morán, H. Arce**  
ReproMed - Dublin (Ireland)

### INTRODUCTION:

According to the World Health Organization (WHO) manual 5th Edition 2010, semen samples may be collected at home only in exceptional circumstances. This is in order to limit the exposure of the semen to unfavorable conditions during transportation and to control the time between semen collection and processing prior to the insemination of oocytes. The emergence of the Covid-19 pandemic in 2020 forced ART clinics to limit the number of patients attending. At ReproMed, on-site semen production rooms were considered high-risk due to their small size and lack of adequate ventilation measures. For this reason, off-site production became mandatory for all semen samples. Patients were given clear instructions on semen collection and transportation and semen samples were brought to the clinic by the female partner.

### OBJECTIVE:

Studies have found that less psychological stress is experienced by patients when they are allowed to produce the semen sample off-site. Semen samples produced in a non-clinical environment have statistically significantly higher values for sperm concentration, total sperm count, rapid progressive motility and total count of progressive motility<sup>1, 2</sup>. It is still unclear whether collecting semen samples at home has any influence on IVF/ICSI cycle outcomes.

The aim of this study is to perform a retrospective analysis of Semen Analysis data at ReproMed and to evaluate whether the site of sperm production influences IVF/ICSI cycle fertilisation and embryo utilisation rates.

### MATERIAL AND METHOD:

This retrospective cohort study was performed at ReproMed Dublin from January 2019 to April 2021. All IVF/ICSI cycles where

fresh ejaculated semen samples were collected and processed for insemination were included in this study. Cycles were grouped according to site of semen sample collection and were defined as 'off-site' if the sample was not produced at the clinic or 'on-site' if the sample was produced in the clinic. Cycle outcomes, in terms of fertilization rate, poor fertilization/failed fertilization rate (cycles in which <25% of inseminated oocytes were fertilized) and embryo utilization rate were evaluated.

### RESULTS:

Altogether, there were 867 cycles with at least one oocyte inseminated. The median female age was 37 years, and the median number of oocytes obtained per cycle was 10.

There were 433 cycles where semen samples were collected on-site and 434 cycles where semen samples were collected off-site.

The fertilisation rate was slightly higher in cycles where the semen sample was produced off-site when compared with those where the sample was produced on-site (63.15% versus 58.22%,  $p$  0.9520 in conventional IVF cycles; 63.44% versus 61.75%,  $p$  0.4525 in ICSI cycles). Additionally, the poor fertilization rate was lower in cycles where the sample was produced off-site when compared with those where the sample was produced on-site (8.90% versus 13.33%,  $p$  0.3146 in conventional IVF cycles; 7.99% versus 13.06%,  $p$  0.194 in ICSI cycles). However, the differences were not statistically significant.

An increased embryo utilization rate was observed in cycles where the semen sample was produced on-site when compared with those where the sample was produced off-site, however, the results did not reveal any statistically significant difference between the groups (51.00% versus 52.07%,  $p$  0.6621 in conventional IVF cycles; 45.53% versus 42.72%,  $p$  0.2422 in ICSI cycles).



# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONS:

Although no statistically significant differences were found, the results of this study indicate that collecting semen samples off-site does not negatively affect the fertilization rate, poor fertilization/failed fertilization rate or embryo utilization rate of IVF/ICSI cycles. Unfortunately, due to the timeframe involved it is not yet possible to determine whether the site of semen sample collection has any influence on the pregnancy, miscarriage and live birth rate.

## BIBLIOGRAPHY:

1. Elzanaty, S. et al. (2008). *Comparison of semen parameters in samples collected by masturbation at a clinic and at home. Fertility and Sterility, Volume 89, Issue 6, 1718 – 1722.*
2. Clarke, R. et al. (1999). *Relationship between psychological stress and semen quality among in-vitro fertilization patients. Human Reproduction 14 (3): 753-758.*

P-072 ▶

## IMPORTANCIA DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN LA TASA DE GESTACIÓN

**J. Muñoz Ramírez, M. López Rodríguez, B. Rojas Ruiz, ME. Santiago Alonso, M. Martín Gutiérrez, M. Sánchez-Dehesa Rincón**  
HM IMI Toledo - Toledo (Toledo)

## INTRODUCCIÓN:

Desde los comienzos de la FIV, el seminograma básico ha sido una herramienta fundamental en el diagnóstico del varón. Sin embargo, llevamos mucho tiempo intentado ampliar este estudio del varón con diferentes pruebas como los estudios de meiosis, el FISH o la fragmentación del ADN espermático.

La fragmentación del ADN puede ser de cadena simple o de cadena doble. La fragmentación de cadena simple es reparable por la maquinaria citoplasmática del ovocito, por el contrario, la de cadena doble no se puede reparar.

Diversos artículos han demostrado una correlación entre la fragmentación de doble cadena y las posibilidades de embarazo y aborto tanto in vivo como in vitro.

## OBJETIVO:

Determinar si la fragmentación de doble cadena del ADN espermático influye en las tasas de gestación, aborto y recién nacido vivo.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Desde 2019 estamos solicitando en nuestro centro el estudio de fragmentación de doble cadena mediante Comet

(CIMAB) observando una elevada proporción de varones con fragmentación elevada. En concreto se estudiaron 219 muestras de semen y el 75 % de ellas presentaban fragmentación de doble cadena elevada (165 casos). Indicamos este estudio en fallos de implantación, en abortos de repetición y en varones fumadores u obesos.

Viendo la elevada incidencia de la fragmentación alterada, proponemos cada vez más este estudio intentando estudiar a todos los varones que acuden a nuestro centro.

El CIMAB estudia los espermatozoides mediante Comet Fertility diferenciando la fragmentación de cadena sencilla y de cadena doble, estableciendo un punto de corte en el 60% para esta última.

Se comparan los ciclos de FIV/ICSI y sus correspondientes criotransferencias de pacientes con fragmentación alterada frente a aquellos con fragmentación normal durante los años 2019 y 2020. Para el estudio estadístico de los datos se usa el SPSS.

## RESULTADOS:

Se analizaron un total de 219 ciclos de transferencias de 1 único blastocisto (FIV /ICSI + criotransferencias). En 57 ciclos los embriones transferidos provenían de varones con fragmentación alterada y en 162 ciclos provenían de varones con fragmentación normal.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

Los resultados se exponen a continuación:

	FRAGMENTACIÓN ELEVADA			FRAGMENTACIÓN NORMAL		
%beta positiva	30	57	52,6 %	100	162	61,7 %
% Embarazo Clínico	25	57	43,8 %	85	162	52,5 %
% aborto	9	25	36 % *	10	85	11,8 % *
% RNV	16	57	28,1 % *	75	162	46,3 % *

P<0.05. Diferencias estadísticamente significativas

## CONCLUSIONES:

La fragmentación de doble cadena influye negativamente en todos los parámetros estudiados. Encontramos significancia estadística en la tasa de aborto (casi la triplica) y en la tasa de recién nacido vivo (RNV).

Por tanto, sugerimos que el estudio de la fragmentación de cadena doble en espermatozoides debería ser una técnica

de rutina en el estudio del varón para así, obtener un mejor diagnóstico y pronosticar mejor las posibilidades reproductivas de las parejas.

Asimismo, se pueden indicar diferentes tratamientos al varón para disminuir la fragmentación de doble cadena: dieta, ejercicio, complementos alimenticios (cúrcuma...), Fertile Chip, MACS....

P-073 ▶

## USO DEL ALGORITMO KIDSCORE DE EMBRYOSCOPE PARA PRONOSTICAR EMBARAZO Y PLOIDÍA.

**J. Muñoz Ramírez, B. Rojas Ruiz, M. López Rodríguez, ME. Alonso Santiago, M. Martín Gutiérrez, M. Sánchez-Dehesa Rincón**  
HM IMI Toledo - Toledo (Toledo)

## INTRODUCCIÓN:

Una de las labores más importantes del embriólogo consiste en seleccionar el mejor embrión para transferir. Para ello, tradicionalmente usamos criterios de evaluación morfológica (ASEBIR), y más recientemente, criterios morfocinéticos basados en la tecnología Time-lapse.

Estos parámetros se basan en anotar los tiempos en los que ocurren los principales eventos del desarrollo embrionario: desaparición de pronúcleos, divisiones celulares, formación del blastocisto, etc

Embryoscope ha desarrollado un Score embrionario valorando los parámetros morfocinéticos con los datos de implantación

de miles de embriones (Known Implantation Data. KID). De este modo el KIDSCORE evalúa los embriones del 1 al 9.9 donde a mejor puntuación mayor potencial de implantación.

## OBJETIVO:

Valorar si el algoritmo KIDSCORE de Embryoscope (Vitrolife) nos ayuda a seleccionar los mejores embriones a transferir para conseguir gestación y también a predecir su ploidía en casos de PGT-a.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudiamos el valor pronóstico del KIDSCORE en 3 grupos diferentes:

# COMUNICACIONES PÓSTERS

Pacientes de ovocitos propios. Analizamos transferencias de embrión único (SET) de 57 embriones de pacientes de ovocitos propios de los que 37 implantaron y 20 no (tasa de implantación = 64,9%)

Pacientes receptoras de ovocitos donados. Se estudian SET de 42 embriones de ovodonación de los que 30 implantaron y 12 no (Tasa de implantación = 71,42 %)

Pacientes de diagnóstico genético preimplatacional (PGT-a). Valoramos los resultados de 131 embriones biopsiados y analizados mediante NGS (Genality, Reprogenetics). 46 embriones fueron euploides, 68 aneuploides y 19 mosaicos. Los embriones mosaicos se descartaron de este estudio.

Los resultados se analizan mediante t-student con SPSS.

## RESULTADOS:

A continuación, se exponen las medias y desviaciones estándar (SD) de los parámetros morfocinéticos, así como del KIDSCORE.

En el grupo de ovocitos propios vemos diferencias significativas en t2, t3, t5, t6, t7 y en el KIDSCORE.

En el grupo de ovodonación no se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados.

En el grupo de PGT-a se ven diferencias significativas en tB (tiempo de blastocisto) y en el KIDSCORE.

	tPNf	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	tsB	tB		SCORE
<b>Propios +</b>	22,93	25,25*	36,36*	38,24	49,12*	51,15*	53,13*	57,04	95,18	105,33	<b>media</b>	7,06*
	3,12	3,08	4,47	4,42	5,95	5,66	7,01	10,06	13,29	7,27	<b>SD</b>	1,51
<b>Propios -</b>	24,60	27,77*	40,18*	40,91	53,35*	56,03*	58,45*	61,57	101,41	109,41	<b>media</b>	5,67*
	4,03	5,21	8,03	8,03	9,61	10,80	12,18	13,06	9,85	8,87	<b>SD</b>	1,73

<b>Ovodon +</b>	22,97	25,45	36,60	37,59	48,46	50,45	51,99	54,33	97,83	104,50	<b>media</b>	7,29
	2,45	2,54	3,10	2,71	4,92	3,84	3,74	4,88	7,31	6,95	<b>SD</b>	1,59
<b>Ovodon -</b>	22,93	25,45	36,77	38,13	49,15	50,24	52,77	55,42	102,61	109,65	<b>media</b>	6,77
	2,86	2,71	3,52	3,43	4,46	4,25	3,53	4,89	9,40	9,34	<b>SD</b>	1,73

<b>Euploide</b>	22,67	25,24	36,13	37,63	49,35	51,95	55,45	57,68	96,57	104,07*	<b>media</b>	6,47*
	2,63	2,68	4,04	3,78	5,69	6,07	7,50	7,81	5,98	6,47	<b>SD</b>	1,68
<b>Aneuploide</b>	22,72	25,15	36,10	37,41	48,90	51,55	53,80	57,83	98,39	107,75*	<b>SD</b>	5,63*
	2,28	2,29	3,83	3,38	6,29	5,82	6,31	8,05	9,03	9,67	<b>media</b>	1,84

\*P<0.05. Diferencias estadísticamente significativas

## CONCLUSIONES:

En cuanto a la morfocinética, los embriones de ovocitos propios que implantan se dividen más rápido que los que no implantan, hallando diferencias significativas en t2, t3, t5, t6 y t7. En las pacientes de ovodonación en ritmo de división es indistinguible entre embriones que implantan y aquellos que no. Los embriones de PGT-a tienen un mismo ritmo de división hasta tB en el que se ve que los embriones

euploides alcanzan este estadio más rápido que los embriones aneuploides.

El KIDSCORE es un buen predictor de implantación en pacientes de ovocitos propios. Asimismo, parece que podría predecir ploidía en pacientes de PGT-a. Será necesario ampliar la n para corroborar estos resultados.

## H2AX COMO MÉTODO DE DETECCIÓN DE ROTURA DE DOBLE CADENA. COMPARACIÓN CON COMETA NEUTRO.

**B. Rojas Ruiz (1), V. Vila Del Sol (2), M. López Rodríguez (1), J. Muñoz Ramírez (1), A. Marquina Rodríguez (2), ME. Alonso Santiago (1), A. Yoldi Chaure (3), JA. Castilla Alcalá (3), M. Martín Gutierrez (1), M. Sánchez-Dehesa Rincón (1)**

(1) HM IMI TOLEDO - Toledo (Toledo), (2) Hospital Nacional de Parapléjicos - Toledo (Toledo), (3) CEIFER Biobanco - Granada (Granada)

### INTRODUCCIÓN:

Las alteraciones a nivel molecular en el espermatozoide (Fragmentación ADN y Aneuploidías), juegan un papel muy importante en la esterilidad de origen masculino.

Se asocian estas alteraciones a fallos de implantación, abortos y desarrollo embrionario alterado.

La fragmentación del ADN espermático puede deberse a múltiples causas y podemos encontrar fragmentación de cadena sencilla o de cadena doble, siendo ésta la de mayor repercusión reproductivamente hablando. Actualmente se emplea el cometa Neutro y Alcalino, para diferenciar ambas fragmentaciones.

La fosforilación de la Histona H2AX (gH2AX), se ha descrito como un marcador de daño de doble cadena. Está implicada en la llamada "cadena de respuesta ante rotura", mecanismo celular para la identificación y reparación del daño. Dicha fosforilación puede ser determinada mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo específico.

### OBJETIVO:

Determinación por citometría de flujo, de la gH2AX como parámetro de identificación de fragmentación de doble cadena en espermatozoides.

Comparación de los resultados obtenidos con los aportados por el Comet Neutro (CIMAB)

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se emplean dos poblaciones diferentes para el estudio:

Donantes con fertilidad probada (CEIFER BIOBANCO) N=18. Dichos donantes tienen el número máximo de recién nacido vivo, permitido por la ley, por lo que se toman como población sana.

Pacientes de reproducción asistida N= 37

Para el marcaje de gH2AX la Histona, se emplea un anticuerpo específico de Biolegend. El análisis se realiza con el citómetro Cytoflex S (Beckman Coulter). El protocolo empleado, ha sido puesto a punto a partir del descrito por (Zhong H et al, 2015).

El diagnóstico de los pacientes infértiles mediante cometa, es el realizado por CIMAB/España.

Establecemos tres grupos dentro de los pacientes infértiles según los resultados del cometa: Pacientes No fragmentados (n=15), pacientes fragmentados doble cadena (n=18) y doblemente fragmentados (positivos en cometa neutro y alcalino) (n=4).

### RESULTADOS:

Existen diferencias significativas entre los valores de gH2AX encontrados en donantes (12.3%), frente a los pacientes infértiles (15.10%)  $p=0.011$

Cuando comparamos los valores obtenidos en donantes (12.3%), mediante nuestra técnica, con aquellos obtenidos en los pacientes con fragmentación de doble cadena (15.6%), las diferencias también son estadísticamente significativas ( $p=0.043$ ).

De igual modo, ocurre cuando añadimos los doblemente fragmentados (23.58%) ( $p=0.025$ )

Si comparamos los donantes con los pacientes no fragmentados (13.8%), no existen diferencias significativas indicando, por tanto, que son similares a los donantes

Sin embargo, los valores obtenidos de gH2AX mediante citometría de flujo, en los pacientes no fragmentados (13.8%), no presentan diferencias significativas con los valores de pacientes fragmentados de doble cadena (15.6%).

De igual modo, no existe correlación entre el porcentaje de espermatozoides positivos para gH2AX y el porcentaje de espermatozoides alterados que arroja el cometa neutro.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONES:

La determinación de gH2AX por citometría es un método útil para diferenciar pacientes infértiles de pacientes sanos.

La existencia de diferencias significativas en el marcaje de gH2AX entre los diferentes grupos establecidos por cometa neutro y donantes con fertilidad probada, apoya la teoría de su uso como método de diagnóstico.

Ahora bien, la no existencia de diferencias entre el grupo de no fragmentados y de fragmentados determinados por cometa neutro, puede explicarse por la gran variabilidad en los datos del primer grupo, haciendo necesario la ampliación de la N para homogeneizar la muestra.

La no correlación entre el porcentaje de gH2AX + y el porcentaje de espermatozoides fragmentados por cometa neutro, nos podría estar indicando orígenes distintos de la fragmentación de doble cadena con, posiblemente, repercusiones reproductivas diferentes. De igual modo, es necesario ampliar la N.

## BIBLIOGRAFÍA:

Hui-zhi Zhong, M.D et al., *Evaluating gH2AX in spermatozoa from male infertility patients. Fertil and Steril*, 2015. vol 104(3) 574-581

P-075 ▶

## ¿SIRVE NUESTRO ACTUAL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA PARA DETECTAR ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS?

**M. Lierta Sancho, JL. Gámez Prieto, A. Millán García, A. Urries López**  
Quirónsalud Zaragoza - Zaragoza (Zaragoza)

## INTRODUCCIÓN:

Las aneuploidías son una de las principales causas de fracaso en los ciclos de reproducción asistida. Sabemos que aproximadamente un 60% de los embriones que se generan in vitro son aneuploides, produciendo así bloqueo embrionario, fallos de implantación y abortos de repetición, teniendo que recurrir a una técnica invasiva como es el test genético preimplantacional (PGT-A) para poder solventar estos problemas.

El desarrollo de nuevos métodos más precisos de selección embrionaria está permitiendo mejorar los resultados de los tratamientos de fecundación in vitro ya que en la mayoría de los laboratorios se están utilizando algoritmos que predicen la capacidad de implantación de los embriones basándose en eventos morfocinéticos.

En nuestro laboratorio seleccionamos los embriones mediante un árbol de decisión que combina la clasificación morfológica de ASEBIR y unos eventos cinéticos basados en los tiempos

de división de los embriones, clasificándolos en alto poder de implantación (HIGH), medio (MEDIUM) o bajo (LOW).

## OBJETIVO:

El objetivo del presente estudio es comprobar si nuestro actual sistema de clasificación embrionaria basado en eventos morfocinéticos y validado en nuestro laboratorio, podría ayudarnos a predecir embriones aneuploides y así evitar que sean transferidos.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo en el cual hemos estudiado 35 pacientes que se someten a un ciclo de FIV+PGT-A en nuestro centro. La indicación para la realización del PGT-A fue: 20 pacientes presentaban edad materna avanzada ( $\geq 38$  años), 6 pacientes fallos de implantación (+6 embriones transferidos sin gestación) y 9 pacientes abortos de repetición ( $\geq 2$  abortos). La edad media de las pacientes era 39,7 años.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

Analizamos 134 embriones, clasificándolos en HIGH (tasa de implantación por embrión entre 50%-70%), MEDIUM (tasa de implantación por embrión entre 30%-40%) y LOW (tasa de implantación por embrión entre 15%-10%) según eventos morfofocinéticos utilizados en la clasificación embrionaria en nuestro laboratorio.

## RESULTADOS:

Se estudian 134 embriones de los cuales el 77% (n= 103) presentaron aneuploidías cromosómicas y un 23% (n=31) era euploides.

Si analizamos los resultados de aneuploidías según su capacidad "teórica" de implantación, los embriones que según su morfofocinética deberían ser de alto poder de implantación (HIGH) (n=93) tan sólo un 25% de ellos eran euploides (n=23), los de tasa de implantación media (MEDIUM) (n=21) eran euploides un 19% (n=4) y los de baja (LOW) (n=20) un 20% (n=4).

Si el análisis lo realizamos por edades, aquellas pacientes con edades menores a 38 años y embriones HIGH presentan un porcentaje de embriones euploides del 33% (n=7), siendo el grupo que mayor tasa presenta (36%) (n=10).

Por otra parte, estudiamos los eventos morfofocinéticos que pudieran ayudarnos a predecir aquellos embriones que no fueran viables por presentar alteraciones cromosómicas, siendo

la división temprana t2 el único parámetro en el que encontramos diferencias estadísticamente significativas. De los 103 embriones aneuploides analizados, el 55% (n=57) estaban fuera del rango óptimo de división temprana, frente a un 16% (n=5) de los euploides (n=31).

## CONCLUSIONES:

Ya que la biopsia embrionaria es una técnica invasiva, la clasificación morfofocinética podría ser útil para reducir el número de embriones a biopsiar, pero no para predecir aneuploidías.

Según estos resultados, ante la misma calidad embrionaria, corroboramos que la edad es un factor determinante en cuanto a la probabilidad de conseguir embriones euploides.

Se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa en el tiempo en el cual el embrión realiza la primera división (t2), aunque no es suficiente para predecir euploidias embrionarias que pudieran sustituir el PGT-A.

Por lo que podemos concluir que los eventos morfofocinéticos pueden ayudar a seleccionar embriones con mayor probabilidad de ser euploides, pero la única forma de detectar anomalías cromosómicas es realizar un PGT-A, al menos de momento, ya que se está estudiando poder realizar diagnóstico genético no invasivo, lo que se conoce como niPGT-A, analizando el medio de cultivo donde se ha desarrollado el embrión.

P-076 ▶

## FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (SDF) ¿INFLUYE EN LOS RESULTADOS DE LOS CICLOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA?

I. Vilella Amorós, LL. Medrano López-Tello, Y. Galiana Briones, J. Ballester Balaguer, J Aizpurua  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

## INTRODUCCIÓN:

Los parámetros seminales han sido muy estudiados en las últimas décadas, con el objetivo de conocer su influencia en los resultados de reproducción asistida y como mejorarlos. Cada vez son más los centros que incorporan nuevas pruebas para analizar la funcionalidad y la integridad del espermatozoide como son: la fragmentación del ADN (SDF), la apoptosis (APOPOP) o la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). En los últimos años, el SDF y la APOPOP se han convertido en

biomarcadores de estudio para la infertilidad masculina y se han intentado relacionar con posibles defectos en el desarrollo del embrión, riesgo aborto temprano o problemas en el desarrollo fetal.

## OBJETIVO:

Evaluar la relación existente entre los valores de SDF y APOPOP y los resultados reproductivos obtenidos en ciclos tanto de ovocitos propios (FIV) como de ovodonación (OVO).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se estudian 363 ciclos de reproducción asistida (entre noviembre de 2016 y diciembre 2018), en los que 157 pertenecen a FIV y 206 a OVO, con PGT-A (entre D5-D6). En todos los casos los gametos utilizados eran frescos y fueron fecundados mediante ICSI. El SDF se realizó mediante Sperm Chromatine Structure Assay y APOP mediante análisis de fosfatidilserina; ambas mediante citometría de flujo.

Para el análisis del SDF y APOP se tomó como punto de corte de normalidad <15%, comparando estos dos subgrupos con las siguientes tasas: fecundación (TF), blastocisto útil (TB), euploidía (TE) y aborto (TA). Los test estadísticos aplicados fueron: T-Test para variables cuantitativas, expresándose mediante media y error estándar y Chi-cuadrado para las cualitativas y se expresó mediante porcentajes. En todos los resultados se expresó primero el resultado para la población normal (<15) y luego para la población patológica (≥15).

## RESULTADOS:

En el grupo FIV (SDF: n=36 normales y 38 patológicas. APOP: n=62 normales y 12 patológicas), la TF entre grupos de SDF son similares ( $0,82\pm 0,02$  vs  $0,78\pm 0,01$ ;  $P=0,257$ ). Para APOP tampoco hay diferencias en la TF ( $0,78\pm 0,06$  vs  $0,80\pm 0,02$ ;  $P=0,675$ ). En cuanto a TB en SDF las poblaciones son similares ( $0,36\pm 0,04$  vs  $0,39\pm 0,04$ ;  $P=0,683$ ); observándose también cuando se analiza TB en APOP ( $0,39\pm 0,09$  vs  $0,37\pm 0,03$ ;  $P=0,789$ ). Las TE tampoco mostraron diferencias significativas

ni en SDF ni en APOP ( $0,36\pm 0,06$  vs  $0,39\pm 0,06$ ;  $P=0,684$ ), ( $0,37\pm 0,04$  vs  $0,40\pm 0,11$ ;  $P=0,785$ ). Para la TA los resultados fueron similares en ambos test: SDF (14,2% vs 21,9%;  $P=0,593$ ) y APOP (16,4% vs 40%;  $P=0,351$ ).

En los ciclos de OVO (SDF: n=23 normales y 25 patológicas. APOP: n=40 normales y 8 patológicas), no se encontraron diferencias significativas para SDF en TF ( $0,83\pm 0,01$  vs  $0,80\pm 0,01$ ;  $P=0,152$ ), ni para APOP ( $0,85\pm 0,06$  vs  $0,81\pm 0,01$ ;  $P=0,272$ ). La TB tampoco presento diferencias para SDF ( $0,57\pm 0,03$  vs  $0,56\pm 0,02$ ;  $P=0,788$ ), ni para la APOP ( $0,47\pm 0,04$  vs  $0,57\pm 0,02$ ;  $P=0,091$ ). En cuanto al SDF en la TE, no se encontraron diferencias entre los grupos ( $0,70\pm 0,05$  vs  $0,73\pm 0,04$ ;  $P=0,579$ ), ni tampoco con la APOP ( $0,70\pm 0,03$  vs  $0,81\pm 0,08$ ;  $P=0,163$ ). Por último, la TA tanto en SDF (17,6% vs 12,5%) como en APOP (15,9% vs 7,1%) fueron similares ( $P=0,661$  y  $P=0,645$  respectivamente).

## CONCLUSIONES:

A pesar de que los grupos de comparación (normal y patológico) no son totalmente comparables y que haría falta un mayor número de casos, con los resultados obtenidos podemos concluir que: los parámetros analizados indican que no existe ningún tipo de relación entre el SDF y la APOP y las tasas evaluadas, tanto en ciclos de FIV como de OVO. Esto nos lleva a concluir que la doble técnica de selección espermática que se lleva a cabo (gradiente de densidad y swim-up) permite realizar una buena selección espermática y eliminar aquellos espermatozoides que presentan alteraciones en la fragmentación del ADN y en su ciclo de apoptosis.

P-077 ▶

## LOS PARÁMETROS MORFOCINÉTICOS TAMBIÉN PUEDEN RESULTAR ÚTILES PARA PREDECIR UN EMBARAZO EVOLUTIVO O UN ABORTO ESPONTÁNEO.

Y. Cabello Vives (1), S. Cabello Pinedo (2), P. Belchín Fernández (1), J. Guerrero Sánchez (2), E. Izquierdo Trechera (1), A. García Enguádanos (1), D. Ordóñez Pérez (1)

(1) Hospital Ruber Juan Bravo Quirónsalud - Madrid (Madrid), (2) OVERTURE LIFE - Madrid (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

La mayoría de las publicaciones que revisan la utilidad de los sistemas time lapse han encontrado una correlación entre los parámetros que predicen la posibilidad de alcanzar el estadio de blastocisto o su capacidad de implantación en varios eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, una vez implantado, no sabemos si alguno de estos parámetros está relacionado con el embarazo evolutivo o con el aborto espontáneo.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio retrospectivo fue determinar si algún parámetro morfocinético embrionario difiere entre aquellos blastocistos que implantaron y dieron lugar a un embarazo evolutivo respecto a los que terminaron en un aborto espontáneo.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se estudiaron 75 blastocistos congelados/descongelados transferidos en 75 transferencias embrionarias únicas durante el año 2019 que resultaron en implantación. Los parámetros evaluados fueron: la edad del ovocito, el tiempo de división a diferentes números de células (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9 respectivamente), el tiempo para alcanzar el estadio de mórula (tM), el tiempo para iniciar la blastulación (tSB), el tiempo para la expansión del blastocisto (tEB), el tiempo para iniciar la eclosión o el hatching (tHB).

Se realizó un test estadístico T-Student para comparar los parámetros en los embarazos en curso con los que acabaron en abortos espontáneos.

## RESULTADOS:

Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de inicio de la eclosión (tHB). En los embriones cuyo resultado fue un embarazo evolutivo, el tHB fue de  $121 \pm 1,5$  horas y el tHB de los embriones que provocaron un aborto fue de  $117 \pm 0,6$  horas.

## CONCLUSIONES:

El momento en el que se inicia la eclosión parece ser un factor relevante para predecir un aborto espontáneo, siendo menor este tiempo que en los embarazos evolutivos.

Otros parámetros morfocinéticos que son importantes para predecir la implantación no mostraron ser relevantes para predecir el aborto espontáneo tras la implantación.

**Tabla 1:** Resumen de medias y SD de los parámetros morfocinéticos analizados por grupo de estudio:

Estadísticos de grupo					
OVO FRESCO	N	Media	Desviación típ.	Error tip. de la media	
tPN	1	73	7,4522	2,24102	,26229
	0	85	7,7936	1,94458	,21092
tPN f	1	72	24,660278	5,7315416	,6754687
	0	85	25,604471	4,6396987	,5032460
t2	1	71	27,2442	5,48779	,65128
	0	84	28,0927	4,70057	,51287
t3	1	72	36,866667	8,9797825	1,0582775
	0	83	37,502651	6,1509468	,6751541
t4	1	72	40,267083	10,5501334	1,2433451
	0	83	40,389759	9,8631700	1,0826236
t5	1	67	48,962687	9,2212938	1,1265603
	0	79	49,654430	10,6407948	1,1971830
t6	1	67	52,8015	10,32764	1,26172
	0	77	55,4442	12,15079	1,38471
t7	1	64	55,978594	10,4795745	1,3099468
	0	74	60,445676	14,0306110	1,6310254
t8	1	64	59,0703	12,60520	1,57565
	0	74	63,3055	11,41718	1,32722
t comp	1	54	77,8106	11,17238	1,52037
	0	65	82,9680	13,42343	1,66497
t morula	1	51	90,4918	8,43322	1,18089
	0	52	93,0081	11,34344	1,57305
t cav	1	49	98,022041	9,4780780	1,3540111
	0	60	101,460333	10,9383725	1,4121378
t Full bl	1	41	108,516829	10,6456743	1,6625750
	0	55	111,696364	10,9496728	1,4764536
t4-t2	1	73	13,217671	7,7784895	,9104033
	0	85	11,677176	10,0739532	1,0926736
t8-t4	1	65	19,872154	10,9551102	1,3588142
	0	76	23,544737	10,0946561	1,1579365
t cav total	1	41	10,951707	4,8529027	,7578961
	0	55	13,015091	15,1749420	2,0461888



# COMUNICACIONES PÓSTERS

**Tabla 2:** Comparación (t Student) de las variables morfocinéticas analizadas:

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95 % Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
tPN	Se han asumido varianzas iguales	,218	,641	-1,025	156	,307	-,34146	,33297	-,99917	,31826
	No se han asumido varianzas iguales			-1,014	143,714	,312	-,34146	,33658	-1,00674	,32383
tPN f	Se han asumido varianzas iguales	,206	,851	-1,141	155	,256	-,9441928	,8278318	-2,6794811	,6910955
	No se han asumido varianzas iguales			-1,121	136,221	,264	-,9441928	,8423268	-2,6096210	,7215354
t2	Se han asumido varianzas iguales	,166	,684	-1,037	153	,301	-,84851	,81830	-2,46513	,76811
	No se han asumido varianzas iguales			-1,024	138,740	,308	-,84851	,82898	-2,48758	,79055
t3	Se han asumido varianzas iguales	,048	,827	-,520	153	,604	-,6359839	1,2233084	-3,0527401	1,7807722
	No se han asumido varianzas iguales			-,507	122,925	,613	-,6359839	1,2553025	-3,1207932	1,8489254
t4	Se han asumido varianzas iguales	,115	,735	-,075	153	,940	-,1226757	1,6407315	-3,3640889	3,1187375
	No se han asumido varianzas iguales			-,074	146,539	,941	-,1226757	1,6486300	-3,3808383	3,1354869
t5	Se han asumido varianzas iguales	2,252	,136	-,416	144	,678	-,6917438	1,6633549	-3,9794897	2,5960020
	No se han asumido varianzas iguales			-,421	143,926	,675	-,6917438	1,6438033	-3,9410365	2,5575489
t6	Se han asumido varianzas iguales	1,529	,218	-1,395	142	,165	-2,64266	1,89456	-6,38785	1,10253
	No se han asumido varianzas iguales			-1,411	141,929	,161	-2,64266	1,87333	-6,34590	1,08057
t7	Se han asumido varianzas iguales	3,827	,052	-2,092	138	,038	-4,4670819	2,1357276	-8,6906130	-,2435508
	No se han asumido varianzas iguales			-2,135	133,288	,035	-4,4670819	2,0919380	-8,6047720	-,3293918
t8	Se han asumido varianzas iguales	,435	,511	-2,071	136	,040	-4,23523	2,04536	-8,28004	-,19041
	No se han asumido varianzas iguales			-2,056	128,352	,042	-4,23523	2,06014	-8,31146	-,15899
tcomp	Se han asumido varianzas iguales	2,310	,131	-2,249	117	,026	-5,15744	2,29317	-9,69895	-,61593
	No se han asumido varianzas iguales			-2,287	110,999	,024	-5,15744	2,25470	-9,62275	-,69214
tmonula	Se han asumido varianzas iguales	4,928	,029	-1,276	101	,205	-2,51631	1,97254	-6,42930	1,39667
	No se han asumido varianzas iguales			-1,279	94,173	,204	-2,51631	1,98697	-6,42169	1,38907
t cav	Se han asumido varianzas iguales	1,056	,306	-1,732	107	,086	-3,4382925	1,9849612	-7,3732486	,4966618
	No se han asumido varianzas iguales			-1,757	106,602	,082	-3,4382925	1,9563945	-7,3167821	,4401971
tFull bl	Se han asumido varianzas iguales	,009	,924	-1,424	94	,158	-3,1795344	2,2327701	-7,6127518	1,2536831
	No se han asumido varianzas iguales			-1,430	87,608	,156	-3,1795344	2,2235267	-7,5986021	1,2395334
t6-12	Se han asumido varianzas iguales	,839	,361	1,062	156	,290	1,5404948	1,4500101	-1,3236922	4,4046817
	No se han asumido varianzas iguales			1,083	154,335	,280	1,5404948	1,4222412	-1,2690774	4,3500669
t6-14	Se han asumido varianzas iguales	,479	,490	-2,070	139	,040	-3,6725830	1,7738578	-7,1798151	-,1653508
	No se han asumido varianzas iguales			-2,057	131,519	,042	-3,6725830	1,7852711	-7,2041453	-,1410207
t cav total	Se han asumido varianzas iguales	1,860	,176	-,838	94	,404	-2,0633836	2,4613828	-6,9505169	2,8237497
	No se han asumido varianzas iguales			-,846	88,103	,348	-2,0633836	2,1820392	-6,4174561	2,2998889

P-078 ▶

## PREVALENCIA DE ENFERMEDADES LIGADAS AL CROMOSOMA X EN TEST DE SCREENING DE PORTADORES

I. Trujillo Puebla, A. Feliu Cuberes, M. Pardo Rodríguez, M. Palahí Bages, D. Cotán Marín, M. Sandalinas Alabert  
Fullgenomics - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

En el cromosoma X se han identificado 867 genes, la mayoría de los cuales están implicados en procesos de desarrollo tisular de tejido óseo, medular, hematopoyético, hepático, renal o cardíaco, entre otros. Existen al menos 533 enfermedades asociadas a alteraciones en alguno de estos genes, conocidas como enfermedades ligadas al cromosoma X.

Actualmente, la incidencia de enfermedades ligadas al cromosoma X es elevada en nuestra población. La detección de estas se realiza por un estudio familiar debido a un caso positivo o por la realización de test de screening genético de portadores, que realiza un cribaje tanto de enfermedades recesivas (AR) como de enfermedades ligadas al cromosoma X (XL).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es analizar la importancia del cromosoma X en los test de screening de portadores, evaluando el número de pacientes portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X. Por otro lado, evaluar cuáles son las principales enfermedades que se detectan y si se corresponden con las enfermedades más frecuentes en población general, así como valorar la necesidad de incluir estos genes en el screening básico de donantes.

## MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio se ha realizado un test de screening genético de portadores en 2340 muestras de mujeres (donantes/pacientes) mediante NGS. Posteriormente, se han analizado los resultados de 24 genes localizados en el cromosoma X incluidos en este test, y se han comparado con sus respectivas frecuencias de portadores en la población general.

De los 24 genes con herencia ligada al X incluidos en el test, se han analizado en más detalle los genes con frecuencia de portadores descrita superior al 1/500. Estos genes presentan frecuencias de 1/259 para FRM1 (síndrome de X-frágil), 1/7 para G6PD (deficiencia de la Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa), 1/50 para F8 (hemofilia A), 1/50 para DMD (Distrofia Muscular de Becker/Duchenne).

## RESULTADOS:

Del total de 2340 pacientes analizadas, el 5.56% son portadoras de alguna variante relacionada con una enfermedad ligada al cromosoma X.

Este 5.56% se divide en: un 2.95% presentan una alteración en el gen FRM1 (de ellas, un 2.27% son portadoras de un alelo en zona gris y un 0.68% son portadoras de un alelo en premutación), un 1.67% presentan alteración en el gen G6PD, 0.38% presentan alteración en el gen F8 y 0.13% presentan alteraciones en los genes DMD y ABCD1 (Adrenoleucodistrofia: Ligada al X). Además, se han detectado portadoras de alteraciones en los genes AR (Síndrome de Insensibilidad Androgénica), F9 (hemofilia B), GLA (enfermedad de Fabry) y el gen EMD (miopatía de Emery-Dreifuss: Ligada al X), cada uno de los cuales representa menos del 0.1% de los casos analizados.

## CONCLUSIONES:

El cromosoma X juega un papel muy importante en la transmisión de enfermedades, ya que el hecho de ser portadora de enfermedades XL aumenta considerablemente el riesgo de tener un hijo afectado. Este hecho se refleja en el 5.56% de las pacientes analizadas portadoras de enfermedades XL con un riesgo de 1/2 de tener un hijo varón afectado. Incluso excluyendo las portadoras de zona gris de síndrome de X-frágil, en las cuales el riesgo de tener un hijo afectado es menor, el 3.29% de las pacientes analizadas son portadoras de enfermedades XL teniendo riesgo directo de descendencia afectada.

Además, los resultados obtenidos muestran que las enfermedades detectadas más frecuentes se corresponden con las esperadas según las frecuencias poblacionales y reafirma la necesidad de incluir las enfermedades ligadas al X en todos los análisis de portadores por su relación directa con enfermedad en la descendencia, teniendo relevancia el número de enfermedades analizadas, dado que en conjunto las menos frecuentes aportan valor predictivo en el 0.43% de las pacientes, superando la mayoría de las más frecuentes individualmente.

P-079 ▶

## ¿SE ADAPTA EL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES VITRIFICADOS DE ASEBIR A LA PRÁCTICA HABITUAL DE SUS USUARIOS?

**L. Martínez Granados (1), M. Serrano Molina (2), ML. López Regalado (1), I. Molina González (3), A. Mauri López (4), C. Olmedo Illueca (5), M. Borrallo Fernández (6), C. Urda Muñoz (7), N. Ortiz Piñate (8), M. Iglesias Núñez (9)**

(1) Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid), (2) Clínica IFEM - Córdoba (Córdoba), (3) Hospital Universitario Río Ortega - Valladolid (Valladolid), (4) Centre Procreas - Reus (Tarragona), (5) Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (Valencia), (6) Minifiv - Madrid (Madrid), (7) GINEFIV - Madrid (Madrid), (8) Instituto Europeo de Fertilidad - Madrid (Madrid), (9) Hospital Universitario Quirónsalud Madrid - Pozuelo de Alarcón (Madrid)

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## INTRODUCCIÓN:

La vitrificación y desvitrificación de embriones es una práctica que se introdujo hace algunos años en los laboratorios de reproducción y que actualmente se considera parte de la actividad diaria de cualquier laboratorio de este tipo. Por otra parte, los protocolos de vitrificación/desvitrificación están estandarizados según los fabricantes de medios de cultivo y se conoce bien los profesos físicos por los que pasan los embriones durante la vitrificación/desvitrificación. Incluso se han podido desarrollar indicadores y sus especificaciones sobre tasa de supervivencia embrionaria. Sin embargo, la evaluación morfológica embrionaria tras la desvitrificación no está tan estandarizada. Con la idea de profundizar y mejorar en este aspecto, el Control de Calidad Externo de evaluación embrionaria de ASEBIR (CCEExt), incluye como punto diferenciador un apartado de criobiología en el que se evalúan embriones desvitrificados.

## OBJETIVO:

Nos proponemos analizar si este apartado de evaluación de embriones desvitrificados está representando la práctica diaria de sus usuarios.

### Material y Método:

Se envió una encuesta a los 69 usuarios del CCEExt de su edición del 2019. La encuesta contenía preguntas sobre la práctica habitual de cada centro en el proceso de evaluación embrionaria en embriones desvitrificados. Se analizan

las respuestas de los 32 centros que contestaron la encuesta. Actualmente en el CCEExt solo se pregunta por el porcentaje de supervivencia/degeneración celular.

## RESULTADOS:

El 75% de los centros transfieren el mismo día los embriones tempranos desvitrificados, al menos en alguna ocasión. En el caso de blastocistos, las variables más evaluadas tras la desvitrificación son la expansión (68.75%), la calidad de la masa celular interna (62.50%) y la calidad del trofoectodermo (62.50%). El 40.63% evalúa conjuntamente estas tres variables mencionadas. Además, el 43.75% evalúan la tasa de degeneración celular. El 21.88% evalúa la supervivencia embrionaria a nivel general. Al preguntar por el tiempo entre la desvitrificación y la transferencia de los blastocistos, el 43.75% de los centros espera como mínimo dos horas, el 28.13% espera tres y el 15.73% espera 4. Menos de dos horas o más de 5 solo esperan el 6.25% en ambos tramos horarios.

## CONCLUSIONES:

El apartado de evaluación embrionaria tras desvitrificación del Control de Calidad Externo de ASEBIR podría incorporar las variables grado de expansión, calidad de la masa celular interna y calidad del trofoectodermo para adaptarse a la realidad habitual de los usuarios de dicho control. La inclusión de videos de la evolución de los blastocistos tras dos horas de cultivo desde la desvitrificación de los mismos también se acercaría más a la práctica más frecuente de los usuarios.

P-080 ▶

## NUEVAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA MEJORAR LA EXPANSIÓN IN VITRO DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES MASCULINAS HUMANAS

**M. Martin Inaraja (1), M. Ferreira (2), J. Taelman (2), SM. Chuva de Sousa Lopes (2), C. Eguizabal (1)**

((1) Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia - Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos - Barakaldo (Bizkaia), (2) Leiden University Medical Center - Leiden (Zuid Holland)

## INTRODUCCIÓN:

Las PGCs son las células precursoras de los gametos masculinos y femeninos, que se diferencian durante el desarrollo embrionario temprano de los mamíferos después de la implantación. Las

PGCs sufren divisiones celulares secuenciales para diferenciarse en pro-espermatogonias (pSPG). La propagación in vitro de las pSPG podría ser importante para comprender la transición a células madre espermatogénicas (SSC), además para la preservación de la fertilidad en pacientes con problemas de fertilidad.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es realizar un análisis comparativo de los sistemas de cultivo in vitro feeder-free, basados en diferentes condiciones de cultivo de la matriz extracelular (ECM) junto con diversos medios de cultivo, para favorecer la expansión de las poblaciones de células madre de la línea germinal masculina.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se obtuvieron gónadas fetales masculinas del segundo trimestre del embarazo procedentes de abortos electivos. Las gónadas fetales masculinas se diseccionaron en solución salina (0,9% de NaCl) y se fijaron durante una noche en paraformaldehído (PFA) al 4% para la realización de inmunofluorescencia o se disgregaron mediante digestión enzimática para la realización del cultivo in vitro.

Para la realización de los cultivos in vitro, después de sembrar las células para la adhesión diferencial de las células somáticas overnight, las PGCs se cultivaron durante 6 días. Las PGCs se cultivaron con dos medios de cultivo diferentes (Medio 1: LIF, EGF, FGF-2 y GDNF y Medio 2: RA, BMP 4 y Activina A) en placas recubiertas con ECM: gelatina, laminina, vitronectina o matrigel. Las PGCs cultivadas se sometieron a inmunofluorescencia y se cuantificó la expresión de DDX4 y POU5F1 tras 3 días (D3) y 6 días (D6) de cultivo

## RESULTADOS:

Evaluamos si las PGCs masculinas podían propagarse in vitro tras cultivarse durante D6 en diferentes condiciones de cultivo.

Observamos mayor porcentaje en la expansión de las PGCs cuando las células se cultivan sobre gelatina y el Medio 1, que contenía los factores de crecimiento LIF, EGF, FGF2 y GDNF. Además, el sustrato de vitronectina dio lugar a un porcentaje igualmente elevado de hPGC, independientemente del medio utilizado. Sin embargo, se observó un porcentaje reducido de PGCs en el resto de revestimientos de ECMs cuando se cultivan con el Medio 2, que contenía RA, BMP4 y Activina.

Se observaron tres poblaciones de hPGCs considerando la co-expresión relativa de los marcadores POU5F1 y DDX4. En esta fase de desarrollo fetal, el 20% de las hPGCs son DDX4+ POU5F1-, el 70% son DDX4+ POU5F1+ y el 10% son DDX4- POU5F1+.

Debido a la limitación y dificultad para obtener tejido fetal humano, se utilizó un número limitado de muestras.

## CONCLUSIONES:

Expandimos células germinales primordiales masculinas humanas in vitro durante 6 días en placas recubiertas de gelatina con Medio 1, que contiene factores de crecimiento LIF, EGF, FGF2 y GDNF. Nuestros hallazgos proporcionan un sistema de cultivo 2D para expandir las hPGCs que podría ser útil para estudiar la propagación a pSPGs y eventualmente a SSCs.

Conseguimos mejorar la expansión in vitro de las hPGCs masculinas con factores de crecimiento específicos como LIF, EGF, FGF2 y GDNF en presencia de gelatina.

P-081 ▶

## PROTOCOLO DEL NÚMERO DE EMBRIONES A TRANSFERIR VS DECISIÓN DE LA PAREJA.

**L. Martínez Granados, B. López Lería, M. López Regalado, E. Cano Oliva, S. Mora Estrada, L. Baños Gavilán**  
Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

La transferencia de embrión único electiva (eSET) es una estrategia fundamental para reducir el embarazo múltiple.

Sin embargo, el 54.4% de las transferencias electivas son de 2 embriones (eDET) según el último registro de la Sociedad Española de Fertilidad.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

Nos planteamos analizar los resultados de los protocolos de eSET y eDET en nuestro centro.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se analizan los resultados de 290 transferencias electivas de embriones en día 2 y 3 de desarrollo embrionario durante el año 2020. Se agrupan los resultados de estas transferencias según el número de embriones transferidos (eSET o eDET)) y si este número se había decidido en función del protocolo de nuestro centro (por protocolo) o por decisión de la paciente expresada en el consentimiento informado (CI). Se comparan dos grupos de pacientes: Grupo 1 (eSET por protocolo y eDET por CI) y Grupo 2 (eSET por CI y eDET por protocolo). El protocolo del número de embriones a transferir se basa en el pronóstico de la paciente.

## RESULTADOS:

En el Grupo 1, la tasa de gestación fue del 40,63% para el subgrupo de eSET por protocolo frente 46,88% del subgrupo de eDET por CI. En el Grupo 2 la tasa de gestación fue del 19,05% para el subgrupo eSET por CI frente al subgrupo eDET por protocolo, que fue del 22,70%. La tasa de gestación múltiple en los grupos de pacientes en los que se transfirieron dos embriones, ya fuese por CI o por protocolo tuvieron una tasa de gestación múltiple del 33,33% y de 21,88% respectivamente, frente a una tasa de gestación múltiple del 0% y del 2,56% de los grupos equivalentes en eSET.

## CONCLUSIONES:

Aumentar el número de embriones a transferir de manera electiva, por protocolo o por decisión de la pareja, aumenta la tasa de gestación múltiple sin mejorar las tasas de gestación clínica, independientemente del pronóstico de la pareja.

P-082 ▶

## COMUNICACIÓN ENTRE LOS LABORATORIOS DE GENÉTICA Y LOS PROFESIONALES DE LA REPRODUCCIÓN. INTERPRTEACIÓN DE RESULTADOS DE EMBRIONES MOSAICO

**L. Martínez Granados (1), P. Mir Pardo (2), E. Cano Oliva (1), E. Ferrer I Robles (3), P. Piqueras Trilles (4), M. Canales Gijón (5), M. López Regalado (1), A. Mauri López (6), JA. Castilla Alcalá (7), M. Iglesias Nuñez (8)**

(1) Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid), (2) IGENOMIX - Valencia (Valencia), (3) CREA Centro Médico de Reproducción Asistida - Valencia (Valencia), (4) Ginemed Murcia-Valencia - Murcia (Murcia), (5) FIV4 Instituto de Reproducción Humana - Gijón (Asturias), (6) Centre Procreas - Reus (Tarragona), (7) Hospital Universitario Virgen de las Nieves - Granada (Granada), (8) Hospital Universitario Quirónsalud Madrid - Pozuelo de Alarcón (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

Con la aparición de la secuenciación masiva ha surgido la posibilidad de detectar varias líneas celulares con distinta carga genética en el análisis de aneuploidías embrionarias tras biopsia de trofooctodermo. La clara expresión de los resultados de estas biopsias, en los informes, es fundamental para la correcta interpretación de los profesionales de los centros de reproducción. Una información deficiente o con nomenclaturas no estandarizada puede llevar a decidir un destino embrionario erróneo y por tanto, reducir el existo potencial de un tratamiento de reproducción. La

estandarización de la nomenclatura, utilizada en la expresión de los resultados de embriones mosaico, es necesaria para mantener la calidad asistencial y la seguridad, en los centros de reproducción asistida que ofrecen test genéticos preimplantacionales para aneuploidías (PGT-A).

## OBJETIVO:

El objetivo de esta comunicación es evaluar si existe variabilidad entre los laboratorios de genética en la expresión de la carga cromosómica de embriones mosaico.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se solicitaron informes de embriones mosaico a diferentes laboratorios de reproducción, que era usuarios de laboratorios de genética externos. Se analizan 11 informes de embriones mosaico, sometidos a PGT-A de tres laboratorios de genética españoles.

## RESULTADOS:

Los informes analizados presentaron diferencias en la nomenclatura utilizada por cada laboratorio. Para el laboratorio 1: expresión de la línea celular euploide (2n), barra, abreviaturas de mosaicismo (mos) y expresión del resto de líneas celulares como monosomía o trisomía y el cromosoma al que afecta; para el laboratorio 2: expresión de la línea celular aneuploide con el número total de cromosomas, referencia a la carga cromosómica sexual, signo + o - previo a los cromosomas

duplicados o delecionados respectivamente, el porcentaje de células afectadas, barra, expresión de la línea celular euploide (46), referencia a la carga cromosómica sexual y porcentaje de células con esta carga; para el laboratorio 3: signo + o - previo a los cromosomas duplicados o delecionados seguidos de la abreviación "mos" y del porcentaje de células afectas para cada cromosoma.

## CONCLUSIONES:

Ya que la detección de embriones mosaico es algo cada vez más frecuente y tras poner de manifiesto la variabilidad existente en la nomenclatura para expresar la carga cromosómica de estos embriones, consideramos necesario la unificación de esta. Acogerse a los estándares internacionales en la expresión de la carga cromosómica ayudaría a una mejor interpretación de estos informes por parte de los profesionales aportando seguridad y calidad a los tratamientos de PGT-A en reproducción asistida.

P-083 ▶

## ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO COMO CRIBADO DE ANEUPLOIDIAS EN ESPERMATOZOIDES

**B. Rojas Ruiz (1), V. Vila Del Sol (2), J. Muñoz Ramírez (1), M. López Rodríguez (1), A. Marquina Rodríguez (2), ME. Alonso Santiago (1), A. Yoldi Chaure (3), JA. Castilla Alcalá (3), M. Martín Gutiérrez (1), M. Sánchez-Dehesa Rincón (1)**

(1) HM IMITOLED0 - Toledo (Toledo), (2) Hospital Nacional de Paraplégicos - Toledo (Toledo), (3) CEIFER Biobanco - Granada (Granada)

## INTRODUCCIÓN:

El avance de la ciencia y las técnicas de biología molecular, parece indicarnos que el seminograma no es suficiente para realizar el correcto diagnóstico del varón en la pareja infértil.

Las alteraciones moleculares a nivel del ADN espermático (Fragmentación y Aneuploidías) juegan un papel importante en el pronóstico reproductivo de la pareja. Estos parámetros alterados, se asocian a fallo de implantación, abortos y desarrollo embrionario anómalo.

Para el estudio de la fragmentación, se realiza Cometa neutro (CIMAB/España) y para el estudio de ploidías, FISH (Geniality). La determinación de ambas pruebas, conlleva un incremento en

el coste del ciclo y una dilatación en el tiempo hasta la obtención de un diagnóstico preciso. Por estas razones, posiblemente, no se indica dicho estudio ampliado como pruebas de rutina, sino cuando existe sospecha clínica de alguna alteración.

En nuestro caso, las indicaciones para realizar el estudio ampliado, son abortos, mala calidad embrionaria/fallo de FIV, EOD, obteniendo un 74'5% de fragmentaciones alteradas y un 40% de FISH alterados. Lo que nos lleva a plantearnos extender dicho estudio a todos los pacientes.

## OBJETIVO:

Estudio del contenido de ADN en espermatozoides mediante citometría de flujo en el laboratorio de FIV. Como técnica

# COMUNICACIONES PÓSTERS

de cribado de alteraciones en las ploidías de dichos espermatozoides. Para extender el estudio a todos los pacientes que acuden a una clínica de reproducción asistida.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se emplean dos grupos de estudio:

Donantes con fertilidad probada (CEIFER BIOBANCO) N=16 a los que se les presupone un contenido de ADN normal en espermatozoides.

Pacientes de Reproducción Asistida N=63

Dentro de los pacientes infértiles, se establecen dos grupos, en función de los resultados aportados por el FISH (5 sondas, Geniality): pacientes con FISH alterado (por % diploides) (n=27) y pacientes con FISH normal (n=36). Se excluyen aquellos pacientes con FISH alterado por disomías sexuales (n=3), ya que la alteración no conlleva un aumento de contenido diploide.

Para el estudio del contenido de ADN se emplea el marcaje con loduro de propidio (IP) y se analizan las muestras en el citómetro Cytoflex (Beckman Coulter).

Se analizan los parámetros de tamaño y complejidad (FSC y SSC), se identifica la población de espermatozoides haploide (n) en el histograma de tinción con IP, y se recoge el porcentaje del pico diploide (2n). Todas las muestras se realizan por triplicado.

Estudio estadístico con SPSS, con  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS:

Existen diferencias significativas entre el porcentaje de diploides de la población DONANTES (2.33%), frente a la población PACIENTES (6.58%) ( $p < 0.001$ )

Existe un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides diploides (2n) detectados por citometría en los pacientes con FISH alterado (7.61%) con respecto a los pacientes con FISH normal (5.74%) ( $p = 0.02$ ). Además, existe una correlación positiva entre el porcentaje de diploides obtenido por citometría y el porcentaje de diploides aportado por el FISH ( $p < 0.01$   $r = 0.454$ ).

El análisis de los parámetros de dispersión de luz FSC y SSC, reveló la presencia de una segunda población con mayor tamaño y complejidad que la población de espermatozoides normales, en los pacientes que presentaban un porcentaje mayor de diploides ( $p = 0.004$ ). La presencia de esta población fue significativamente mayor en pacientes con FISH alterado que en pacientes con FISH normal (prueba de Chi2,  $p < 0.001$ ).

## CONCLUSIONES:

El estudio del contenido de ADN por citometría es una buena herramienta de cribado inicial de aneuploidías en espermatozoides, siendo necesaria la confirmación de las sospechas, mediante la técnica de referencia FISH.

P-084 ▶

## ABORDAJE PERSONALIZADO DEL EMBARAZO ESPONTÁNEO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

**C. de Miguel López, M. Torres Serrano, J. Torres Hernández, C. García Garrido, M. Resta Serra, I. Ochando García**

Complejo Hospitalario Universitario de Albacete - Albacete (Albacete)

## INTRODUCCIÓN:

El embarazo espontáneo (EE) es un fenómeno que ocurre con frecuencia en pacientes que van a recibir o han recibido un tratamiento de reproducción asistida (TRA). Si tras someterse a un TRA, el resultado de éste es exitoso, es decir, se ha conseguido tener un recién nacido vivo, la probabilidad de tener un embarazo espontáneo posterior es, según la literatura, del 20% (Lande et al, 2012). Si, por el contrario, el TRA es fallido o éste se ha discontinuado,

el porcentaje asciende paradójicamente a un 29% (Marcus et al, 2016). Sin embargo no existen datos en la literatura que reflejen la estadística de los EE conseguidos en pacientes incluidas en listas de espera para recibir un TRA. En base a esta información sería necesario crear una herramienta que permita discriminar los casos en los que adoptar un manejo expectante conllevaría múltiples beneficios evitando así el uso de recursos materiales y humanos innecesarios.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es establecer una herramienta que permita determinar las características de las pacientes que consiguen tener un EE previo a un TRA en las que poder adoptar un manejo expectante con garantías, priorizando en las listas de espera a pacientes con peor pronóstico reproductivo.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se trata de un estudio retrospectivo transversal realizado con datos de los años 2010 a 2020. Nuestra población de estudio comprende a todas las mujeres menores de 36 años y varones menores de 46 años en lista de espera para FIV que han concebido de manera natural. El embarazo espontáneo se define como amenorrea y test de embarazo positivo sin intervención médica o quirúrgica en los tres meses previos. Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos (SPSS 20) usando pruebas no paramétricas según el tipo de variable.

## RESULTADOS:

Los datos analizados incluyen a 126 pacientes que cumplían los criterios de inclusión, lo que supone un 14,6% del total de pacientes. En un 35,7% el origen de la esterilidad fue femenino, en un 33,3% masculino, 19% mixto y un 11,1% de origen desconocido. La edad media de las pacientes es de 31,36 años y la media de años de esterilidad 3,18. Si analizamos aquellas pacientes que conciben por debajo de la media de edad y años de esterilidad, la causa mixta aumenta su porcentaje hasta alcanzar el 31% y se observa una tendencia a tener una mayor

probabilidad de concebir de manera espontánea, no existiendo diferencias estadísticamente significativas. El análisis del resto de variables (años de esterilidad, causa y edad de los pacientes) no mostraba significación estadística.

## CONCLUSIONES:

En este estudio no se han podido identificar las características que definen a las pacientes que pueden tener una mayor probabilidad de concebir de manera espontánea antes de realizarse un TRA, por lo que son necesarios sucesivos análisis que permitan establecer una herramienta predictiva.

Cabe destacar que, al tratarse de pacientes menores de 36 años, dicha herramienta nos permitiría, de manera individualizada, recomendar un tratamiento expectante durante un periodo de tiempo definido y así evitar el sobre tratamiento en estos casos.

## BIBLIOGRAFÍA:

Lande Y, Seidman DS, Maman E, Baum M, Dor J, Hourvitz A. Spontaneous conceptions following successful ART are not associated with premature referral. *Hum Reprod.* 2012 Aug;27(8):2380-3. doi: 10.1093/humrep/des202. Epub 2012 Jun 12. PMID: 22693171.

Marcus AP, Marcus DM, Ayis S, Johnson A, Marcus SF. Spontaneous pregnancies following discontinuation of IVF/ICSI treatment: an internet-based survey. *Hum Fertil (Camb).* 2016 Jun;19(2):134-41. doi: 10.1080/14647273.2016.1196296. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27324441.

P-085 ▶

## EMBARAZO ESPONTÁNEO TRAS UN TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA SIN ÉXITO. UNA INCÓGNITA POR RESOLVER

**M. Torres Serrano, C. de Miguel López, J. Torres Hernández, C. García Garrido, M. Resta Serra, I. Ochando Sánchez.**

Hospital General Universitario de Albacete - Albacete (Albacete)

## INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, el 15% de las parejas en edad reproductiva recurren a Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) para intentar lograr un embarazo. Según la literatura (Marcus et al, 2016), el 29% de esas parejas tienen un embarazo

espontáneo (EE) tras haber realizado un TRA sin éxito (gestación no obtenida). Hoy en día no existen protocolos que ayuden a identificar a dichas pacientes, por lo tanto, es necesario realizar estudios que permitan predecir qué pacientes puedan encontrarse en dicha situación.



# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es establecer una herramienta que permita identificar de forma anticipada pacientes que puedan obtener un EE tras un TRA sin éxito, permitiendo ofrecer terapias alternativas eficaces que optimicen recursos hospitalarios y eviten un sobre tratamiento en este grupo de pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio retrospectivo transversal con datos de los años 2010 a 2020. Nuestra población de estudio comprende a todas las pacientes que se han sometido a un tratamiento de fecundación in vitro (FIV) sin éxito y han conseguido posteriormente un embarazo espontáneo (amenorrea y test de embarazo positivo sin intervención médica o quirúrgica en los tres meses previos). Se incluyeron todas aquellas pacientes de las que se disponía de datos sobre el número de tratamientos realizados, número de transferencia embrionarias y calidad embrionaria de las mismas. Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos (SPSS 20) usando los tests de Kolmogorov-Smirnov (normalidad), exacto de Fisher (variables cualitativas) y los tests t-Student y U-Mann-Whitney (medias entre grupos) según la distribución de los datos.

## RESULTADOS:

De los 97 casos estudiados observamos que la media de edad de las pacientes es de 37 años, con una media de 2,3 años de esterilidad previa y 1,48 tratamientos de FIV realizados. El análisis de los datos revela que un 60,8% de las pacientes logran el embarazo espontáneo tras ser sometidas a un solo ciclo de FIV sin éxito y el 71,1% después de haber transferido 2 o menos embriones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variables de estudio (causa de esterilidad, años de esterilidad, edad de la paciente, número de ciclos realizados, número de embriones transferidos y su calidad embrionaria).

## CONCLUSIONES:

Dado que el número medio de tratamientos de FIV no exitosos y transferencias embrionarias previas a lograr el EE es muy bajo (1,48 y 2 respectivamente), la creación de una herramienta para identificar las pacientes subsidiarias de EE tras un tratamiento de FIV sin éxito, mejoraría el bienestar de estas pacientes y permitiría la optimización de recursos hospitalarios (reducción de listas de espera, descenso en el número de intervenciones quirúrgicas innecesarias y disminución del almacenamiento de gametos y preembriones, entre otros). Cabe destacar que los resultados reflejan solo los datos de pacientes de las que se conoce la evolución de su fertilidad. Estudios que incluyan datos de pacientes con un tratamiento de FIV exitoso y con un EE posterior, arrojarían más luz permitiendo establecer conclusiones que ayuden a personalizar cada caso promoviendo así la medicina personalizada en los tratamientos de reproducción humana asistida.

P-086 ▶

## INFLUENCIA DE LOS VALORES SÉRICOS DE PROGESTERONA EL DÍA DE LA TRANSFERENCIA SOBRE LA TASA DE IMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN

**A. Millán García, M. Lierta Sancho, JL. Gámez Prieto, A. Urries López**  
Quirónsalud Zaragoza - Zaragoza (Zaragoza)

## INTRODUCCIÓN:

La progesterona es una hormona esteroidea que está implicada en la implantación del embrión y en el mantenimiento de la gestación. Es secretada por el cuerpo lúteo hasta la semana 6-7 de embarazo debido a la acción de la hCG, que evita su degradación. Transcurrido este tiempo, degenera y la síntesis y secreción de progesterona ocurren en la placenta.

En los ciclos de fecundación in vitro, la funcionalidad del cuerpo lúteo está comprometida por lo que se requiere realizar un soporte de fase lútea con progesterona exógena hasta la prueba de embarazo y semanas posteriores a ella. En esta línea, se observa un interés creciente en estudiar la concentración de progesterona sérica el día de la transferencia necesaria para garantizar la implantación del embrión.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

El objetivo del trabajo consiste en determinar, entre una cohorte de pacientes de nuestro centro, un punto de corte en los valores séricos de progesterona el día de la transferencia embrionaria que aseguren la implantación.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio prospectivo en el que se incluyeron 66 ciclos de donación de ovocitos entre octubre del año 2020 y abril de año 2021.

Las pacientes se sometieron a una transferencia embrionaria de 1 embrión en D+3, previa preparación endometrial con 600 mg de progesterona/día vía vaginal con el fármaco UTROGESTÁN® 200 mg. El día de la transferencia embrionaria se extrajo una muestra de sangre que fue enviada al Laboratorio de Análisis Clínicos, donde se determinó la concentración de progesterona utilizando la técnica ELISA.

La edad media de las pacientes receptoras que participaron en el estudio fue de 40,23,5 años y la de los ovocitos recibidos de 27,03,57 años. Se transfirieron embriones de alto poder de implantación según la clasificación de ASEBIR y del propio algoritmo creado y validado en el Laboratorio de la Unidad de Reproducción Asistida donde se llevó a cabo el estudio, categoría A.

## RESULTADOS:

Los ciclos estudiados (n=66) se dividieron en 4 grupos en función de los valores séricos de progesterona el día de la transferencia embrionaria: G1: <8 ng/ml (n=9); G2: 8-8,99 ng/ml (n=3); G3: 9-9,99 ng/ml (n=3); y G4: >9,99 ng/ml (n=51). Las tasas de implantación/transferencia obtenidas fueron de G1=0%, G2=0%, G3=100% y G4=76%.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la clasificación previa, se hizo una nueva distribución de los ciclos organizándolos en 2 grupos: G1': <9 ng/ml (n=12) y G2': ≥9 ng/ml (n=54). En este caso, se alcanzaron tasas de implantación/transferencia de G1'=0% y G2'=78%.

## CONCLUSIONES:

El análisis anterior muestra que se deben alcanzar niveles de progesterona sanguíneos igual o superiores a 9 ng/ml el día de la transferencia para mejorar las tasas de implantación del embrión. Estos resultados coinciden con los reportados por Labarta et al. 2017.

Aunque se observa una clara tendencia, se necesitan estudios posteriores con mayor tamaño muestral y considerando la tasa de recién nacido vivo, para obtener resultados estadísticamente significativos que confirmen los valores obtenidos.

P-087 ▶

## COMPARACIÓN TASA EMBARAZO POR CICLO ENTRE MUJERES MAYORES DE 40 AÑOS CON Y SIN ANÁLISIS DE PGT-A

**M. Masip Descals, J. Íñiguez Tornero, M. Terol González, M. Barea Gómez, A. De Prados Alonso, A. Urbano Carrillo.**

UR IMED Valencia - Burjassot (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

Esta altamente documentado que la tasa de aneuploidías en embriones preimplantacionales incrementa con la edad, pudiendo llegar a ser hasta del 80% en pacientes por encima de los 40 años. Debido a distintas circunstancias el retraso de la maternidad en las mujeres, ha hecho que el porcentaje de pacientes de edad avanzada que deban recurrir a TRA se haya

visto incrementada en los últimos años. Una alternativa que puede beneficiar a este grupo de pacientes sería la realización de PGT-A, con el fin de seleccionar aquellos embriones que no presenten alteraciones cromosómicas y poder así incrementar el éxito reproductivo en este tipo de pacientes. Aumentando las tasas de embarazo y disminuyendo las tasas de aborto.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

Sin embargo, son pocos los estudios realizados en este grupo de pacientes y además los resultados obtenidos en los diferentes estudios son bastante dispares, adoleciendo muchos de ellos de ciertas carencias en cuanto a su diseño. Pese a todo esto, el PGT-A suele ser una de las indicaciones más aplicadas en mujeres de edad avanzada.

## OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es ver si el PGT-A ofrece mejores tasas de embarazo por ciclo en las pacientes de edad materna avanzada (mayores o igual a 40 años) a las que se les realiza ésta técnica frente a las que no se realiza.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio retrospectivo sobre 41 pacientes con edad materna  $\geq 40$  años. Todos los embriones fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto en el incubador time-lapse (ESCO MEDICAL MIRI TL) en medio único (GEMS – GERI MEDIUM – GENE BIOMEDX MERCK). La biopsia se realizó en D5 y el análisis de las muestras se realizó con NGS. Las transferencias en todos los casos se realizaron en estadio de blastocisto y las transferencias fueron siempre de un único embrión (SET)

El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 25.0 y empleando el test de contraste del ji-cuadrado, siendo considerado estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$ .

## RESULTADOS:

Se obtuvieron los resultados finales del ciclo con respecto a la consecución de embarazo en 32 pacientes sin PGT-A y en 9 a los que si se realizó el PGT-A. (TABLA 1).

Tras la aplicación del test estadístico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados. p-valor .054 en la prueba Chi-cuadrado de Pearson y p-valor .119 en la prueba de Fisher (TABLA 2).

## CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos si bien no ofrece diferencias estadísticamente significativas cuando aplicamos la prueba exacta de Fisher, si tienen una tendencia a dirigirse en el sentido de que en el grupo en el que aplica el PGT-A mejoraría la tasa de embarazo. Sin embargo, en el estudio no se reflejó la tasa de cancelaciones en uno y otro grupo, ni tampoco la tasa de aborto. Los resultados no permiten sacar una conclusión clara sobre el beneficio de la técnica en este grupo de pacientes, tanto por la n tan reducida, como por el diseño del mismo, ya que debería tener en cuenta variables como la tasa de cancelación y la de aborto.

**Tabla 1.** Resultado de ciclo en función de realización de PGT-A

		Se realiza PGT-a			
		No	Si	Total	
Resultado de ciclo entero (incluido congelados)	Negativo	Recuento	22	3	25
		% dentro se realiza PGT	68,8%	33,3%	61,0%
	Positivo	Recuento	10	6	16
		% dentro se realiza PGT	31,3%	66,7%	39,0%
Total		Recuento	32	9	41
		% dentro se realiza PGT	100,0%	100,0%	100,0%

# COMUNICACIONES PÓSTERS

**Tabla 2.** Prueba estadística. Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintomática (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.703 <sup>2</sup>	1	,054		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	2.364	1	,124		
Razón de verosimilitud	3.639	1	,056		
Prueba exacta de Fisher				,119	,063
Asociación lineal por lineal	3.613	1	,057		
N casos válidos	41				

**a.** 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,51

**b.** Solo se ha calculado para una tabla 2x2

P-088 ▶

## ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MEDIOS ÚNICOS EN OVOCITOS PROCEDENTES DE OVARIOS RANDOMIZADOS DE DONANTES

**C. Miret Lucio (1), M. Benavent Martínez (1), M. Escriba Suárez (1), A. García Esteve (1), D. González Abreu (1), M. Alavés Navarro (1), G. Calderón (2), N. Costa Borges (2), J. Crespo Simó (1), J. Teruel López (1)**

(1) Equipo Médico CRESPO - Valencia (Valencia), (2) Embryotools - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

A pesar de que los medios de cultivo único se han implementado de forma habitual en los centros de Reproducción Asistida, todavía no está clara cuál es la formulación óptima para conseguir los mejores resultados en el laboratorio de FIV.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es comparar los efectos que ejercen dos medios de cultivo único (denominados A y B) con ovocitos procedentes de ovarios randomizados de donantes y microinyectados por ICSI sobre el desarrollo de los embriones y los datos clínicos tras la transferencia.

### MATERIAL Y MÉTODO:

En este estudio prospectivo randomizado, realizado entre septiembre de 2020 y marzo de 2021, se comparan las tasas de desarrollo embrionario y resultados clínicos entre dos medios de cultivo único (denominados A y B). El estudio incluyó 92 donantes, cuyos ovarios se randomizaron de forma que los ovocitos obtenidos en cada ovario fueron cultivados en el medio asignado A o B y los embriones obtenidos fueron transferidos a 101 receptoras. Se recuperaron un total de 2065 ovocitos, de los cuales 1176 fueron maduros. Se microinyectaron y se cultivaron ininterrumpidamente en placas (miniGPS, LifeGlobal, Origio) con medio A o B (25 ul medio/pocillo) a 37.3°C, 6.4%CO<sub>2</sub> y 7%O<sub>2</sub>, en un incubador seco (IVFCubo, Astec). La temperatura ambiental y compuestos orgánicos volátiles (VOCs) fueron monitorizados

# COMUNICACIONES PÓSTERS

continuamente Log&Guard, Vitrolife) registrándose un valor medio de VOCs de 0.032ppm. El pH de los medios de cultivo fue medido quincenalmente siendo muy similar en ambos medios (medio A; 7.290+/-0.02; medio B: 7.279+/-0.02).

El método estadístico empleado para el análisis de los resultados fue el Chi-cuadrado.

## RESULTADOS:

Del total de 1176 Mill microinyectados (A=590 y B=586), no se encontraron diferencias significativas en la tasa de fecundación (A: 84.58%; B: 83.10%;  $p=0,493$ ), ni en la tasa de ovocitos degenerados post-ICSI (A: 5.3%; B: 7.2%;  $p=0,174$ ). El número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto en el medio de cultivo A (60.1%) fue significativamente inferior ( $p=0.015$ ) a los blastocistos obtenidos en el medio B (67.6%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.117$ ) en la proporción de blastocistos útiles (transferidos más criopreservados) cuando comparamos los dos medios A (n=258, 51.7%) y B (n=276, 56.9%). Se realizaron 94 transferencias con blastocistos frescos o criopreservados

cultivados en el medio A (n=37) o B (n=57) con un número medio de 1.3 blastocistos transferidos por paciente en los dos grupos. Cabe destacar, que en las transferencias en fresco las tasas de gestación clínica y de implantación fueron significativamente más bajas ( $p=0.047$  y  $p=0.078$ ) en el medio A (47.8% y 40% respectivamente) en comparación con el medio B (78.4% y 70% respectivamente). Por el contrario, en las transferencias en diferido, no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.954$  y  $p=0.659$ ) entre ambos medios en lo que se refiere a las tasas de gestación clínica (85.7% y 85%, respectivamente) y de implantación (71.4% y 65.4%, respectivamente). En general, las tasas de aborto fueron muy similares en ambos grupos (A: 10.8% y B: 7.0%).

## CONCLUSIONES:

El cultivo ininterrumpido puede dar lugar a porcentajes diferentes en el desarrollo de los embriones y en los datos clínicos analizados tras la transferencia dependiendo de su formulación o condiciones de cultivo. La estabilidad de las condiciones de cultivo debe validarse para cada medio y los resultados deben evaluarse de manera independiente en cada laboratorio.

P-089 ▶

## INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE LA DEGENERACIÓN OVOCITARIA EN CICLOS DE FIV/ICSI

**A. Romo Bermúdez, MC. Gonzalvo López, A. Clavero Gilabert, N. Morales Rincón, S. Rodríguez Guirado, CJ. Rodríguez Izquierdo, JA. Castilla Alcalá, E. Fernández Sierra, MJ. Lupiáñez Giner, A. Muñoz Oyonarte**  
Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs. - Granada (Granada)

## INTRODUCCIÓN:

La cohorte de folículos que se desarrolla durante un ciclo de estimulación ovárica para FIV/ICSI es heterogénea en su calidad ovocitaria. Algunos autores han relacionado variables de esta cohorte con los resultados de estos ciclos, como es la tasa de inmadurez ovocitaria o la presencia de determinados dimorfismos ovocitarios. La presencia de degeneración en alguno de los ovocitos de la cohorte puede sugerir anomalías en el desarrollo folicular ovárico o ser un efecto negativo que tenga repercusión solo en un folículo concreto.

## OBJETIVO:

Determinar la influencia de la presencia de degeneración ovocitaria en al menos un ovocito en los resultados clínicos de ciclos de estimulación ovárica para FIV o ICSI.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realiza un estudio no experimental analítico observacional de cohortes retrospectivo para determinar la presencia o no de ovocitos degenerados en ciclos de FIV/ICSI en mujeres de 22-43 años realizados en nuestra Unidad entre 2017-2019. El total de ciclos fue 1333 que se dividieron en dos grupos. El primer grupo constó de 504 ciclos a los que se les realizó FIV a los ovocitos obtenidos, dividiéndose en dos subgrupos, uno en el que se observa la presencia de degeneración en algún ovocito a las 24 horas post-inseminación y otro con los ciclos en los que no se observa degeneración ovocitaria. El segundo grupo constó de 829 ciclos a los que se les realiza ICSI, subdividiéndose en dos subgrupos, uno en los que se observa la presencia de algún ovocito degenerado en el momento de la decumulación (2-4 horas post-punción folicular) y otro con los ciclos en los que no

# COMUNICACIONES PÓSTERS

se observó degeneración. Los criterios de exclusión fueron: baja respuesta ovocitaria ( $\leq 3$  ovocitos), semen propio congelado, ovocitos de donante, Biopsia testicular y ovocitos propios vitrificados. Las variables analizadas se compararon entre subgrupos utilizando la diferencia entre medias y su intervalo de confianza en variables cuantitativas, y el cálculo de la OR y su intervalo de confianza, en caso de variables cualitativas.

## RESULTADOS:

La degeneración se asoció significativamente tanto en FIV como en ICSI al número de ovocitos obtenidos, siendo este mayor en los ciclos donde existe degeneración ( $13,3 \pm 6,3$  ovocitos vs  $10,1 \pm 5,2$  ovocitos en el caso de FIV y  $11,3 \pm 5,9$  ovocitos vs  $9,6 \pm 4,8$  ovocitos en el caso de ICSI). La concentración sérica de estradiol en el día de hCG en ciclos de FIV fue superior en ciclos donde se observó la presencia de degeneración ovocitaria ( $2446,5 \pm 1305,3$  pg/mL vs  $2082,3 \pm 1106,0$  pg/mL). Estas diferencias no se observaron en ciclos de ICSI. También se observó una tasa de

ovocitos maduros menor en los casos donde hay presencia de degeneración ovocitaria tanto en ciclos de FIV como de ICSI ( $74,9 \pm 14,4\%$  vs  $89,4 \pm 14,2\%$  en el caso de FIV y  $66,0 \pm 21,0\%$  vs  $80,8 \pm 18,2\%$  en el caso de ICSI). La presencia de degeneración ovocitaria no influyó ni en la tasa de implantación ( $28,2\%$  vs  $31,6\%$  en FIV y  $21,6\%$  vs  $19,7\%$  en ICSI), ni en la de embarazo clínico por transferencia embrionaria ( $46,3\%$  vs  $51,1\%$  en FIV y  $37,0\%$  vs  $37,2\%$  en ICSI), ni en la de tasa de parto por transferencia embrionaria ( $35,7\%$  vs  $37,2\%$  en FIV y  $26,6\%$  vs  $22,3\%$  en ICSI).

## CONCLUSIONES:

En ciclos de estimulación de la ovulación, la presencia de algún ovocito con degeneración ovocitaria se asocia a respuestas elevadas a la estimulación de la ovulación y a asincronía folicular. Su presencia no tiene repercusión en los resultados clínicos de FIV ni de ICSI tras transferencias en fresco.

P-090 ▶

## PATERNAL AGE AND REPRODUCTIVE OUTCOMES IN ICSI-DONOR CYCLES: A COMPARISON BETWEEN FRESH AND VITRIFIED SPERMATOZOA

A. Parrella NA, L. Ortega López, B. Ramos Mas, I. Vilella Amorós, A. García Sifre, J. Aizpurua  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

## INTRODUCTION:

Advanced paternal age is associated with low quality of spermatozoa and an increase of reactive oxidative species, responsible of the DNA fragmentation and epigenetic disorders. In these men, the DNA repair mechanisms have a reduced ability to repair damaged DNA enhancing the likelihood of replication errors in the germ line. This genomic instability of the male gamete entails to chromosome abnormalities, in particular when the maternal oocyte repair mechanisms are not able to compensate quantitatively and qualitatively the sperm damage. This may lead to the development of unpaired embryos that have a negative effect on implantation and clinical outcomes.

## OBJECTIVE:

To determinate whatever paternal age affect embryo aneuploidy/viability and clinical outcomes when fresh (FRs) and vitrified (VTs) spermatozoa are used in ICSI donor-oocytes cycles.

## MATERIAL AND METHOD:

This retrospective study includes 848 couples undergoing 905 ICSI donor-cycles oocytes using FRs and VTs ejaculates between January 2019 and March 2021. The number of mature oocytes retrieved was not significantly different and only couples with previously failed cycles with their own oocytes were included. Clinical outcomes and aneuploidy were analyzed in two groups with the male partner being younger ( $M \leq 40$ ) or older than 40

# COMUNICACIONES PÓSTERS

years ( $M>40$ ). An in house-protocol (Vitri-Sperm®) was used to perform spermatozoa vitrification/warming. Embryo quality was assessed with time-lapse technology (Geri®), Aneuploidy Testing (PGT-A) was carried out using NGS (Illumina®) and Fisher's Exact test was used for statistical analysis. A P-value  $<0.05$ . was considered statistically significant.

## RESULTS:

Fresh ejaculate was used in 192 cycles with  $M\leq 40$  (concentration:  $39.4\pm 35 \times 106/\text{mL}$ ; motility:  $35.1\pm 16\%$ ) and 242 with  $M>40$  (concentration:  $36\pm 34 \times 106/\text{mL}$ ; motility:  $30\pm 16\%$ ) yielding similar fertilization:  $75.3\%$  (1785/2369) Vs  $75.6\%$  (2232/2938). The comparison between  $M\leq 40$  with  $M>40$  shows significant decrease in implantation rate from  $66.6\%$  (92/138) to  $54.4\%$  (79/145,  $P=0.03$ ) and in Clinical Pregnancy Rate (CPR) from  $68\%$  (85/125) to  $54.3\%$  (75/138  $P=0.03$ ). Not significant different was seen in pregnancy loss being  $15.2\%$  (19/125) and  $17.3\%$  (24/138), respectively. In  $M\leq 40$  undergoing ICSI+PGT-A cycles ( $N=43$ ) with FRs, euploidy rate was  $71\%$  (157/221) Vs  $73.5\%$  (256/348) in  $M>40$  cycles ( $N=71$ ). Implantation rate and CPR were comparable in FRs groups,  $77.1\%$  (27/35) Vs  $75.8\%$  (44/58).

Vitrified spermatozoa were used in in 195 cycles with  $M\leq 40$  (concentration:  $4.9\pm 7 \times 106/\text{mL}$ ; motility:  $13.4\pm 9\%$ ), and 276 with  $M>40$  (concentration:  $4.3\pm 4 \times 106/\text{mL}$ ; motility:  $13.9\pm 12\%$ ) yielding significant difference in fertilization,  $76.2\%$  (1841/2416) Vs  $72.4\%$  (2386/3293,  $P<0.001$ ), respectively. Between  $M\leq 40$  and  $M>40$  groups, no significant different was found in implantation rate being  $51.9\%$  (40/77) Vs  $49.1\%$  (60/122), CPR that was  $53\%$  (38/71) Vs  $54\%$  (59/109) and pregnancy loss was  $16.9\%$  (12/71) Vs  $13.7\%$  (15/109). Using VTs, euploidy rate in  $M\leq 40$  cycles ( $N=63$ ) was  $71.9\%$  (210/292), compared to  $70.0\%$  (279/399) in  $M>40$  cycles ( $N=82$ ). Implantation rate and CPR were higher in both groups,  $76.5\%$  (36/47) Vs  $73.6\%$  (53/72), not statistically significant.

## CONCLUSIONS:

Paternal age affects clinical outcomes and embryo viability, it does not affect embryo aneuploidy when FRs and VTs are used. In ICSI donor-oocytes cycles with VTs, no significant difference in clinical outcomes were found between young and older men. However, young men with fresh ejaculate have higher reproductive.

P-091 ▶

## USO DE COLUMNAS DE ANEXINA V EN PACIENTES CON FRAGMENTACIÓN DEL ADN ELEVADA

**C. Concepción Lorenzo, J. González Pérez, S. Rodríguez Fiestas, R. Blanes Zamora, R. Vaca Sánchez, T. López Salgado, D. Báez Quintana, Y. Ortega González**

Complejo Hospitalario Universitario de Canarias - La Laguna (Santa Cruz de Tenerife)

## INTRODUCCIÓN:

La aplicación de nuevas técnicas para la selección espermática podría minimizar el efecto negativo asociado al factor masculino alterado y a su vez mejorar la efectividad del tratamiento.

En los últimos años la integridad del ADN espermático ha sido señalada como un factor muy relevante en la infertilidad masculina, influyendo en parámetros como la calidad embrionaria (Stimpfel et al. 2018)

La técnica MACS (Magnetic Activation Cell Sorting) es un protocolo no invasivo de preparación seminal que permite reconocer células espermáticas apoptóticas y separarlas de los espermatozoides con mayor potencial de fertilización (Hoogendijk et al. 2009).

## OBJETIVO:

Determinar si la utilización de columnas de anexina mejora los resultados en pacientes con fragmentación del ADN espermático elevada.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo de 37 ciclos, entre los años 2016 y 2020. Los 37 pacientes tienen un diagnóstico de fragmentación superior al 30% (Kit Halosperm®, de Halotech) y se ha utilizado, para la preparación seminal, gradientes de densidad y MACS. En el ciclo previo, del mismo grupo, sólo se utilizaron gradientes de densidad. También se valora agrupando en función de la edad en el ciclo MACS (grupo 1 menores o iguales a 35 años y grupo 2 mayores de 35 años).

# COMUNICACIONES PÓSTERS

Se analiza la calidad embrionaria según criterio de ASEBIR, considerando el porcentaje de embriones buena calidad en d+3 (grado A y B), además del indicador porcentaje de embriones utilizados, definido como (transferidos + congelados) / (nº total de embriones obtenidos) x100.

Para el estudio de los resultados obtenidos se utiliza el paquete estadístico SPSS versión 25, aplicando test de chi-cuadrado para variables categóricas y t-Student para muestras relacionadas en las variables continuas.

## RESULTADOS:

No obtenemos diferencias significativas para IMC de la mujer y del varón, número de ovocitos recuperados y maduros. Tampoco para días de abstinencia, volumen seminal, concentración de espermatozoides ni movilidad progresiva en fresco. Sí se encuentra diferencia significativa en la edad de ambos miembros, siendo mayor cuando se aplican MACS 35,2 vs 34,1 (p=0,000) en mujeres y 39,4 vs 38,3 (p=0,000) en varones.

Para ciclos con MACS y ciclos previos respectivamente, no se aprecian diferencias significativas en el porcentaje de fertilización de 2PN+2CP (70,30% y 68,98%, p=0,738) y división (99,47% y 100%, p=0,994).

Mejora el porcentaje de embriones de buena calidad, 46,24% vs 34,39% (p=0.019), cuando se aplican MACS. A su vez también repercute en un mayor porcentaje de embriones utilizados, siendo más elevado en el grupo MACS, 55,91% vs 44,97% (p=0,0034).

Si dividimos a las pacientes en función de la edad obtenemos para grupo 1 calidad A/B 44,7% vs 38,1% (p=0,359) y embriones utilizados 57,4% vs 49,5% (p=0,270) para MACS vs no MACS respectivamente. En el grupo 2 calidad A/B 47,8% vs 30,4% (p=0,016) y embriones utilizados 55,4% vs 40,2% (p=0,039) MACS vs no MACS respectivamente. (Ver gráfico)

## CONCLUSIONES:

A pesar de la mayor edad en las pacientes al aplicar MACS, debido al tiempo entre tratamientos, se consigue mayor porcentaje de embriones utilizados así como de buena calidad.

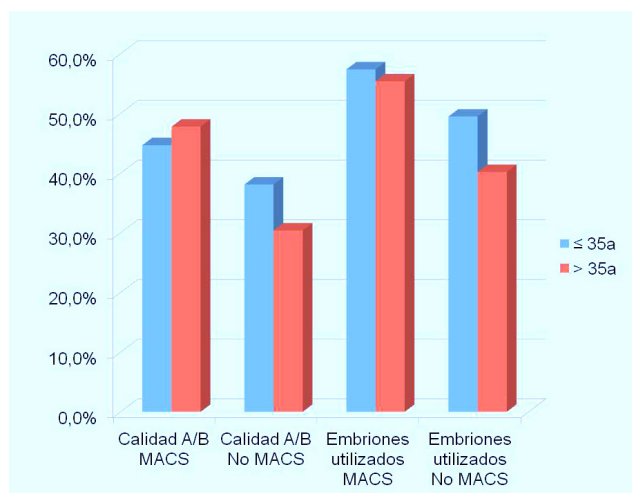
Podemos concluir que el uso de columnas MACS en pacientes con fragmentación elevada puede mejorar su pronóstico reproductivo, aunque afectado por la capacidad de reparación del ADN por parte del ovocito, que disminuye con su edad (Titus et al. 2013).

Debemos incrementar el número de casos para concretar la edad donde el beneficio de la aplicación es significativo, valorar la tasa acumulada de embarazo y estudiar los parámetros perinatales para profundizar en la mejora observada.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Simopolou et al., 2016*
- Stimpfel et al., 2018*
- Merino Ruiz et al., 2019*

**Gráfico.** IMC de la mujer y del varón, número de ovocitos recuperados y maduros.





## RELACION ENTRE LA TASA DE ANEUPLOIDIAS EN ESPERMATOZOIDES Y PARAMETROS SEMINALES

J. Iñiguez Tornero, M. Masip Descals, M. Terol González, M. Barea Gómez, A. De Prados Alonso

UR IMED VALENCIA - Burjassot (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

El análisis del factor masculino se ha basado tradicionalmente en el estudio de los parámetros seminales clásicos mediante la realización de un seminograma. Sin embargo, diferentes estudios avalan el hecho de que en la infertilidad masculina existe una proporción de varones con un % elevado de anomalías cromosómicas en los espermatozoides. Dentro de estos estudios, hay varios que recogen un mayor incremento de anomalías cromosómicas en pacientes con seminogramas alterados. Aunque también hay otros estudios en los cuales se observan una gran proporción de pacientes normozoospermicos que también tendrían incrementada las tasas de aneuploidías. Por tanto, en base solo a parámetros seminales no se podría asegurar la integridad genética de los espermatozoides.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es evaluar la posible relación entre aneuploidías en espermatozoides y los diferentes parámetros seminales.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio retrospectivo sobre 80 varones estudiados entre marzo de 2018 y enero de 2021, a todos ellos se les realizó una prueba de FISH en base a diferentes indicaciones como fueron abortos de repetición, fallos de implantación, fallos de fecundación, edad paterna avanzada o valores alterados en el seminograma. A todos los pacientes se les había practicado previamente un análisis seminal mediante seminograma. Las muestras se obtuvieron por masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia y la valoración del seminograma se realizó en base a los criterios OMS. Por último, para la realización de la técnica del FISH en los espermatozoides, se analizaron un total de 5 cromosomas (13, 18, 21, X e Y), y las muestras tomadas

fueron llevadas en un tubo cónico con un volumen mínimo de 0,5 ml. a Tª ambiente, mediante mensajería urgente, al laboratorio de genética de referencia. Para cada muestra, se observaron un mínimo de 5000 espermatozoides por muestra analizada.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS y utilizamos la prueba de CHI-CUADRADO

### RESULTADOS:

Se obtuvieron unos resultados de FISH en los que en el 56,3% de los casos resultó normal y en el 43,8% alterado. En cuanto a los valores del seminograma se obtuvieron resultados en todas las categorías establecidas (Normozoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia, criptozoospermia, oligoastenozoospermia, oligoastenoteratozoospermia, oligoteratozoospermia). Los resultados del FISH con respecto al seminograma se reflejan en TABLA 1.

Se obtuvo una significancia de la prueba exacta de Fisher 0.188, por lo que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. TABLA 2.

### CONCLUSIONES:

El resultado de las pruebas del FISH es independiente de las características particulares del semen. Por lo que la indicación de su realización no debería depender solo de parámetros seminales comprometidos, sino que también se deberían solicitar en muestras normozoospermicas en caso de abortos o fallos de implantación o EOD. No obstante, debido a la frecuencia tan baja en varios de los grupos, así como una n tan baja, hace que quizás no se pueda establecer una relación más intensa entre FISH alterados y alguno de los grupos con seminogramas con valores comprometidos.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

**Tabla 1.** Resultado FISH en relación con el diagnóstico seminal

Recuento		tipo seminograma									Total
		NORMOZOOSPERMIA	OLIGO	ASTENO	TERATO	CRIPTOZOOS	OLIGOASTEN O	OLIGOASTENOTERATO	ASTENOTERATO	OLIGOTERATO	
resultado fish	normal	14	3	0	9	1	4	4	9	1	45
	alterado	13	1	1	6	1	3	9	1	0	35
Total		27	4	1	15	2	7	13	10	1	80

**Tabla 2.** Prueba estadística

## Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)	Probabilidad en el punto
Chi-cuadrado de Pearson	11,025 <sup>a</sup>	8	,200	,170		
Razón de verosimilitud	12,685	8	,123	,188		
Prueba exacta de Fisher	11,141			,135		
Asociación lineal por lineal	,518 <sup>b</sup>	1	,472	,489	,250	,025
N de casos válidos	80					

a. 11 casillas (61,1%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,44.

b. El estadístico estandarizado es -,720.

P-093

## ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL Y ELECTRÓNICA DE LA REPRESENTATIVIDAD DEL CONTENIDO DE ADN MITOCONDRIAL (ADNmt) RESPECTO A LA ACTIVIDAD Y A LA MASA MITOCONDRIAL EN EL BLASTOCISTO HUMANO POST-DESVITRIFICACIÓN.

JM. De los Santos Molina (1), M. Pérez Sánchez (1), A. Martín Bastida (2), M. Nohales Corcoles (1), A. Cobo Cabal (1), MJ. De los Santos Molina (1)

(1) IIRMA - Valencia (Valencia), (2) Fundación IVI, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

Durante el desarrollo hasta blastocisto, el número de copias de ADN mitocondrial se reduce de forma significativa desde el cigoto hasta el estadio de blastocito (Pérez-Sánchez, 2020). Sin embargo, hemos observado que ciertas condiciones de estrés, como puede ser la vitrificación, vienen acompañadas de un incremento del número de copias de ADNmt.

### OBJETIVO:

Evaluar si existe correlación entre el número de copias de ADNmt, el estado redox y la masa mitocondrial del blastocisto humano post-desvitrificación a nivel de microscopía confocal y electrónica, respectivamente.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo con un total de 17 blastocistos aneuploides. Para el cálculo de la ratio REDOX se realizó una cuantificación de autofluorescencia de NADH y FAD con 10 de ellos, 5 cultivados durante 5 horas tras la desvitrificación y otros 5 cultivados un máximo de 1 hora tras la desvitrificación.

Por otro lado, se realizó un análisis de 7 blastocistos, 3 de ellos cultivados durante 5 horas tras la desvitrificación y otros 4 cultivados un máximo de 1 hora tras la desvitrificación mediante microscopía electrónica para el recuento visual de mitocondrias.

El estudio estadístico para ambos experimentos se realizó mediante análisis de correlación y T-test.

## RESULTADOS:

No se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en cuanto al ratio redox entre blastocistos recién desvitrificados (ratio redox promedio= 1,49) y en recuperación tras la desvitrificación (ratio redox promedio= 1,26). En cuanto a la masa mitocondrial, a nivel de microscopía electrónica no se observan diferencias

significativas ( $P > 0,05$ ) en número de mitocondrias agrupando los blastocistos según estuvieran recién desvitrificados (promedio de mitocondrias por célula=30,77) o en recuperación tras la desvitrificación (promedio de mitocondrias por célula=30,94). Además, no se observan a simple vista diferencias en la configuración de la matriz mitocondrial que pudiera indicar diferencias a nivel de actividad mitocondrial entre los dos grupos.

## CONCLUSIONES:

A pesar de darse un aumento de ADNmt en blastocistos en recuperación tras la desvitrificación no se observa que este coincida con un aumento ni en actividad redox ni en masa mitocondrial. Esta falta de representatividad puede deberse, entre otros factores, a los innumerables procesos de homeostasis mitocondrial (fusión y fisión) que ocurren constantemente en las células y que probablemente ocurran durante el periodo de tiempo transcurrido durante el cultivo desde la desvitrificación. Por otro lado, nuestros resultados podrían evidenciar que el incremento del ADN mitocondrial que se observa tras la vitrificación no altera el estado redox de la mitocondria lo que nos lleva a pensar que la replicación del ADNmt en estos casos tenga una finalidad diferente de la meramente energética cuyas consecuencias a medio y largo plazo están aún por determinar.

P-094 ▶

## AIRE, UN NUEVO GEN CANDIDATO ASOCIADO AL DESARROLLO EMBRIONARIO.

**B. Lledó Bosch (1), R. Morales Sabater (1), JA. Ortiz Salcedo (1), F. Lozano García (1), J. Guerrero Villena (1), N. Ruiz Espinosa (2), L. Luque Martínez (2), J. Ten Morro (1), J. Llácer Aparicio (1), R. Bernabéu Pérez (1)**

(1) Instituto Bernabéu - Alicante (Alicante), (2) Instituto Bernabéu - Albacete (Albacete)

## INTRODUCCIÓN:

La influencia de las causas genéticas en las anomalías del desarrollo embrionario temprano están pendientes de determinar. Hasta ahora, solo hay unos pocos genes identificados como responsables de alteraciones en el desarrollo embrionario. El gen AIRE codifica el regulador autoinmune (AIRE), un factor de transcripción cuya función deficiente se ha asociado a infertilidad por un desarrollo defectuoso de las células germinales, una función ovárica anómala en mujeres y un bloqueo del desarrollo embrionario.

Estudios en animales han demostrado que AIRE es importante para un adecuado desarrollo embrionario debido a su papel en la regulación del centrosoma y la integridad del huso mitótico que son procesos críticos en el desarrollo de embriones preimplantatorios.

## OBJETIVO:

El objetivo del presente estudio ha sido investigar las causas genéticas del bloqueo embrionario temprano en pacientes infértiles mediante secuenciación completa del exoma.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio observacional prospectivo en pacientes con un desarrollo embrionario inadecuado. Se incluyeron 4 parejas en las que se observó un alto porcentaje (>70%) de embriones bloqueados en fases previas al estadio de blastocisto. Se realizó una extracción de ADN genómico a partir de sangre-EDTA de los pacientes empleando el kit comercial MagMax DNA MultiSample Ultra y el extractor automático King-Fisher (ThermoFisher®). La secuenciación del exoma para la identificación de variantes genéticas se realizó utilizando TruSightOne Expanded (Illumina®). Los datos de FASTAQ se procesaron mediante algoritmos BWA y GATK. Los archivos VCF se analizaron utilizando el software Variant Interpreter.

## RESULTADOS:

Tres de las 4 parejas incluidas en el estudio realizaron tratamientos de donación de ovocitos. Las donantes presentaron una edad media de 25 años. A la primera de las parejas se le donaron 16 ovocitos con un bloqueo total de los embriones en estadio de blastocisto. La segunda realizó 2 tratamientos con número de ovocitos donados de 8 y 11 respectivamente, en el primer ciclo todos los embriones se bloquearon y en el segundo sólo 3 de los 11 embriones llegaron a fase de blastocisto. A la tercera pareja se le donaron 10 ovocitos y sólo 3 embriones fueron evolutivos en día 5. Por último, la pareja que realizó un tratamiento de ovocito propio (edad materna 34 años) realizó

dos tratamientos obteniéndose 13 y 14 ovocitos con una tasa de embrión evolutivo del 15%. Tras el análisis de las regiones codificantes y de unión intrón-exón de más de 6000 genes incluidos en el panel, se encontraron mutaciones en el gen AIRE en uno de los miembros cada una de las parejas. En dos de las parejas la mujer fue la portadora de mutaciones en el gen AIRE y las mutaciones identificadas fueron la c.10G>A y la c.798+1G>A. En las otras 2 parejas estudiadas las mutaciones identificadas en el varón fueron la c.342G>T y c.371C>T. Tres de las cuatro mutaciones se tratan de mutaciones missense que producen un cambio aminoacídico en la proteína (Asp4Asn, Lys114Asn y Pro124Leu) y por lo tanto con un efecto probablemente deletéreo sobre la actividad de la proteína. Por último, la cuarta mutación c.798+1G>A produce un cambio en el sitio de splicing conduciendo a un procesamiento inadecuado de la proteína.

## CONCLUSIONES:

Existen numerosas mutaciones genéticas que pueden alterar el desarrollo de los embriones preimplantatorios, especialmente en las primeras etapas. AIRE es un gen que recientemente se ha asociado al bloqueo embrionario temprano. Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que AIRE podría tener un papel importante en la embriogénesis temprana. Además, proporciona una posible diana diagnóstica para pacientes con desarrollo embrionarios alterados y nos ayuda a comprender mejor la base genética de la infertilidad caracterizada por un bloqueo embrionario temprano.

P-095 ▶

## INFLUENCIA DE LA CALIDAD EMBRIONARIA EN DÍA 3 EN LA TASA DE GESTACIÓN DE BLASTOCISTOS.

**E. Cano Oliva, L. Martínez Granados, B. López Lería, M. López Regalado, L. Baños Gavilán, S. Mora Estrada**  
Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

Tradicionalmente las clasificaciones embrionarias basadas en morfología no relacionan la calidad embrionaria en D+3 y D+5, obviándose la calidad en D+3 en el momento de la evaluación de los blastocistos.

## OBJETIVO:

Nos proponemos analizar si la calidad de los embriones en D+3 afecta a la tasa de implantación de los embriones en D+5.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realiza un análisis retrospectivo de la tasa de gestación por transferencia de una cohorte de 113 blastocistos desvitrificados durante el año 2020. Todas las transferencias realizadas fueron de un solo blastocisto. Los blastocistos tipo D no fueron analizados en este trabajo debido a que no son vitrificados por protocolo en nuestro centro. Para conocer la significancia de los resultados obtenidos, se lleva a cabo un test de Chi cuadrado.

## RESULTADOS:

Las tasas de gestación obtenida para los embriones tipo A, B, C y D en D+3 independientemente de la calidad del blastocisto obtenido, fue de 43.4%, 36.6%, 36.1% y 7.6% respectivamente.

No se observan diferencias significativas en las tasas de gestación general para los blastocistos que provenían de embriones tipo A, B y C, sin embargo, se observan una disminución significativa en la tasa de gestación de los blastocistos que provenían de embriones tipo D en D+3. El porcentaje de blastocistos analizados según su calidad fue similar independientemente de la calidad embrionaria en D+3.

## CONCLUSIONES:

La evaluación morfológica de los embriones en D+3 puede aportar información sobre el potencial de implantación de los blastocistos. Los blastocistos provenientes de embriones tipo D en D+3, independientemente de su calidad en D+5, no deberían priorizarse frente a blastocistos de igual o peor calidad que provengan de embriones tipo A, B o C en D+3.

P-096 ▶

## RELACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA EN D+3 Y D+5.

**L. Martínez Granados, E. Cano Oliva, M. López Regalado, B. López Lería, L. Baños Gavilán, S. Mora Estrada**

Hospital Universitario Príncipe de Asturias - Alcalá de Henares (Madrid)

## INTRODUCCIÓN:

El cultivo hasta blastocisto es una herramienta útil para realizar una mejor selección embrionaria. Sin embargo, son necesarias algunas características logístico-técnicas para realizar cultivo largo, del que no todos los laboratorios disponen.

## OBJETIVO:

Por este motivo, nos planteamos conocer si existe relación entre la calidad embrionaria en D+3 y D+5.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se realiza un análisis retrospectivo de la evolución de 1490 embriones procedentes de ovocitos propios de pacientes tratadas durante el año 2019. Se calcula la tasa de blastulación y la tasa de blastocistos de buena calidad (A o B) en función de la calidad embrionaria en D+3. Para realizar la evaluación morfológica de los embriones se utiliza la clasificación de ASEBIR.

## RESULTADOS:

Las tasas de blastulación para los embriones A, B, C y D en D+3 fue de 79.0%, 64.3%, 49.4% y 24.1% respectivamente. Al analizar la calidad de los blastocistos en función de su calidad en D+3 observamos que el 67.4% de los blastocistos procedentes de embriones A fueron de buena calidad. De los embriones B, C y D en D+3, el 52.4%, 37.2% y el 24.8% fueron blastocistos de buena calidad respectivamente. Se observan diferencias significativas entre todos los grupos analizados. Los embriones de mejor calidad generan mayor proporción de blastocistos y estos blastocistos son de mejor calidad.

## CONCLUSIONES:

La evaluación morfológica de los embriones en D+3 está relacionada con el potencial de blastulación y la calidad de los blastocistos. Tomar decisiones sobre el destino de los embriones en D+3 sigue siendo una herramienta útil cuando por motivos logístico-técnicos no se pueda cultivar hasta estadio de blastocisto.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

P-097 ▶

## SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PARA LA ICSI MEDIANTE LA CÁMARA MICROFLUÍDICA ZyMöt™ ICSI EN PACIENTES CON FRAGMENTACIÓN ELEVADA DE LA CADENA DOBLE DEL ADN

**J. Cuadros Fernández, L. Andrés Criado, M. Morales Morales, M. Villa Martínez, MA. Manzanares Ruiz, E. Ricciarelli**

Clínica FIVMadrid - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

Hay evidencias de que la fragmentación de la cadena doble de ADN de los espermatozoides tiene relación con los fallos de implantación y los abortos de repetición. Además, se ha sugerido que el uso de la cámara microfluídica ZyMöt™ ICSI (DxNow) reduciría la probabilidad de microinyectar espermatozoides con la cadena doble fragmentada. En esta comunicación analizamos los resultados del uso de este dispositivo en varones con fragmentación de la cadena doble de ADN superior al 60%.

### OBJETIVO:

Evaluar los resultados del uso de la cámara microfluídica ZyMöt™ ICSI en parejas con fallos de implantación o abortos de repetición en las que los varones presentaron fragmentación de la cadena doble del ADN de los espermatozoides superior al 60%.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Utilizamos la cámara ZyMöt™ ICSI (antes FERTILE™) para seleccionar los espermatozoides en 19 ciclos de ICSI realizados

entre enero de 2017 y diciembre de 2019, en los que los varones tuvieron un diagnóstico de fragmentación de la cadena doble del ADN superior al 60% mediante el test CometFertility®.

### RESULTADOS:

17 de las 19 parejas tuvieron una  $\beta$ -hCG positiva (89,5%), 15 fueron embarazos clínicos (78,9%) y 3 de estos fueron abortos (20,0%). Ha habido 12 nacimientos únicos (63,2%) en las transferencias en fresco, más un nacimiento de una descongelación en uno de los ciclos que había sido un embarazo bioquímico en la primera transferencia, con lo cual la tasa de niño nacido vivo sano acumulada por paciente en este grupo ha sido de 68,4% (13/19).

### CONCLUSIONES:

El uso de la cámara microfluídica ZyMöt™ ICSI ha mostrado ser útil para conseguir el nacimiento de niños sanos en parejas con fallos de implantación o abortos de repetición en las que el varón presenta una fragmentación elevada de la cadena doble de ADN.

P-098 ▶

## RELACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE PROGESTERONA CON LOS RESULTADOS DE TRA

**M. García Jiménez, L. Iraurgi Izurza, V. Domínguez Lorenzo, M. Estevan Mugerza, M. Elías Alguacil, S. Becerra**

Clínica Zuatzu - Donostia (Gipuzkoa)

### INTRODUCCIÓN:

La preparación endometrial se realiza con el fin de controlar, mediante el aporte externo de progesterona, la ventana de implantación y sincronizar así el embrión y el endometrio.

Diferentes estudios relacionan los niveles de progesterona que se alcanzan en el día de la transferencia con los resultados de dichos ciclos, concluyendo que niveles bajos de progesterona podrían afectar de forma negativa en la consecución de un embarazo evolutivo.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## OBJETIVO:

Comprobar si en nuestras pacientes existe un punto de corte en el nivel de progesterona a partir del cual los resultados mejoran.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se ha realizado un estudio prospectivo en pacientes con preparación endometrial sustituida sometidas a ciclos de ovodonación con transferencias en fresco (OF) (n=47); transferencias de embriones vitrificados de ovodonación (OV) (n=92) o a transferencias diferidas de embriones propios (PV) (n=158). Todas ellas han sido transferencias de un único embrión.

El análisis de la progesterona se ha realizado el mismo día de la transferencia.

Se han analizado las variables siguientes: hCG positiva, embarazo evolutivo (EE) y aborto (A) para los tres grupos.

## RESULTADOS:

La media de progesterona en cada grupo es de OV= 14,33, OV= 15,23 y PV= 14,39, no existiendo diferencias significativas.

Las variables analizadas tienen los siguientes valores para cada grupo: OF (hCG: 54%; EE: 47%; A: 16%), OV (hCG: 54%; EE= 31%, A=42%) y PV (hCG= 48%; EE= 35%; A= 26%). Las diferencias entre grupos no son significativas en ninguna de las variables, excepto en la tasa de aborto, que es significativamente menor en las transferencias de ciclos de ovodonación en fresco (p-value=0.03).

Mediante un análisis de regresión logística obtenemos que el valor de la progesterona no tiene impacto en las tres variables en ninguno de los tres grupos: **OF:** OR hCG= 0.99; OR EE = 1.00; OR A= 1.00; **OV:** OR hCG= 0.99; OR EE= 1.00; OR A= 0.98; **PV** OR hCG= 1.00; OR EE= 0.98; OR A= 0.99.

## CONCLUSIONES:

En nuestras pacientes no existe, en ninguno de los grupos analizados, un punto del nivel de progesterona a partir del cual los resultados mejoren. Por lo tanto, el análisis de los niveles séricos de progesterona el día de la transferencia no supone ningún valor añadido a la hora de intentar optimizar nuestros resultados.

P-099 ▶

## D7: ¿MERECE LA PENA ESPERAR?

**A. Delgado Mendive, MJ. De Los Santos Molina, L. Alegre Ferri, B. Vallejo Villanueva, J. Serrano Notario, A. Mercader Bayarri**

IVI Valencia - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

La mejora en los medios de cultivo y la optimización de los laboratorios de fecundación in vitro (FIV), han permitido prolongar el cultivo embrionario hasta blastocisto en día 5, 6 o incluso día 7, siendo esta última opción poco frecuente.

## OBJETIVO:

Valorar la viabilidad y la aplicación en la práctica clínica diaria del cultivo embrionario a blastocisto hasta día 7 (D7).

## MATERIAL Y MÉTODO:

Este estudio incluye 32 pacientes del programa de criopreservación con transferencia de blastocistos vitrificados y desvitrificados en D7 (Cryotop®) (Kitazato®). En determinados

casos, por indicación clínica y dentro de las indicaciones habituales del programa de diagnóstico genético preimplantacional, se realizó biopsia de blastocisto en D7 mediante laser (Octax®) y se analizaron los mismos a través de Next Generation Sequencing (Illumina®). La clasificación de ASEBIR fue empleada para la categorización de los blastocistos. La preparación endometrial previa a la transferencia se llevó a cabo mediante ciclo natural o sustituido a criterio médico.

## RESULTADOS:

Se realizaron 32 transferencias con implantación conocida, 28 únicas (grupo A) y 4 dobles (grupo B). La tasa de gestación por blastocisto transferido fue del 39,28% (11/28) en el A y 100% en el B (4/4). La tasa de gestación evolutiva fue del 25% para el A (7/11) y del 100% para el B (4/4). La tasa de aborto en el grupo A fue del 36,3% (4/11), y no así en el grupo B, donde no se reportó

# COMUNICACIONES PÓSTERS

ningún aborto. De los 11 blastocistos del grupo A, se realizó TGP solo en uno de ellos, mientras que en el grupo B, fueron 4 los blastocistos analizados. Todos los abortos procedían de blastocistos sin TGP.

En cuanto a la clasificación embrionaria, se transfirieron 13 blastocistos calidad B (46,4%) y 15 calidad C (53,6%) en el grupo A. Para el grupo B, se transfirieron 4 blastocistos calidad B (50%) y 4 calidad C (50%). La tasa de implantación global para ambos grupos y por calidades fue del 58,8% para los de calidad B (10/17) y del 47,3% para la calidad C.

No existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a tasa de implantación entre los blastocistos con o sin TGP ( $p=0.25$ ), así como tampoco respecto a la tasa de implantación según la categorización morfológica del blastocisto ( $p=0.70$ ).

## CONCLUSIONES:

El escaso número de casos presentados podría influir sobre la significancia estadística, especialmente cuando se comparan los blastocistos con TGP y sin TGP. Respecto a la morfología del blastocisto, no parece influir de manera determinante respecto a las posibilidades de gestación. En cuanto a las tasas de gestación evolutiva, no son despreciables y, por lo tanto, el cultivo a blastocisto en D7 podría ser considerado como una opción para determinadas pacientes, especialmente las incluidas en el programa de diagnóstico preimplantacional. Debe estudiarse cada caso de manera individual y siempre bajo el criterio del embriólogo/a. Sería conveniente, además, disponer de más datos que permitieran implementar una clasificación morfológica más ajustada a este estadio embrionario, basada en los criterios de ASEBIR.

P-100 ▶

## INFLUENCIA DE LA PANDEMIA DE COVID-19 EN EL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

**J. Gijón de la Santa, P. Valenzuela Domínguez, T. Sánchez Arenas, C. Pérez Ortiz, M. De la Casa Heras, V. Badajoz Liébana**  
GINEFIV - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

El correcto diagnóstico de una muestra seminal debería ser uno de los parámetros más importantes a la hora de diagnosticar las causas de una posible infertilidad. Clásicamente, la valoración seminal se ha referido a parámetros relacionados con la morfología, concentración y motilidad espermática. Sin embargo, en los últimos años, con la aparición de diferentes técnicas, podemos valorar la integridad del material genético: el ADN es una estructura de doble hélice y su rotura puede ocurrir en una o en ambas hebras. Cuando hay un alto porcentaje de fragmentación, la tasa de fecundación ovocitaria disminuye y el posterior desarrollo embrionario puede verse afectado.

En el año 2020, en nuestro país, como en el resto del mundo, se inició una pandemia producida por el COVID-19. En su momento álgido, entre los meses de marzo y junio, en nuestro país se decretó un estado de alarma, confinamiento en los domicilios, y restricciones de la movilidad, con contadas excepciones.

### OBJETIVO:

Se considera que el aumento de la fragmentación del ADN espermático puede deberse a multitud de factores, no sólo fisiológicos (procesos febriles, varicocele), sino también ambientales (la alimentación, el estilo de vida, la contaminación ambiental, etc. Es en este caso, debido a la restricción de la movilidad, donde podría haberse visto afectada la calidad seminal. Por tanto, dado que la producción de los espermatozoides dura aproximadamente 74 días, sería interesante estudiar este parámetro la tasa de fragmentación de ADN espermático, durante los 3 meses siguientes a estas restricciones.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio sobre pacientes que han realizado un primer ciclo de FIV sin éxito, tras el cual se les pide ampliar el estudio andrológico analizando el índice de fragmentación de ADN, mediante la técnica de COMETA, valorándose la tasa de fragmentación del ADN espermático de doble cadena.



# COMUNICACIONES PÓSTERS

Todos los pacientes recogieron la muestra en las mismas condiciones de obtención.

## Dividimos a los pacientes en los siguientes grupos:

**A:** pacientes que realizaron un estudio de fragmentación de doble cadena un año antes del periodo de confinamiento (junio, julio y agosto de 2019)

**B:** pacientes que realizaron un estudio de fragmentación de doble cadena justo después del confinamiento (junio, julio y agosto de 2020)

**C:** pacientes que han realizado un estudio de fragmentación de doble cadena a lo largo de este año 2021 (enero, febrero y marzo de 2021)

Resultados:	A (junio-agosto 2019)	B (junio-agosto 2020)	GRUPO C (Año actual-2021)
Número de casos	112	59	86
Índice de Fragmentación del ADN espermático	69,69%	65%	66,85%
Significación estadística	Grupo A vs B	Grupo B vs C	Grupo A vs C
	0.01945 *	0.2418	0.081

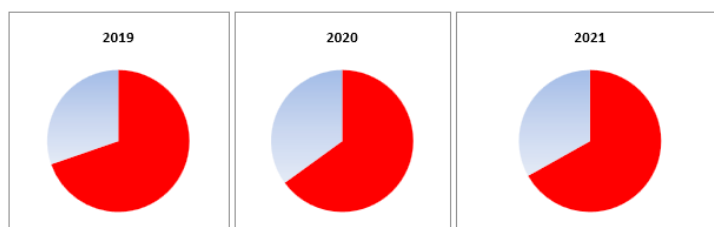
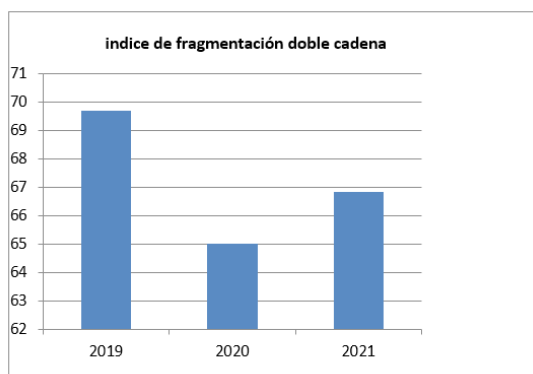
## CONCLUSIONES:

El índice de fragmentación de ADN espermático disminuyó a lo largo de los meses posteriores al confinamiento, si lo comparamos con el mismo periodo del año anterior; observando diferencias estadísticamente significativas.

Al realizar el seguimiento de este índice en el presente año, con el retorno a la actividad habitual: con desplazamientos y mayor exposición a la contaminación ambiental, observamos

un aumento del índice de fragmentación con respecto a los valores post-confinamiento; que, si bien no representa diferencias significativas, permite apreciar cierta tendencia a la vuelta a los valores de partida.

Quizás una ampliación del estudio con una mayor proporción de pacientes/datos nos permitiera observar una significación estadística donde ahora sólo se observan tendencias, que relacione esa disminución de actividad y contacto con tóxicos con efectos beneficiosos sobre la calidad seminal.



## MOSAICISMO Y PGT-A: ¿QUÉ PODEMOS ESPERAR DE ESTOS EMBRIONES?

**M. Borrallo Fernández, I. Carreño Pérez, S. Molero Romero, JP. Iglesias Rodríguez-Aguilar, A. Bermejo de la Calzada, R. Vázquez Agüero**

MINIFIV - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

El mosaicismismo se define como la presencia, en mismo individuo, de al menos dos poblaciones celulares con genotipos distintos que proceden del mismo óvulo fecundado. Esta variación puede afectar a cromosomas completos, al número de copias o a variantes estructurales, de nucleótidos pequeños o epigenéticas.

El mosaicismismo ocurre durante la mitosis, tras la fecundación, y es causa de aborto espontáneo, anomalías congénitas, retrasos del desarrollo e incluso cáncer.

Actualmente, numerosos estudios sugieren que la transferencia de embriones mosaico podría dar lugar a recién nacidos vivos sanos, apoyando la hipótesis de un mecanismo de autocorrección; si bien las tasas de embarazo publicadas son significativamente menores respecto a las obtenidas con embrión euploide.

### OBJETIVO:

Hacer una revisión bibliográfica exhaustiva donde se analicen diversos estudios científicos que se basen en el impacto del mosaicismismo y su prevalencia en los blastocistos humanos.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Revisión en bases de datos de PubMed y Google Scholar entre 2017 y 2021, así como las referencias de los artículos identificados con el objetivo de no perder citas relevantes. Se han usado las palabras clave "chromosomal mosaicism", "human", "embryo", "blastocyst".

### RESULTADOS:

Varios estudios han observado que las anomalías no siempre son uniformes en el trofoectodermo de un mismo blastocisto, por lo que estimar el grado preciso y la prevalencia del mosaicismismo basado en una sola biopsia es complicado. Sí se ha demostrado en todos los estudios es que un blastocisto diagnosticado como mosaico mediante PGT-A puede considerarse como tal.

Mediante la biopsia de trofoectodermo y análisis con técnica NGS se han detectado de un 2 a un 13% de embriones mosaicos en estadio de blastocisto. Sin embargo, mediante la disgregación de embriones completos, se han detectado que el mosaicismismo podría afectare hasta en el 50% de los blastocistos analizados, por lo que establecer la verdadera prevalencia del mosaicismismo en blastocistos humanos sigue siendo un gran desafío.

Cuando se realiza NGS frente a aCGH o a FISH, los resultados obtenidos son más fiables y la detección del mosaicismismo más precisa, por lo que hay que prestar especial atención cuando se clasifican blastocistos como anormales cuando realmente son mosaico. Esto puede ser debido a un límite de detección demasiado bajo según la técnica utilizada.

Estudios recientes han demostrado que las tasas de embarazo mejoran tras un PGT-A analizado con NGS respecto a aCGH debido a la reducción en la tasa de falsos positivos (embriones aneuploides). Sin embargo, las pacientes sometidas a PGT-A con NGS tienen menos embriones transferibles al aumentar la precisión del análisis.

En los ciclos de reproducción asistida en los que no se analizan cromosómicamente los embriones, inevitablemente se estarán transfiriendo embriones mosaico. Sin embargo, no hay evidencia de que haya un aumento de mosaicismismos en niños nacidos tras TRA. Esto apoyaría la hipótesis de que los embriones mosaico podrían dar lugar a embarazos viables con recién nacidos vivos sanos, gracias a la capacidad de repararse en estadios más avanzados.

La transferencia de un blastocisto mosaico requiere un asesoramiento genético y un seguimiento del embarazo acompañado de pruebas adicionales que diagnóstico prenatal. Los pacientes candidatos a transferir un embrión mosaico deben ser informados de los posibles riesgos, como una tasa más elevada de aborto frente a la transferencia de un embrión euploide.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## CONCLUSIONES:

Las nuevas tecnologías de detección de anomalías cromosómicas han hecho que la toma de decisiones respecto a los embriones con mosaicismos sea más compleja que antes, cuando se clasificaban como euploide o aneuploide.

Es clave lograr una estandarización de los criterios y prácticas clínicas con estos embriones mosaico para proporcionar a profesionales y pacientes una mejor toma de decisiones basada en la evidencia.

P-102 ▶

## TESTICULAR SPERMATOZOA IN OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIC MEN: A COMPARISON OF ICSI OUTCOMES BETWEEN DONOR AND AUTOLOGOUS OOCYTES

A. Parrella NA, Y. Galiana Briones, B. Ramos Mas, L. Medrano, A. García Sifre, J. Aizpurua  
IVF Spain Alicante - Alicante (Alicante)

## INTRODUCTION:

Testicular biopsy is the most suitable technique to yield spermatozoa from azoospermic men. Although it has been shown that the testicular spermatozoa have an intact genome, still little is known on the capability of these to generate a healthy embryo capable of implant and generate a pregnancy. With this study we aim to gain more information on the reproductive capability of testicular biopsy to generate euploid embryos and clinical pregnancies in autologous and donor-oocytes cycles.

## OBJECTIVE:

Couples whose male partners were diagnosed with obstructive azoospermia underwent ICSI cycles with spermatozoa obtained from testicular sperm extraction (TESE) retrieved on the day of oocyte retrieval. Fertilization and clinical outcomes were compared between cycles with autologous (AS) oocytes and those with donor (DR) oocytes. In addition, euploid rate was compared in couples who underwent preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A).

## MATERIAL AND METHOD:

From January 2019 to March 2021, couples underwent ICSI cycles with testicular biopsy using donor or autologous oocytes. Testicular biopsy was performed in the standard fashion and embryo aneuploidy was assessed by PGT-A.

Implantation rate, Clinical Pregnancy Rate (CPR) and delivery rate were calculated per transferred embryo. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation, and categorical data was expressed as percentages. The Pearson Chi-square was used for categorical variables. All analyses were conducted using SPSS software and a  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS:

A total of 75 couples (Men:  $38 \pm 4$  years old; Female:  $36.7 \pm 6$  years old) underwent 95 TESE-ICSI cycles, and the men had a semen concentration of  $0.4 \pm 1 \times 10^6/\text{mL}$  and  $4 \pm 3\%$  motility. Of these, 17 couples underwent 18 ICSI cycles with AS oocytes while 23 couples underwent 25 ICSI cycles with DR oocytes. Comparable fertilization rate was found between AS and DR group being these 63.4% (71/112) and 67.1% (210/313), respectively ( $P = \text{NS}$ ) with a blastocyst rate of 49.7% (34/71) in AS and 67.1% (83/210) in DR group ( $P = \text{NS}$ ). The implantation rate was 31.2% (5/16) and 50.0% (17/34) while CPR was 25% (4/16) and 47% (16/34) in AS and DR group, respectively, showing no statistical difference. The delivery rate rose from 18.7% (3/16) in AS group to 35.2% (12/34) in DR group, although not significantly different. Same pregnancy loss was seen in both groups, showing 25% (1/4) in AS and 25% (4/16) in DR group ( $P = \text{NS}$ ).

In addition, a total of 35 couples underwent 52 ICSI cycles with PGT-A. Of these, 22 couples underwent 38 cycles with AS oocytes and 13 couples underwent 14 cycles with DR oocytes. No significant difference was found in fertilization rate, 64.3%

# COMUNICACIONES PÓSTERS

(164/255) versus 69.2% (117/169) and blastocyst rate, 36.0% (59/164) versus 41.9% (49/117) in AS and DR group, respectively. However, the euploidy rate increased significantly from 35.6% (21/59) in AS groups to 64.6% (31/48) in DR groups ( $P<0.01$ ). After the euploidy embryos replacement, same implantation rate was achieved in AS and in DR groups being these 66.9% (6/9) and 66.6% (8/12), respectively. CPR was 55.5% (5/9) in AS group and 66.6% (8/12) in DR group that resulted all in healthy pregnancies.

## CONCLUSIONS:

This study confirms that testicular retrieved spermatozoa of obstructive azoospermic men have the same capability to generate pregnancies in cycles with AS and DR oocytes. Nevertheless, cycles with donor oocyte yield a higher number of euploid embryos. Therefore, the patients should be aware that using donor oocytes will increase the chance to have an euploid blastocyst at the 1st ICSI attempt.

P-103 ▶

## ¿TIENEN MAYOR PROBABILIDAD DE EMBARAZO LAS PACIENTES CON MAYOR NÚMERO DE OVOCITOS MADUROS?

**A. Pérez Esteban, I. Cuevas Saiz, C. Olmedo Illueca, P. Pascual Utiel, S. Royo Bolea, L. Abad de Velasco, M. Barea Gómez**

Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (Valencia)

## INTRODUCCIÓN:

Tras una punción folicular es común encontrar tanto ovocitos maduros como inmaduros. Sin embargo, el porcentaje de madurez encontrado en la cohorte de ovocitos extraídos varía notablemente entre pacientes. Aunque algunos autores afirman que al obtener un mayor número de ovocitos las probabilidades de embarazo aumentan, también debemos tener en cuenta la madurez de los ovocitos recuperados.

## OBJETIVO:

Este estudio tiene como objetivo principal averiguar si el número de ovocitos maduros respecto al total de obtenidos influye en la tasa de embarazo de las pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODO:

Se llevó a cabo un análisis retrospectivo de los datos recogidos de 892 pacientes a las que se les realizó un primer, segundo o tercer ciclo de Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con transferencia en fresco en el tiempo comprendido entre mayo de 2005 y diciembre de 2012 y desde enero de 2015 hasta diciembre de 2020.

Se incluyeron en el estudio pacientes con diferentes causas de esterilidad: el 19,4% debido a factor masculino, el 29,7%

por factor femenino, el 24,0% de factor mixto, el 25,6% con esterilidad de origen desconocido, el 0,5% habían sido diagnosticadas con ovario poliquístico y en el 0,75% restante mujeres sin pareja masculina. Se excluyeron los ciclos en los que se realizó FIV convencional. La edad media de las pacientes que se sometieron a este tratamiento fue de  $34,93 \pm 3,53$  años, poseyendo un valor promedio de Antimülleriana (AMH) de  $2,24 \text{ ng/ml} \pm 1,84$ .

La media de ovocitos recuperados fue de  $7,49 \pm 4,21$  ovocitos, de los cuales  $6,27 \pm 3,58$  se pudieron microinyectar, obteniendo, finalmente, un total de  $3,91 \pm 3,42$  gametos fecundados. El estudio se dividió en dos grupos en función del resultado de embarazo clínico positivo (grupo 1) o negativo (grupo 2). El porcentaje de ovocitos maduros se calculó como el número de ovocitos MII dividido por el total de ovocitos obtenidos en la punción y multiplicado por 100. Se utilizó el incubador MIRI-TL® (Esco Medical, Dinamarca) para realizar un seguimiento de los embriones durante todo su desarrollo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa SPSS (V25.0, IBM STATISTICS).

## RESULTADOS:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de gestación bioquímica ( $\beta$ -hCG positiva) ( $p$ -valor=0,008) según el porcentaje de ovocitos maduros recuperados entre los grupos ( $87,93\% \pm 15,90$  grupo 1 vs.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

84,69%  $\pm$  18,75 en el grupo 2). No hubo diferencias en cuanto a la gestación clínica.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de madurez con respecto a la tasa de aborto ( $p$ -valor=0,83).

## CONCLUSIONES:

Estos resultados demuestran que la tasa de embarazo es mayor cuando encontramos mayor porcentaje de ovocitos maduros. Además, el número de ovocitos maduros no afecta a la tasa de aborto.

P-104 ▶

## ¿PUEDE SER EL MOMENTO DE LLEGADA A BLASTOCISTO Y LA CALIDAD EMBRIONARIA UN INDICADOR DE LA PLOIDÍA EMBRIONARIA?

**E. Martínez Sanz, O. Aguirre Landaluce, M. de las Heras Martínez, O. Gómez Picado, R. Celis García, I. Romero Romeo, G. Barrenetxea Ciarrusta**  
Reproduccion Bilbao - Bilbao (Vizcaya)

### INTRODUCCIÓN:

Es conocido que existen diferencias en las probabilidades de implantación basadas en el estatus cromosómico del embrión, pero cuando los embriones transferidos son euploides los resultados entre los diferentes autores en función de la calidad y el ritmo evolutivo pueden ser muy variables.

Capalbo, A. et al, [1] no encuentra diferencias significativas en la tasa de implantación cuando se transfieren embriones euploides con la misma categoría e independientemente del día que el embrión logra llegar a estadio de blastocisto expandido (BE) y sin embargo Mohamed, I. et al, [2] sí las encontró. Aunque los diferentes sistemas de clasificación embrionaria pueden ser los causantes de algunas de las diferencias encontradas, si parece que la llegada a estadio de BE parece ser un hecho más objetivo.

Pero incluso considerando únicamente un sistema de clasificación en este caso (ASEBRI), podemos encontrar diferencias en la tasa de euploidía atendiendo al momento de llegada a BE.

### OBJETIVO:

Conocer si efectivamente existen diferencias significativas en la tasa de implantación en función del momento en el que el embrión alcanza el estadio de BE así como de la calidad embrionaria

### MATERIAL Y MÉTODO:

185 parejas analizaron los embriones resultantes de sus tratamientos, todos los embriones que lograron llegar a estadio de BE fueron analizados, concretamente 651 embriones. couples analyzed their embryos during this period. Todos los embriones fueron cultivados en incubadores video time-lapse (Embryoscope TM) y se les realizó la biopsia mediante ayuda del láser (RY Laser System). El estado genético de los embriones fué determinado mediante tecnología NGS.

Se utilizó la clasificación de ASEBIR para determinar la calidad embrionaria.

Los embriones fueron clasificados en 4 grupos en función de la calidad y el día de llegada a blastocisto Good Quality (A+B) en día 5 (N=221) GQ5, Medium Quality (C) en día 5 (N=69) MQ5, Good Quality (A+B) en día 6 (N=131) GQ6 y Medium Quality (C) en día 6 (N=230) MQ6.

### RESULTADOS:

Las tasas de euploidía fueron 44.34% y 36,64%, para los grupos GQ5 y GQ6 respectivamente. Y 18.84% and 20.87% respectivamente para MQ5 Y MQ6 respectivamente.

La tasa de embarazo evolutivo fué 46.88% y 50%, para GQ5 y GQ6 respectivamente. Y 25% y 6.45% para MQ5 y MQ6 respectivamente.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

La tasa de euploidía muestra diferencias significativas entre los grupos GQ5 vs MQ5 ( $p < 0.05$ ) y también entre los grupos GQ5 vs MQ6 ( $p < 0.05$ ). También cuando comparamos GQ6 con cualquiera de los grupos MQ5 y MQ6 ( $P < 0.05$ ).

La tasa de embarazo evolutivo mostró diferencias significativas entre los grupos GQ5 vs MQ6 ( $p < 0.05$ ), y no significativas cuando se comparan los grupos GQ5 vs MQ5 ( $P > 0.05$ ).

Por último, la tasa de embarazo evolutivo también mostró diferencias cuando se comparan los grupos GQ6 y MQ6 ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONES:

Cuando los embriones son clasificados en cualquiera de los grupos de buena calidad (GQ5 o GQ6) tanto la tasa de

euploidía así como la tasa de embarazo evolutivo son similares independientemente del tiempo que el embrión emplee en llegar a estadio de BE.

Cuando los embriones son clasificados dentro de los grupos de calidad media (MQ5 o MQ6) la tasa de euploidía dentro de estos grupos es similar, sin embargo, la tasa de embarazo evolutivo es más alta (con diferencias significativas) para los embriones biopsiados en D5. Es posible que la diferencia hallada entre estos dos grupos pueda ser debido a diferencias en los protocolos de desvitrificación y transferencia.

El limitado número de casos en algunos grupos como MQ6 hace que las diferencias no sean significativas a pesar de que claramente hay diferencias clínicas.

P-105 ▶

## DIFERENCIAS EN LA MORFOCINÉTICA EMBRIONARIA SEGÚN EL ORIGEN POBLACIONAL

**A. Rabanal Anglada, M. Casaldàligat, A. Paricio Vallespí, M. Díaz Morales, J. Pino Sánchez, T. Torrecillas Testa, M. Grossmann Camps**  
Barcelona IVF - Barcelona (Barcelona)

### INTRODUCCIÓN:

El beneficio del time-lapse es innegable por el cultivo sin interrupciones y la información del desarrollo embrionario. Sin embargo, nos planteamos si los algoritmos desarrollados pueden ser aplicados a todos los embriones independientemente del origen poblacional de los óvulos.

### OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es determinar si la procedencia étnica puede influir en la morfocinética embrionaria y en consecuencia, en la predicción del embrión óptimo a transferir

### MATERIAL Y MÉTODO:

Estudio retrospectivo (2017-2021) de ciclos FIV con óvulos de donante de origen poblacional africano subsahariano (GI) y óvulos de donante de origen poblacional caucásico (GII). Se admiten pacientes con parámetros seminales normales.

En ambos grupos se estudian los siguientes parámetros morfocinéticos: tPNa, tPNf, t(2), t(3), t(4), t(5), t(M) y tB. Los embriones fecundados se cultivaron con medios secuenciales (Vitrolife®) hasta D+5 en Embryoscope

### RESULTADOS:

Grupo I:  $n = 175$  embriones; Grupo II:  $n = 244$ . Parámetros morfocinético GI/GII: tPNa (8.9/10.1); tPNf (21.7/22.6); t(2): (24.7/25.6); t(3): (35.2/36.6); t(4): (36.2/37.5); t(5): (47.2/49.5); t(M): (85.7/88.6); y tB: (105.1/107.3).

### CONCLUSIONES:

Observamos diferentes velocidades embrionarias en función del origen poblacional. Los eventos del grupo I son más rápidos que los del grupo II en. Esto puede afectar a la predicción del embrión con más potencial implantatorio si tenemos en cuenta únicamente los algoritmos morfocinéticos que existen en la actualidad.

## PUEDA EL MEDIO CONTINUO EN BAJA CONCENTRACIÓN DE LACTATO REDUCIR LAS ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS Y MEJORAR EL PORCENTAJE DE EUPLOIDÍA

Y. Franco Iriarte, A. Villa Milla, R. Gay Fernández -Vegué, F. Sotos Borrás, E. Carrillo de Albornoz Riaza, B. Buelo Olaia, A. Rexach Vega, V. Cabezuelo Sanchez, G. Bescos Villa, ME. Suárez Agustín

Hospital Ruber Internacional - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

El metabolismo embrionario depende inicialmente del piruvato como principal fuente de energía, mientras que, tras compactación embrionaria, momento de activación genómica, la glucosa es el principal sustrato energético. Las concentraciones de lactato y piruvato son críticas en la regulación del piruvato y glucosa observándose en embriones bovinos y de ratón mejor desarrollo si la concentración de lactato es baja y menos aneuploidias. Un aumento en la concentración de lactato en el medio podría tener un efecto deletéreo en el metabolismo embrionario por inhibir la conversión de piruvato a lactato, así como la regeneración de NAD<sup>+</sup> que es un factor imprescindible para la glicolisis. Esta inhibición provoca una falta de energía que es necesaria para las sucesivas divisiones celulares hasta estado de blastocisto y por lo tanto provocar divisiones anómalas ante la falta de energía.

### OBJETIVO:

El objetivo del estudio es determinar si una baja concentración de lactato produce mejor tasa de blastocisto en humanos, así como más embriones euploides

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó un estudio prospectivo con 55 ciclos de pacientes mediante el uso de dos medios únicos diferenciándose ambos en la concentración de lactato. Todos ellos partían de un número mínimo de 8 ovocitos. Los óvulos de la misma paciente se distribuyeron a partes iguales midiendo principalmente la tasa de blastocisto de buena calidad, tasa de vitrificación y tasa de euploidia. Valoramos en función del procedimiento FIV u ovodon esos mismos parámetros sabiendo que en nuestra rutina aplicamos DGP a mujeres para FIV mayores de 38 años. Se estudió la frecuencia de las distintas variables para valorar el efecto que pudiera tener la baja concentración de lactato en los resultados clínicos.

### RESULTADOS:

Un total de 326 óvulos fueron cultivados en medio único con baja concentración de lactato (medio CSCM-NX) siendo 211 procedentes de ciclos de FIV y 115 de ciclos de ovodon. Por otra parte, un total de 305 óvulos fueron cultivados en medio único con concentración de lactato estandar (medio Geri), 193 procedentes de FIV convencional y 112 de ovodonación, cultivándose todos los ovocitos en condiciones de humedad y oxígeno del 5%. El número de blastocistos totales obtenidos en ambos grupos fue 139 (53%) para CSCM-NX y 134 (55%) para Geri no observando diferencias entre ambos grupos de medios y siendo similar tanto en FIV como en ovodon. Al estudiar la calidad embrionaria se observó que un 50% eran de calidad óptima con CSCM-NX frente al 48% obtenido con el medio Geri observando una ligera mejora con el medio CSCM-NX. El mismo resultado se obtuvo al analizar la tasa de blastocistos vitrificados. Cuando analizamos la tasa de euploidia con ambos medios en el grupo de ovodonación encontramos una tasa de euploidia del 60% en Geri mientras que la tasa asciende al 80% con el medio CSCM-NX. Los resultados muestrales ponen de manifiesto un incremento en la tasa de éxito de un 20% lo cual es clínicamente relevante en el grupo de ovodonación.

### CONCLUSIONES:

Un exceso de lactato en el medio puede contribuir a un estrés injustificado para el embrión. La disminución de la concentración mejora ligeramente los blastocistos de buena calidad disminuyendo el estrés para el embrión y sus posibles aneuploidias mitóticas hecho reflejado en el grupo de ovodonación. Por otra parte, esta diferencia no se evidencia en el grupo de FIV, ya que las biopsias se realizan de manera rutinaria en pacientes mayores de 38 años y la importancia del ovocito y su calidad es mucho más evidente en este grupo de pacientes

### BIBLIOGRAFÍA:

*Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. J Physiol 558.1 (2004)pp 5-30*

**M. Martínez Sáez, J. Ávila Medina, M. Hebles Duvison, M. Lastra Salazar, G. Nuñez Rivas, L. Aguilera Duvison, P. Sánchez Martín, F. Sánchez Martín**  
Clínica GINEMED - Sevilla (Sevilla)

### INTRODUCCIÓN:

El cultivo a blastocisto se ha instaurado en la práctica clínica habitual en los laboratorios de Reproducción Humana Asistida. A pesar de los muchos estudios realizados a lo largo de los años que comparan los resultados de las implantaciones en los distintos días de evolución, el beneficio de realizar transferencias embrionarias en día +5 sigue siendo controvertido.

La transferencia en día +5 conlleva ventajas e inconvenientes. Entre las ventajas encontramos la sincronización de los embriones en día +5 con el endometrio de la paciente. El entorno uterino es más adecuado para los embriones en una etapa de blastocisto, por lo que la transferencia sería más análoga a un ciclo natural y permitiría al embrión superar las alteraciones en la receptividad del endometrio de un entorno uterino hiperestimulado debido a la estimulación ovárica para IVF. Otras de las ventajas de extender el cultivo hasta blastocisto es que permite la autoselección del embrión a través de una activación del ADN embrionario que ocurre en día +2 y día +3.

El principal inconveniente del cultivo a blastocisto es que debido a las diferencias entre el cultivo in vitro y el entorno uterino, un porcentaje considerable de embriones no logran alcanzar la etapa de blastocisto en el cultivo. Esto se traduce en mayor número cancelaciones de ciclo y un menor número de embriones criopreservados después de un ciclo.

### OBJETIVO:

El objetivo de nuestro estudio se centra en ver cuándo es mejor y según qué casos es mejor transferir en día +3 o +5 para así poder disminuir la tasa de cancelación de ciclos y poder seguir avanzando en mejorar en los protocolos de actuación en las clínicas de reproducción asistida.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Para realizar este estudio se han analizado los datos de todos los ciclos desde el 2017 hasta el 2020 de una clínica de Reproducción Asistida. Se realizaron las siguientes comparaciones:

1. Según cantidad de embriones transferidos
2. Según Cantidad de embriones evolutivos en día +3

Se procedió a realizar un metaanálisis de: la tasa de cancelación (por no tener embriones evolutivos aceptables para transferir) y la tasa de beta, eco, parto, aborto y RNV (siendo este último obtenido como número de fetos /número de embriones transferidos)

### RESULTADOS:

**Gráfico 1.** Cancelados: De los 272 ciclos cancelados por no tener embriones evolutivos disponibles para transferir:

- Un 53% tenían menos de 2 embriones evolutivos en D+3.
- Un 27% entre 2 y 3 embriones en D+3.
- Un 20% 4 o más embriones en D+3.

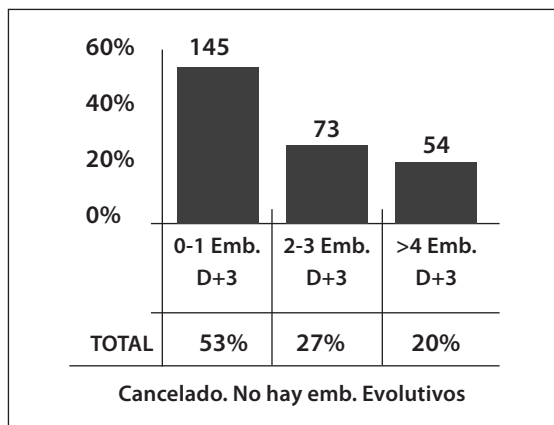
**Gráfico 2.** De los 1267 ciclos que se analizan, hay mayor número de ciclos con más de 4 embriones en D+3.

- 0-1 emb en D+3: no hay diferencias ya que la n es pequeña. Mejor transferir en día 3 si tenemos en cuenta las cancelaciones de ciclos
- 2-3 emb en D+3: mejor en día 3 (aunque no es significativo) si sumamos las cancelaciones.
- >4 emb en D+3: habría que valorar cada caso. Hay más RNV en día +5, pero menos PARTOS y significativamente más ABORTOS

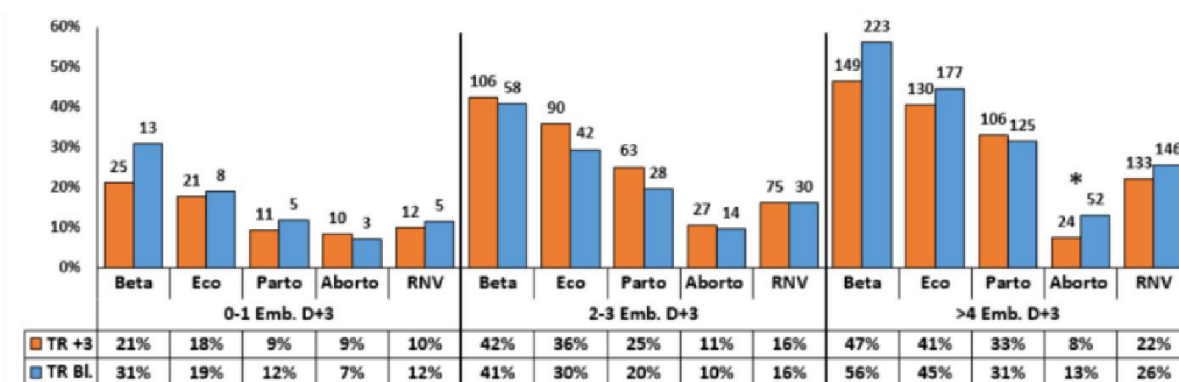


# COMUNICACIONES PÓSTERS

**Gráfico 1.** Ciclos cancelados (según CANTIDAD emb. en D+3)



**Gráfico 2.** Resultados según CANTIDAD emb. en D+3



## CONCLUSIONES:

A priori no hay diferencias significativas entre la transferencia en día +3 y día +5 en mujeres con un número limitado de embriones en desarrollo. Sin embargo, si tenemos en cuenta la tasa de cancelación, la transferencia en día +3 tiene una ventaja

notable frente a la transferencia en la etapa de blastocisto, ya que esta última se ha relacionado con un aumento significativo de las cancelaciones del ciclo. Se necesitan más estudios para optimizar el cultivo y la transferencia de embriones, y se deben probar estrategias adicionales para aumentar las tasas de embarazo y de nacimientos vivos de estos pacientes.

## RELACION DE LA CALIDAD EMBRIONARIA Y DÍA DE LA TRANSFERENCIA CON LA TASA DE EMBARAZO

**A. Armiñana Roca, T. Rubio Asensio, V. Masedo García, C. Orjuela Gasca, N. Castelló Martínez, S. Malkhasian, F. Anaya Blanes**

UR LA VEGA - Murcia (Murcia)

### INTRODUCCIÓN:

La calidad embrionaria es uno de los factores más estudiados en los ciclos de Reproducción Asistida, se determina mediante el análisis de la morfología y cinética de los embriones y permite seleccionar los embriones con mayor probabilidad de generar embarazo.

Sin embargo, aunque la tendencia actual es realizar cultivo largo y transferencia en D+5 para mejorar la selección morfológica todavía se hacen transferencias en D+3 en pacientes seleccionadas.

### OBJETIVO:

Estudiar la influencia de la calidad embrionaria y el día de la transferencia en mujeres menores de 38 años y mujeres de 38 años en adelante. Para ello, se han estudiado ciclos de ICSI y FIV convencional en los que se ha realizado transferencia en fresco.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Se realiza una revisión retrospectiva de los ciclos realizados entre los años 2017 y 2019, en los que se ha realizado ICSI y FIV convencional con ovocitos propios. En el estudio se ha tenido en cuenta los ciclos con transferencia en cultivo corto y largo de un único embrión (SET).

El cultivo embrionario se ha realizado de forma secuencial utilizando medios de cultivo G1-plus y G2-plus de la marca Vitrolife, y cultivo único con el medio Geri de MERCK. Las condiciones de cultivo han sido 37°C y un 6% de CO<sub>2</sub>.

El número de ciclos estudiados es de 275, divididos según rango de edad de las pacientes. Se establecen dos grupos: grupo 1 (162 ciclos) mujeres menores de 38 años y grupo 2 (113 ciclos) mujeres con 38 años o más.

Se analiza la calidad de los embriones según criterios de ASEBIR, día de la transferencia embrionaria, edad de las pacientes y tasa de embarazo. Análisis estadístico con Chi-cuadrado(X<sup>2</sup>).

### RESULTADOS:

En el grupo 1 la tasa de embarazo general fue de un 69,4% del total de casos estudiados. Siendo el porcentaje de embarazo para D+3 igual a 63,2% (N=49) y para D+5 un 67,7% (N= 79). En este grupo la calidad embrionaria A generó un 71,4% (N=40) de tasa de embarazo, la calidad B un 64,7% (N=89) y la C un 85,7% (N=33).

En el grupo 2 la tasa de embarazo general fue del 30,6%. Para transferencias en D+3 la tasa de embarazo fue de un 36,8% (N=37) y para D+5 del 32,3% (N=54). La calidad embrionaria A dio un 28,6% de embarazo (N=24), calidad B un 35,3% (N=66) y la calidad C 14,3% (N=22).

No se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados. (P>0.05).

### CONCLUSIONES:

En primer lugar, vemos que existe una diferencia en la tasa de embarazo según la edad de las pacientes, lo que confirma que la edad materna es determinante para conseguir una gestación (69,4% vs 30,6%).

Si comparamos ambos grupos de edad para la calidad embrionaria observamos que, las mujeres menores de 38 años mantienen una buena tasa de implantación para todas las calidades, incluso con embriones C (85,7%). Sin embargo, la tasa para embriones C en mujeres mayores desciende hasta un 14,3%.

En cuanto al día de la transferencia, el D+5 da mejores resultados en pacientes menores de 38 años vs mayor o igual a 38 años.

En base a los datos iniciales obtenidos, las mujeres > 38 años podrían beneficiarse de la transferencia en D+3 cuando el embrión presenta una calidad A-B, con embriones C la probabilidad de implantación disminuye considerablemente. Aumentaremos el número de casos para buscar significación estadística.

# COMUNICACIONES PÓSTERS

P-109 ▶

## LAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA MEJORAN EL PORCENTAJE DE EUPLOIDIA CON RESPECTO A LOS MÉTODOS CONVENCIONALES.

Y. Franco Iriarte, A. Villa Milla, R. Gay Fernández -Vegué, F. Sotos Borrás, E. Carrillo de Albornoz Riaza, B. Bueno Olaia, E. Meliá Fullana, A. Rexarch Vega, MP. Vicente Galindo, G. Bescós Milla

Hospital Ruber Internacional - Madrid (Madrid)

### INTRODUCCIÓN:

Hoy en día, los test moleculares están siendo requeridos para completar la evaluación andrológica y la integridad del ADN espermático. En este contexto marcadores apoptóticos como es la activación de caspasas, externalización de fosfatidilserina, alteraciones del potencial de membrana mitocondrial y fragmentación de ADN son los marcadores comúnmente más testados. Particularmente hay un aumento de datos clínicos mostrando una negativa correlación entre fragmentación elevada de ADN y éxito en técnicas de reproducción. Se ha afirmado que los espermatozoides aneuploides pueden desencadenar fragmentación de ADN bloqueando el desarrollo espermático y produciendo una célula espermática inefectiva correlacionando la alta fragmentación de ADN con bajo porcentaje de embarazo y de implantación y encontrando incluso en sémenes normales una alta fragmentación de ADN no sólo simple sino doble que se asocia a mayor porcentaje de aneuploidia.

### OBJETIVO:

Determinar en casos de DGP si el uso de técnicas de selección espermática: gradientes, MACS y microfluidos favorecen una mayor probabilidad de euploidia en embriones en fase de blastocisto.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Este estudio retrospectivo incluye el período 2017-2020 donde se han realizado 248 test de aneuploidías mediante NGS en biopsias de blastocistos pertenecientes a 212 pacientes. Se realizaron gradientes en pacientes sin ningún tipo de patología, MACS en pacientes con fragmentación simple y pacientes que a pesar de tener una fragmentación normal tenían varios ciclos de FIV previos fallidos y en pacientes de aplicación regular en el último año. En pacientes con fragmentación doble el uso de microfluidos fue la técnica seleccionada. Tras la aplicación de la técnica correspondiente se analizó el porcentaje de embriones euploides en tres grupos distintos: menores de 38 años, mayor o igual a 38 años y ovodonación.

Tabla 1. Resultados (ver página siguiente)

		PGT-A EN BLASTOCISTOS									
		FIV < 38			FIV ≥ 38			OVODÓN			
		MACS	CHIPS	GRAD/S.UP	MACS	CHIPS	GRAD/S.UP	MACS	CHIPS	GRAD/S.UP	
2017	Nº CICLOS PGT	4	1	0	8	2	7	1	0	1	24
	BLASTOS BIOPS	18	7	0	26	7	22	7	0	9	
	BLASTOS SANOS	8	3	0	8	0	5	3	0	5	
2018	Nº CICLOS PGT	5	2	4	14	5	9	2	2	1	44
	BLASTOS BIOPS	24	4	17	44	26	38	14	8	6	
	BLASTOS SANOS	12	1	5	9	2	8	13	5	3	
2019	Nº CICLOS PGT	3	1	3	30	3	26	4	2	5	77
	BLASTOS BIOPS	12	4	7	111	10	78	30	10	32	
	BLASTOS SANOS	3	2	3	24	2	26	20	7	19	
2020	Nº CICLOS PGT	5	4	2	30	23	31	2	4	2	103
	BLASTOS BIOPS	20	12	6	108	67	88	4	18	2	
	BLASTOS SANOS	19	7	3	36	24	27	4	13	1	
TOTAL	Nº CICLOS PGT	17	8	9	82	33	73	9	8	9	248
	BLASTOS BIOPS	74	27	30	289	110	226	55	36	49	896
	BLASTOS SANOS	42	13	11	77	28	66	40	25	28	330
	% Euploidia	56,80%	48,10%	36,70%	26,60%	25,50%	29,20%	72,70%	69,40%	57,10%	

# COMUNICACIONES PÓSTERS

## RESULTADOS:

De un total de 896 embriones biopsiados, 625 provienen de mujeres mayores de 38 años donde 171 fueron euploides (36,8%). En 34 ciclos menores de 38 años 131 blastocistos fueron analizados con un 50,38% de euploidia mientras que en ovodonación 140 blastocistos fueron analizados con un 66,43% normales. Analizando la técnica de selección espermática dentro de cada grupo, observamos que en menores de 38 años el porcentaje de euploidia es un 20% mayor que con gradientes. En este mismo grupo el uso de CHIPS supone un 11% de diferencia. Si comparamos en el grupo de ovodonación las MACS favorecen en un 16% la tasa de euploidia y utilizando CHIPS ese porcentaje es de un 12% con respecto a los gradientes. En el grupo de mujeres mayores de 38 años esas diferencias con respecto a la técnica convencional no se produce. (Tabla 1)

## CONCLUSIONES:

El estudio en profundidad del semen, concretamente la valoración de la fragmentación tanto de cadena simple como doble, ofrece una visión más específica de la metodología a utilizar, para obtener un mayor rendimiento en los procesos

de selección espermática. La eficiencia de los MACS y los microfluidos respecto a la técnica de selección convencional queda evidenciada al comparar la tasa de euploidia en el mejor indicador de calidad que es el blastocito. Incluso cuando la muestra de semen es normal y se aplica MACS la euploidia aumenta. Por lo tanto, MACS ofrece una herramienta prometedora para seleccionar espermatozoides sanos y utilizarlas en un programa de FIV convencional o DGP y en el caso de fragmentación doble el uso de microfluidos también mejora la tasa de euploidia en un programa de DGP en comparación con una técnica convencional. En mujeres mayores de 38 años esta mejora no se refleja debido a que el impacto ovocitario en estas pacientes es superior a la mejora que supone la utilización de estas técnicas.

## BIBLIOGRAFÍA:

*Correlation between aneuploidy, 5 apoptotic markers and DNA fragmentation 6 in spermatozoa from normozoospermic 7 patients 8 9 10 Xavier Vendrell a, Minerva Ferrer b, Elena García-Mengual a, 11 Patricia Muñóz b, Juan Carlos Triviño c, Carmen Calatayud. RBMO 1065 No. of Pages 11, Model 6+ 24 December 2013 Disk Use*

P-110 ▶

## PREVALENCIA Y VARIABILIDAD DE LAS ANEUPLOIDÍAS ESPERMÁTICAS DETECTADAS MEDIANTE CHROMOSPERM®

**E. Fernández Alegre (1), M. de Padura Bonet (1), C. Lanza González (1), E. Lacalle Fernández (2), B. Martín Fernández (2), F. Martínez Pastor (2)**

(1) Bior Biotech SL - León (León), (2) Universidad de León - León (León)

## INTRODUCCIÓN:

Las anomalías cromosómicas en los espermatozoides son una de las causas del fracaso de las ART. Además, los espermatozoides alterados pueden fecundar, generando un embrión aneuploide. Si no aborta, la descendencia puede heredar estas alteraciones cromosómicas. Estas anomalías se originan por una segregación anómala de los cromosomas durante la meiosis, y no suelen detectarse mediante las técnicas de rutina, obligando al uso de técnicas como FISH [1]. Bior Biotech SL utiliza Chromosperm® desde 2018 para el análisis de aneuploidías espermáticas de forma rápida y a bajo coste.

## OBJETIVO:

1. Evaluar la prevalencia de la carga cromosómica alterada, así como el rendimiento de la técnica Chromosperm®.
2. Determinar la variabilidad entre muestras, especialmente la influencia de las clínicas y la fecha de recogida.

## MATERIAL Y MÉTODO:

El análisis de aneuploidías se realizó mediante Chromosperm® en 441 muestras de semen, con un protocolo basado en Antonucci et al. [2]. Las muestras se fijaron con PBS-formaldehído a (4 °C,

# COMUNICACIONES PÓSTERS

30 min) con solución de descondensación PBS-Triton-DTT-heparina. Finalmente, se tratan con solución de tinción (PBS-Triton con 40 µg/mL de yoduro de propidio y RNase-DNase free), otros 30 min en oscuridad. Los análisis se realizaron con un citómetro MACSQuant (10.000 espermatozoides/muestra). Las muestras, analizadas por duplicado, procedieron de 14 clínicas y se recibieron en un intervalo de 2,5 años, de 2018 a 2021. Los datos se analizaron en el entorno estadístico R, obteniendo para cada muestra un perfil de distribución y las proporciones de las poblaciones espermáticas: nulisómicos, haploides (normales), inmaduros, disómicos, diploides y poliploides.

## RESULTADOS:

El tiempo de respuesta recepción de la muestra-envío de resultados fue de 5 a 8 días (intercuartil). Las medianas de estas poblaciones fueron: 8,2%, nulisómicos 67,9% haploides, 10,6% inmaduros, 10,1% disómicos, 0,6% diploides y 0% poliploides. La repetibilidad de la técnica (desviación estándar (SD) de los duplicados) fue de 0,9 para la población haploide, con sólo un 0,8% de los análisis fuera del intervalo  $3\sigma$ .

El perfil del análisis (Figura 1) y las proporciones de las poblaciones se utilizan para caracterizar una muestra como alterada (perfil anormal) o anómala (perfil normal pero al menos una población con proporción anormal). En la serie temporal, 107 muestras (24,7%) se clasificaron como alteradas (anomalía cromosómica probable) y 156 (36%) como anómalas (sospechosas). El efecto de la clínica y la fecha (semana del año)

en la población de haploides fueron significativos ( $P < 0,001$ ; modelos lineales generales), indicando una variabilidad tanto en localización como en el período del año. No obstante, la variabilidad (como %CV) intra-clínicas fue mayor (2,2%) que la inter-clínicas (9,5%). Un análisis de la varianza mostró que la fecha fue más relevante, con un 14,4%, siendo la clínica responsable de sólo el 1,7%.

## CONCLUSIONES:

Chromosperm® es una técnica rápida y económica que permite decidir si un paciente tiene riesgo de producir espermatozoides con anomalías cromosómicas, contribuyendo en la decisión clínica (p. e., DGP-A). La prevalencia de las aneuploidías fue alta, aunque esto es esperable entre muestras ya sospechosas. Este estudio preliminar muestra que tanto la clínica como la fecha son relevantes en este tipo de alteraciones, sugiriendo estudios más profundos sobre las fuentes de esta variabilidad.

## BIBLIOGRAFÍA:

[1] Rodrigo, L. et al., 2019. Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. *Biol Reprod* 101, 1091–1101.

[2] Antonucci, N., et al., 2013. A novel in vitro sperm head decondensation protocol for rapid flow cytometric measurement of deoxyribonucleic acid content. *Fertil. Steril.* 99, 1857–1861.

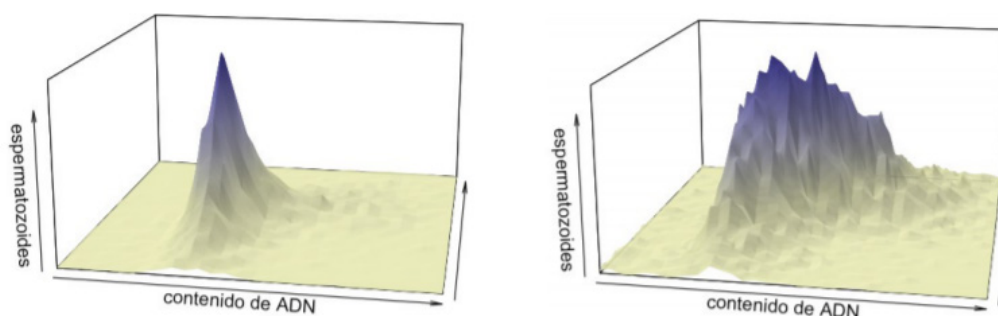


Figura 1. Perfiles de Chromosperm® para una muestra normal (izquierda, pico correspondiente a la población haploide, con una pequeña población de inmaduros) y una muestra alterada (derecha).

## EMBARAZO TRAS CRIOTRANSFERENCIA. EL IMPACTO DE LA ESTRATEGIA "FREEZE-ALL" EN LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS

P. Pascual Utiel, I. Cuevas Saiz, C. Olmedo Illueca, A. Pérez Esteban, L. Abad Velasco, S. Royo Bolea, M. Barea Gómez

Hospital General Universitario de Valencia - Valencia (Valencia)

### INTRODUCCIÓN:

La estrategia "freeze-all" ha despertado gran interés en los últimos años aumentando el número de ciclos realizados con esta técnica. Una de las razones del incremento de las criotransferencias (CRT) diferidas es reducir el riesgo de hiperestimulación ovárica. La CRT diferida, además, permite una mayor flexibilidad en las TRA (técnicas de reproducción asistida) y, consecuentemente, una mejor preparación endometrial que en la transferencia en fresco. En la CRT de embriones sobrantes de un ciclo con transferencia en fresco, los que quedan criopreservados serían la segunda opción para transferir a criterio del embriólogo. Sin embargo, con la técnica "freeze-all", al vitrificar toda la cohorte embrionaria se dispone teóricamente del embrión de mejor calidad entre los criopreservados. Por ello, se espera que esta estrategia ofrezca unos mejores resultados.

### OBJETIVO:

Comparar los resultados reproductivos de las CRT de ciclos "freeze-all" respecto de los obtenidos de CRT de embriones sobrantes de ciclos con transferencia en fresco.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Analizamos de forma retrospectiva los datos obtenidos de la CRT única de 248 blastocistos. Solo se incluyeron en el estudio los primeros y segundos ciclos de FIV entre enero de 2015 y diciembre de 2020.

Los embriones criotransferidos se dividieron en dos grupos dependiendo de si se siguió la estrategia "freeze-all" (grupo 1, n=197) o si previamente se realizó la transferencia en fresco (grupo 2, n=51). La edad de las pacientes incluidas en el estudio fue de  $34.96 \pm 3.95$  años en el grupo 1 vs.  $36.53 \pm 3.03$  años

en el grupo 2. Los protocolos de vitrificación y desvitrificación utilizados fueron los recomendados por el fabricante (Irvine Scientific) con el soporte Cryotip®. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS (V25.0, IBM Statistics), usando la prueba chi-cuadrado para encontrar diferencias en los resultados reproductivos entre ambos grupos, así como diferencias entre los tratamientos.

### RESULTADOS:

No observamos diferencias estadísticamente significativas en la tasa de embarazo bioquímico (49.75 % en el grupo 1 vs. 41.18 % en el grupo 2,  $p=0.275$ ). Analizando las tasas de aborto tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas (17.26 % en el grupo 1 vs. 11.76 % en el grupo 2,  $p=0.203$ ). De nuevo, en cuanto a la tasa de embarazo clínico no se observaron diferencias estadísticamente significativas (32.49% en el grupo 1 vs. 29.41 % en el grupo 2,  $p=0.590$ ). La edad media de las pacientes participantes en cada grupo de estudio sí resultó estadísticamente significativa ( $34.96 \pm 3.95$  años en el grupo 1 vs.  $36.53 \pm 3.03$  años en el grupo 2,  $p=0.009$ ).

### CONCLUSIONES:

Nuestros resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para las tasas de embarazo bioquímico, clínico y aborto tras realizar la CRT de un único embrión siguiendo la estrategia "freeze-all" frente a la de embriones sobrantes tras la transferencia en fresco. Una de las limitaciones del estudio es el número de ciclos incluidos y las diferencias en la edad de ambos grupos, algo esperable ya que por norma general las pacientes más jóvenes tienen mayor respuesta a la estimulación ovárica, por lo que en éstas se suele utilizar más frecuentemente la estrategia "freeze-all". Se recogerán los datos de los próximos ciclos aumentando el tamaño muestral de cada grupo con el objeto de confirmar estos resultados.



*XL Congreso*  
**ASEBIR**  
*Toledo 2021*

# ASEBIR

Asociación para el Estudio  
de la Biología de la Reproducción

---

**Secretaría ASEBIR** C/ Cronos, Nº 20, Bloque 4, 1 Piso, Nº 6 - 28037 Madrid

Tel +34 91 367 89 94 / [www.asebir.com](http://www.asebir.com) / [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com)

---

