

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFEECTO DE LA ELIMINACIÓN DE FRAGMENTOS EN
EMBRIONES EN ETAPA DE ESCISIÓN SOBRE LOS
RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN PACIENTES TRATADAS
CON FERTILIZACIÓN IN VITRO**

Por

Dra. Lorna Marissa Frazer Moreira

**Como requisito para obtener el Grado de
SUBESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

Febrero, 2020

**EFFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE FRAGMENTOS EN EMBRIONES EN
ETAPA DE ESCISIÓN SOBRE LOS RESULTADOS REPRODUCTIVOS EN
PACIENTES TRATADAS CON FERTILIZACIÓN IN VITRO**

Acta de aprobación:

Dr. med. Luis Humberto Sordia Hernández
Director de Tesis y Profesor del Departamento de Ginecología y
Obstetricia

Dr. med Donato Saldívar Rodríguez
Jefe del Departamento de Ginecología y Obstetricia

Dra. Sci. Geraldina Guerrero González
Coordinadora de Investigación
Departamento de Ginecología y Obstetricia

Dr. med Felipe Arturo Morales
Subdirector de Estudios de Posgrado

Dr. med David De la Fuente Villarreal
Co-asesor de Estudios de Postgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco a Dios, que nunca me ha soltado de la mano y me ha bendecido en abundancia. A mi esposo, Alberto, que me ha levantado cuando he caído y caminado junto a mi en todo este proceso. A mi hija, Lorna Sofía, por llenarme de alegría, motivación y amor todos los días.

A mis padres, quienes sin importar la edad, distancia o circunstancia han estado ahí para mi. Pero sobre todo por enseñarme a soñar y saber que para ganar hay que arriesgar.

Al personal y médicos del centro medicina reproductiva por su aceptación e interés por nuestra investigación. A mis maestros, en especial al Dr. Sordia y al Dr. Morales, quienes, con interés, paciencia y dedicación, me han transmitido su conocimiento y me han enseñado un mundo de aprendizaje diferente y a amar la biología de la reproducción.

Agradezco a Lilith Villareal, embrióloga, por su disponibilidad y deseo de hacer las cosas e interés por investigar.

Agradezco infinitamente a las pacientes y personal de este centro hospitalario, de quienes todos los días he aprendido algo y he sentido su dulce bienvenida a estas tierras mexicanas.

TABLA DE CONTENIDO

<i>CAPÍTULO</i>	<i>PÁGINA</i>
Capítulo I	
1. RESUMEN.	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN.	3
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS.	13
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS.14
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	15
Capítulo VI	
6. RESULTADOS.	26
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN.	34

CAPÍTULO	PÁGINA
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIONES42
Capítulo IX	
9. ANEXOS43
9.1 Cuestionario	43
9.2 Consentimiento informado	45
9.3 Carta de autorizacion de comité de etica	51
Capítulo X	
10. BIBLIOGRAFIA.53
Capítulo XI	
11. RESUMEN AUTOBIOGRAFICO	60
Capitulo XII	
12. ABSTRACT61

INDICE DE TABLAS Y GRAFICOS

TABLAS	PAGINA
1. Características de pacientes estudiados	27
2. Protocolos de técnicas de reproducción asistida realizadas en el estudio	28
3. Resultados reproductivos	30
4. Resultados reproductivos según tipo de participación en el estudio	31
5. Características embrionarias de las pacientes estudiadas.	33

GRAFICOS	PAGINA
1. Relación entre dosis total de FSH y tipo de sujeto	28
2. Resultados reproductivos según tipo de participación en estudio	31

LISTA DE ABREVIATURAS

FIV: Fertilización in vitro

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

TE: Transferencia de embriones

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

hCG: Gonadotropina Coriónica humana

β- hCG: Fracción beta de la gonadotropina coriónica humana

R-FSH: Hormona folículo estimulante recombinante

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

CAPITULO I

RESUMEN

Introducción:

Uno de los factores más importantes que determina el éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA) es la calidad de los embriones generados in vitro. La fragmentación o generación de pequeños fragmentos citoplásmicos anucleares es una característica común de los embriones humanos en desarrollo. No se conoce el mecanismo de su generación, pero acarrear efectos adversos en las TRA como menor tasa de implantación y embarazo.

Varios investigadores han eliminado dichos fragmentos con el fin de mejorar los resultados reproductivos, pero los hallazgos han sido controversiales y nada definitivos.

Objetivos:

Determinar si la eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión mejora las tasas de embarazo en los ciclos de FIV e ICSI.

Materiales y métodos:

Se realizó un estudio prospectivo, observacional, transversal de casos y controles en las pacientes sometidas a FIV/ICSI en el Centro de medicina reproductiva del Hospital Universitario de la UANL. Los casos fueron pacientes con embriones calidad 2 o 3, a quienes se les realizó micromanipulación cosmética previa a la transferencia. Los controles fueron pacientes con embriones calidad 1, a quienes no se les realizó micromanipulación cosmética. Las variables cuantitativas se expresan en medidas de tendencia central y análisis de varianza. Para la búsqueda de relación estadística de las variables cualitativas se utilizó el método de chi cuadrado. Considerando un error alfa de 5%, se consideró como hallazgo estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

Aspectos éticos:

Fue aprobado por el comité de ética en investigación de la Universidad Autónoma de Nuevo León, aceptado con la clave de registro G119-00004.

Resultados:

Se analizaron 26 pacientes, 13 en cada grupo. La dosis de FSH recibida por el grupo control fue significativamente mayor (2896 ± 718 mg vs 2325 ± 626 mg) a la dosis recibida por los controles ($p = 0.04$). No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la realización de micromanipulación cosmética y la tasa de embarazo; sin embargo, hubo una tendencia de mayor proporción de embarazos bioquímicos y clínicos entre las pacientes cuyos embriones fueron sometidos a eliminación de fragmentos (38.5% vs 30.8%, $p= 0.7$).

Conclusiones:

La eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión con grado de fragmentación moderada (<50%) equipara los resultados reproductivos de los embriones sin fragmentación. Estos hallazgos deben corroborarse con estudios multicéntricos y aleatorizados que permitan una mayor muestra.

Palabras claves: Eliminación de fragmentos, Fertilización In vitro, tasa de embarazo, aborto, calidad embrionaria, micromanipulación cosmética.

CAPITULO II

INTRODUCCION

La fragmentación o generación de pequeños fragmentos citoplásmicos anucleares es una característica común de los embriones humanos en desarrollo. En varios sistemas de clasificación de embriones, el grado de fragmentación y su etapa de desarrollo se definen como los criterios mas comúnmente utilizados para seleccionar un embrión de alta calidad para la transferencia después de fertilización in vitro (1). A pesar de que el mecanismo subyacente en la generación de fragmentos no es del todo conocido, se han propuesto diferentes teorías. Una de ellas es su relación con la apoptosis. Al estudiar su ultraestructura, han encontrado que se conforman principalmente por tejido mitocondrial (2) (3). Los efectos adversos en la TRA han sido ampliamente estudiados, como menor tasa de implantación atribuible a la reducción del espacio citoplasmático disponible para la división celular normal o la reducción de las intercomunicaciones celulares obstruyendo las uniones gap (3) (4).

El desarrollo posterior de embriones fragmentados se ve afectado, a menudo seguido de detención de la división y degeneración. Además, la transferencia de estos embriones mostró un potencial de desarrollo limitado y rara vez dio como resultado un embarazo exitoso, lo que ha llevado al descarte de estos embriones. Se ha propuesto que la fragmentación citoplasmática induce la apoptosis y limita la tasa de escisión de los blastómeros (16) (2).

Múltiples estudios han tratado de relacionar la fragmentación con la aneuploidía embrionaria. Shawn L, et al (2012), estudiaron el comportamiento dinámico de los blastómeros y su relación con aneuploidía. Los tres parámetros que tomaron como predictivos fueron la duración de la primera citocinesis, el tiempo desde el estadio de dos a tres células y la sincronidad en la aparición de los blastómeros tres y cuarto. Al tratar de correlacionar el grado de fragmentación con la aneuploidía encontraron que la fragmentación por si sola sin presencia de otros criterios morfológicos y dinámicos como los descritos previamente tenía un efecto mínimo, no significativo sobre la probabilidad de la euploidia embrionaria (17).

La fragmentación de embriones está asociada con una variedad de factores, que incluyen condiciones de cultivo inadecuadas, mala calidad del óvulo y espermatozoide, aumento de la edad materna, ciclo celular anormal, apoptosis y estrés oxidativo en embriones. La presencia de fragmentación limita el desarrollo posterior de embriones debido a la pérdida de mitocondrias citoplasmáticas, ARNm y proteínas reguladoras, que son esenciales para la división celular, así como a la interrupción física de las uniones de brecha en los blastómeros, que interfiere con las interacciones célula-célula requeridas para la escisión y la compactación. La fragmentación celular puede inducir la muerte celular programada o apoptosis en blastómeros (22).

Los embriones humanos fragmentados muestran una distribución errática de la proteína de adhesión celular E-cadherina, y esta distribución anormal puede estar asociada con la distribución mitocondrial y de microtúbulos anormales. Debido a que E-cadherina es de vital importancia para la compactación y la blastulación, su distribución alterada puede explicar en parte la asociación entre fragmentación extensa y reducción en la formación de blastocisto (15) .

El aumento de la fragmentación no solo reduce la formación del blastocisto, la fragmentación aparentemente puede influir en la asignación de células durante la diferenciación. El número de células se redujo y la reducción se limitó al trofoectodermo (en caso de fragmentación mínima) o también incluyó la masa celular interna en caso de fragmentación que exceda el 25% (15). Después de la blastulación, los fragmentos colocados entre el trofoblasto y la zona pelúcida pueden interferir con el proceso de eclosión normal. Esto puede proporcionar otra explicación para la viabilidad reducida de embriones fragmentados (10). Check y colaboradores trataron de darle un factor predictivo al número de blastómeros, grado de fragmentación y simetría de los embriones para predecir un embarazo exitoso. Los resultados demostraron que los niveles más bajos de estas características representan menores tasas de embarazo, como el tener menos de 4 blastómeros para el día 3 (11.8 %VS 32%), > 25% de fragmentación (10% VS 22.2%), o asimetría marcada (10% VS 22.2%). Aun así, los peores parámetros morfológicos resultaron en embarazos exitosos con una tasa respectiva de 11.8%, 12.5% y 10% (25).

El embrión por transferir se selecciona según sus características morfológicas. Se ha planteado la interrogante de la posibilidad de obtener mejores resultados en las TRA mediante la optimización del aspecto embrionario a través de microcirugía cosmética (14). Recientemente Halvaei et al. demostraron que la eliminación de fragmentos y gránulos gruesos (micromanipulación cosmética) de embriones de bajo grado mejoraban las tasas de embarazo en pacientes con falla de implantación en ciclos frescos (16).

El impacto de fragmentación moderada sobre los resultados de técnicas de reproducción asistida es controversial. Sin embargo, los estudios recientes debaten entre si la eliminación de estos fragmentos iguala la tasa de embarazo por ciclo o la mejora en comparación de embriones originalmente de mejor calidad (14).

Desde la introducción de la fertilización in vitro (FIV) en 1978, se han tratado de implementar nuevas técnicas para mejorar las probabilidades de embarazo en aquellas parejas en donde las técnicas estándares no dan resultado. Las técnicas de micromanipulación se introdujeron en los años 90 e incluyen: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI; Palermo et al 1992), eclosión asistida, *eliminación de fragmentos* (Alkani et al; 1990) y biopsia de embriones (5).

La remoción de fragmentos se ha propuesto como una técnica que puede mejorar la división celular y subsecuentemente la implantación. Alkani y colaboradores encontraron que la defragmentación de embriones con > 35% de fragmentos iniciales resultaban en tasas de implantación y embarazo similar a aquellos embriones con el 6% de fragmentación. Estudios previos han demostrado que, los fragmentos embrionarios eliminados no resurgen y el resultado por ciclo FIV/ICSI se equipara con embriones de mejor calidad (7) (8)(6).

Planteamiento del problema

Uno de los factores más importantes que determina el éxito de las TRA es la calidad de los embriones generados in vitro. Los embriones se evalúan rutinariamente en un laboratorio de FIV y los mejores embriones a transferir se seleccionan de acuerdo con los criterios morfológicos. Aunque la evaluación morfológica tiene ciertas limitaciones, sigue siendo el método más común para la puntuación de embriones (7). La presencia de fragmentación en el embrión se ha considerado como un parámetro importante que afecta la puntuación de morfología y el grado de fragmentación se asocia con la viabilidad de este (8).

La fragmentación se define como la producción de pequeños fragmentos citoplasmáticos nucleares que surgen durante el proceso de escisión y que pueden afectar negativamente el desarrollo del embrión y el potencial de implantación. La fragmentación de los embriones junto con la apariencia del blastómero, la etapa y número de células del embrión son los factores más frecuentemente utilizados para seleccionar los mejores embriones para la transferencia. Se ha demostrado que el aumento en la fragmentación está asociado con un aumento en la edad materna, disminución de la reserva ovárica y disminución de las tasas de implantación. (9) Lo anterior puede deberse a la reducción del citoplasma disponible para la escisión, así como a una obstrucción física de las uniones de brecha, que interfieren con las interacciones célula-célula necesarias para la escisión y la compactación.

Según el reporte preliminar de la SART 2016, la tasa de embarazo/ciclo con uso de embriones propios en su primer ciclo de FIV en pacientes < 35 años es de 39.8% (39.4-40.3), 35-37 años: 29.9%(29.3-30.5), 38-40 años: 19.6%(19.1-20.1), 41-42 años: 10.4% (9.8-11), > 42 años: 3.1%(2.8-3.5); donde respectivamente el número de ovocitos recuperados: < 35 años: 42,655, 35-37 años: 22646, 38-40 años: 21203, 41-42: 10794, > 42 años: 8188. De éstos, el número de ovocitos que resultaron en embriones no óptimos para transferir fue: <35 años: 5.4%, 35-37 años: 10%, 38-40: 17.1%, 41-42 años: 26.2%, > 42 años: 37.9% (10). Aunque en este reporte la SART no deslucce el motivo por el cual los embriones no eran aptos para transferir, si tomamos en cuenta que dentro de los criterios

morfológicos para clasificar los embriones y determinar su tasa de éxito es el grado de fragmentación, se estima que aproximadamente el 40% de los embriones generados in vitro muestran un cierto grado de fragmentación durante su primera escisión y estos se asocian con características morfológicas apoptóticas (11).

Justificación

La tasa de éxito de los ciclos de FIV o ICSI está determinada por la receptividad uterina y por el número y la calidad de los embriones transferidos. La decisión sobre qué embriones transferir se basa en la manifestación de los blastómeros y el grado de fragmentación. La aparición de fragmentación de embriones in vitro es una característica común y se supone que está asociada con un resultado perjudicial (12).

Desde finales de los 1990s se introdujo la defragmentación embrionaria, conocida hoy como micromanipulación cosmética, donde se han tratado de establecer sus beneficios y ventajas, sin obtener resultados consistentes (3,6,16,17). Entre los investigadores más destacados en el área de fragmentación embrionaria se encuentran Alkani y colaboradores, quienes en uno de sus estudios encontraron que la defragmentación de embriones con >35% de fragmentos resultaba en tasas de implantación y embarazo similar a aquellos embriones con el 6% de fragmentación (4).

También, Keltz et al., (2010) cuestionaron si la defragmentación de embriones de bajo grado en día 3 era sostenible. Ellos encontraron que la defragmentación se mantuvo, sin embargo, el grado de compactación y blastulación no tuvo un impacto estadísticamente significativo (9). T. Gurgan et al estudiaron el efecto de la defragmentación en embriones día 3 en pacientes con falla en la implantación, con embriones en día 3 con $\geq 20\%$ de fragmentación, encontrando una mejor tasa de implantación y embarazo clínico al comparar el grupo sometido a micromanipulación cosmética, 32.5% vs 11% y 46% vs 23% respectivamente (14).

Somayyeh Safari et al (2017) estudiaron la ultraestructura de los fragmentos citoplasmáticos junto con el efecto de la micromanipulación cosmética (CM) en la morfología y el desarrollo de embriones calentados vitrificados, así como los resultados en las TRA, encontrando una mejora significativa en los parámetros morfológicos, como el grado de fragmentación, la uniformidad de los blastómeros y el grado embrionario durante el desarrollo posterior a la realización de la micromanipulación cosmética, en comparación con los otros ($P = 0.00001$). Sin embargo, no hubo diferencias en los resultados clínicos entre los grupos estudiados (3).

En base a estos datos y otros estudios, en el Centro Universitario de Reproducción Asistida (CeUMER), el equipo de embriólogos de forma rutinaria realizan la defragmentación embrionaria, conocida como micromanipulación cosmética, sin embargo, no se han documentado los beneficios de este procedimiento.

A pesar de los múltiples estudios, los resultados de la micromanipulación cosmética siguen siendo muy controversiales. Se han establecido dos corrientes, los que están a favor de la defragmentación embrionaria y los que siguen escépticos sobre sus beneficios, llevando a los laboratorios de reproducción asistida a descartar múltiples embriones, aumentando el costo y tiempo para lograr el objetivo fundamental de las técnicas de reproducción asistida, un nacido vivo. El descarte de embriones tiene implicaciones institucionales, por ejemplo: mayor gasto de recursos, ciclos sin transferencias, y menor tasa de embarazo por ciclo. Sin embargo, el mayor impacto radica sobre las pacientes, quienes ya están sometidas al estrés psicológico y emocional por su diagnóstico de infertilidad; que, a pesar de la estimulación y recuperación exitosa, no se transfiere ya que no cuenta con embriones aptos; implicando nueva carga emocional y económica. Por lo que la micromanipulación cosmética es de interés para cualquier centro de reproducción a nivel mundial, aun en países desarrollados. En Estados Unidos, la mayor parte de seguros médicos no cubren los tratamientos de infertilidad y aquellos que si lo hacen, lo practican de forma limitada; por lo que el no transferir implicaría la pérdida de oportunidad de un

embarazo viable. En países en vías de desarrollo, en donde los seguros médicos no cubren los tratamientos de infertilidad, se justificaría en múltiples aspectos la suma importancia de investigar más sobre este tema. Además, con la esperanza de demostrar que la micromanipulación cosmética aumenta las tasas de embarazo y de nacidos vivos, se sustentaría y justificaría la urgente necesidad de que nuestro centro de reproducción se involucre en éste importante dilema médico a nivel mundial.

Es por este motivo que nos hemos propuesto contestar la siguiente pregunta de investigación: ***¿Mejora los resultados de FIV/ICSI la eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión?***

CAPITULO III

HIPOTESIS

Hipótesis de trabajo

H1: La eliminación de fragmentos de embriones en etapa de escisión **mejora** las tasas de embarazo en los ciclos de fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática.

Hipótesis Nula:

H0: La eliminación de fragmentos de embriones en etapa de escisión **no mejora** las tasas de embarazo en los ciclos de fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática

CAPITULO IV

OBJETIVOS

Objetivo Principal:

- Determinar si la eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión mejora las tasas de embarazo en los ciclos de fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática.

Objetivos Secundarios:

- Evaluar la tasa de embarazo bioquímico, clínico y aborto de los embriones sometidos micromanipulación cosmética.
- Establecer el grado embrionario de acuerdo con las características de la población.

CAPITULO V

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio prospectivo, observacional, transversal, de casos y controles en las pacientes sometidas a FIV/ICSI en el Centro de medicina reproductiva del Hospital Universitario de la UANL de mayo del 2019 a noviembre del mismo año. El grupo de casos estuvo conformado por pacientes con embriones calidad 2 ó 3 que no contaban con otros embriones y a quienes se les realizó micromanipulación cosmética previa a la transferencia. El grupo control fue conformado por pacientes con embriones calidad 1, a quienes no se les realizó micromanipulación cosmética. Los datos generales de cada participante se recolectaron por medio de encuesta y revisión de expediente clínico. Los datos registrados del expediente fueron edad, medidas antropométricas, hábitos tóxicos, diagnóstico, tiempo de infertilidad, comorbilidades y número de ciclos previos de FIV/ICSI. Se incluyeron todas las pacientes de 18-45 años sometidas a FIV/ICSI en el Centro Universitario de Reproducción Asistida (CeUMER), que utilizaron óvulos propios, sin importar causa o tiempo de infertilidad, o patologías crónicas concomitantes, que aceptaron y firmaron el consentimiento informado para participar voluntariamente en el estudio. Se excluyó toda paciente que NO acepto participar en el estudio o mayor de 45 años. Se eliminaron pacientes que obtuvieron embriones grado 4, que presentaron un factor uterino (miomas, pólipos, anomalías müllerianos) y que recibieron ovodonación. Se les dio seguimiento hasta la semana 12 de gestación para valorar su efectividad.

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

ESTIMACIÓN DE MEDIA EN DOS POBLACIONES				
	$n = \frac{K(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$			
valor K	7.9	62.41	395	
sigma 1	5	25	50	n = 13.5459534
sigma 2	5	25		
valor μ_1	25.4	29.16		
valor μ_2	20			

Se utilizó una fórmula de estimación de media en dos poblaciones para determinar la tasa de éxito en micromanipulación cosmética de embriones en los ciclos de fertilización in vitro. Con una confianza del 95% y un poder del 80% se obtuvo un resultado de 13 pacientes por grupo, teniendo 13 pacientes en el grupo control y 13 pacientes en el grupo experimental, con un total de 26 pacientes.

Tipo de muestreo:

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia en el grupo de casos, incluyéndose la totalidad de pacientes que firmaron consentimiento informado y fueron sometidas a micromanipulación cosmética en el periodo del estudio. En el grupo control, se realizó un muestreo probabilístico al azar con uso de moneda.

Análisis de datos

El análisis de datos se realizó mediante los programas SPSS IBM Statistics v 24.0. y en Microsoft Excel para Mac versión 16.31.

Los resultados de las variables cuantitativas se expresan en medidas de tendencia central (media, desviación estándar) y porcentajes. En la búsqueda de diferencias entre variables cuantitativas, se utilizó el análisis de varianza ANOVA. La relación de variables categóricas (nominales y ordinales) se determinó por medio del cálculo de Chi cuadrada. Tomando en cuenta un error alfa de 5%, se determinó como relación estadísticamente significativa un valor de $p < 0.05$ para un poder estadístico de 95%. Se utilizaron escalas de medición numéricas, nominales y ordinales.

Definición y operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Indicador
Independiente				
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento	Tiempo en años	Cuantitativa	
Micromanipulación cosmética	Consiste en el procedimiento laboratorial de eliminación de fragmentos embrionarios	La eliminación con láser de fragmentos embrionarios de calidad 3	Nominal categórica	1 = Si se realizó micromanipulación cosmética 2 = No se realizó
Calidad embrionaria	La caracterización de los embriones según sus características morfológicas y fases de división celular	Clasificación de Hill et al: Grado A: Blastómeros de igual tamaño, sin fragmentación. Grado B: Blastómeros desiguales, fragmentos <10% Grado C: Blastómeros desiguales con	Categórica Ordinal	1 = grado 1 2 = grado 2 3 = grado 3 4 = grado 4

		fragmentación \leq 50% Grado D: Blastómeros desiguales, con fragmentación significativa \geq 50% y presencia de gránulos oscuros grandes		
Grado de fragmentación	Porcentaje de fragmentos dentro del embrión	Grado A: Sin fragmentos Grado B: \leq 10% Grado C: 10- 35% Grado D: \geq 35%	Categórica Ordinal	A= Grado A B= Grado B C= Grado C D= Grado D
Forma de transferencia	Es el proceso de transferir un embrión del medio de cultivo a la cavidad uterina, ya sea en fresco o vitrificado	La transferencia en fresco o vitrificada	Nominal categórica	1 = En fresco 2 = Vitrificada
Día embrionario (Día 3 o etapa de escisión)	Tiempo transcurrido desde la fertilización que simboliza la primera división del embrión en su tercer día	Cumplir al menos 72 horas (día 3) de crecimiento embrionario	Nominal categórica	1= Si 2 = No
Comorbilidades	La presencia de uno o más trastornos (o enfermedades) además de la enfermedad o trastorno primario	Diabetes Mellitus, Hipertensión arterial, Cáncer, Enfermedad renal crónica, Enfermedad tiroidea, Enfermedad reumatológica, Cardiopatía, Otras	Nominal categórica	1 = Diabetes Mellitus 2 = Hipertensión arterial 3 = Cáncer 4 = Enfermedad renal crónica 5 = Enfermedad tiroidea 6 = Enfermedad reumatológica 7 = Cardiopatía 8 = otros
Índice de masa corporal	Razón matemática que asocia la masa y la talla de un individuo (kg/m ²)	Bajo peso = IMC < 18.5 Normal = 18.5- 24.9 Sobre peso = 25- 29.9	Categórica ordinal	1 = Bajo peso 2 = Normal 3 = Sobre peso 4 = Obesidad clase 1

		<p>Obesidad clase 1 = 30 – 34.9</p> <p>Obesidad clase 2 = 35-39.9</p> <p>Obesidad clase 3 = ≥ 40 kg/m²</p>		<p>5 = obesidad clase 2</p> <p>6 = obesidad clase 3</p>
Número de ciclo de fertilización in vitro / ICSI	Cantidad de veces que se ha sometido a técnicas de reproducción asistida	Registro cuantitativo de la cantidad de veces sometida a técnicas de reproducción asistida	Cuantitativa	
Tiempo de infertilidad	Cuantificación de tiempo a partir de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin métodos de planificación familiar y sin lograr embarazo	Tiempo en meses desde el diagnostico de infertilidad al momento de ingresar al estudio	Cuantitativa	
Dependiente				
Tasa de embarazo	Números de embarazos por ciclos de FIV	Número de casos confirmados de embarazo / número de ciclos de FIV x 100	Cuantitativa	
Tasa de aborto	Número de abortos por ciclos de FIV		Cuantitativa	
Confirmación de embarazo	La confirmación a los 14 días posterior a la transferencia del embrión por niveles de HCG	<p>Bioquímico = elevación de HCG sin lograr evidenciar embarazo por hallazgos ultrasonográficos</p> <p>Clínico = confirmación de</p>	Nominal categórica	<p>1 = bioquímico</p> <p>2 = clínico</p>

		embarazo por HCG positiva más hallazgos ultrasonográficos		
--	--	--	--	--

Protocolo de Embriología:

Los ovocitos utilizados para microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) pasaron por un proceso de decumulación, en el cual se eliminó las células del cúmulo del ovocito, con el objeto de facilitar su manipulación durante la microinyección. La eliminación de las células del cumulo se realizó entre 2- 4 horas después de la punción folicular. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando una solución hialuronidasa de 80 UI/mL y pipetas de Pasteur estiradas de diferentes diámetros o dispositivos de tipo Flexipet con capilares de diferente grosor (140-170 µm).

Protocolo de estimulación y recuperación de ovocitos:

Se utilizó un protocolo corto con antagonistas de GnRH. Tanto la estimulación como la dosis dependió de la edad, índice de masa corporal y algunos factores como la reserva ovárica de cada paciente. Los medicamentos más utilizados fueron: Folitropina alfa (Corneumon, Corne), FSH recombinante (Gonal-F Merck Serano), gonadotropina coriónica humana (5,000UI, Choragon, Ferring) y menotropinas; con dosis variables de 225-300UI. La estimulación se inició los primeros tres días del ciclo, con evaluación basal y luego seguimiento folicular (monitorizado con ultrasonido transvaginal-Logic P5 GE, y niveles de estradiol séricos) el día 6 después de haber iniciado, ajustando dosis según fue necesario.

Se agregó el antagonista de GnRH (Cetrotide 0.25mg, Meck Serano) con la presencia de dos o más folículos con diámetro mayor a 14mm. La maduración final ovocitaria se realizó con gonadotropina coriónica humana (Choragon), hCG recombinante (Ovidrel 250µg) o agonista de GnRH (acetato de leuprorelina-Lucrin 2 mg) dependiendo del riesgo individual de cada paciente de hiperestimulación ovárica, de lo que dependió la transferencia en fresco o vitrificación ovocitaria. Se programó la aspiración ovocitaria 35-36 hrs después del disparo. Se procedió a realizar la evaluación y seguimiento morfológico correspondiente, donde se registró y documentó la calidad embrionaria. En este punto la cohorte se dividió en 2: con un índice 1:1 casos y controles, siendo los casos embriones grado 1 ó 2 y los controles embriones calidad 3 que fueron sometidos a micromanipulación cosmética.

Soporte de la fase lútea:

Se inició progesterona micronizada de 200 mg c/ 8 hrs vía vaginal el día de la aspiración y continuándolo 14 días después. Si la prueba de embarazo en este punto resultó negativa, se suspendió el medicamento y si fue positiva se continuó hasta las 12 SG.

Fertilización de embriones

Inyección o inseminación de embriones:

La elección sobre la técnica a utilizar dependió de la etiología de la infertilidad. Todos los embriones se cultivaron en medios secuenciales, utilizando cultivo global (G-IVF vitrolife, G-TL vitrolife). La inseminación convencional (FIV) se realizó 4-5 horas después de la recuperación de ovocitos (40-41 hrs después del disparo de la ovulación). La inseminación se realizó en una placa Petri con medio de cultivo en gotitas bajo aceite. Los espermatozoides ya previamente capacitados se agregaron a las gotas de inseminación, con una concentración final entre 100,000 y 250,000 / mL. Posteriormente se agregaron los complejos cúmulos- ovocito a las gotas de fertilización. La incubación de los gametos se realizó de 15- 17 horas después. Una vez confirmada la fertilización en los embriones sometidos a inseminación, se transfirieron a G- TL vitrolife.

La ICSI se realizó 2-3 horas después de la recuperación de ovocitos (38-39 hrs después del disparo de ovulación). La decumulación se realizó entre 2-4 horas después de la punción folicular. La valoración de la fertilización después de ICSI fue muy similar a la inseminación convencional, sin embargo, el tiempo de evaluación de los pronúcleos (2-PN) es de 16-18 hrs en ICSI y 18. 20 hrs en FIV convencional.

Clasificación de embriones:

Aproximadamente 48 horas después de la inseminación o inyección, se evaluó el número de células y morfología embrionaria según la escala de Hill et al (15): **embriones grado A** son blastómeros de igual tamaño, sin fragmentación, **grado B** son blastómeros desiguales, fragmentos <10%, **grado C** son blastómeros desiguales con fragmentación $\leq 50\%$ y **grado D** son blastómeros desiguales, con fragmentación significativa $\geq 50\%$ y presencia de gránulos oscuros grandes en el citoplasma. Después de esta valoración morfológica, se delimitó nuestro grupo de casos y controles, tal como fue previamente descrito. Los fragmentos se clasificaron según el porcentaje de citoplasma ocupado: **Grado A:** Embriones donde no se observan fragmentos (0%), **Grado B:** embriones con <10% de fragmentación, **Grado C:** embriones con 10-35% de fragmentación, **Grado D:** embriones con $\geq 35\%$ de fragmentación.

Defragmentación Embrionaria (Micromanipulación cosmética)

Se realizó de 50-56 horas después de la inyección espermática o fertilización convencional. Se utilizaron placas de 60mm, con 1 gota de medio ácido de 20 L de Tyode, con medio amortiguado de HEPES. Toda la placa se recubrió con 12 mL de aceite mineral. Todo el proceso se llevó a cabo en un microscopio invertido de 400 aumentos que tiene acoplado un sistema de micromanipulación completo. Se incidió el embrión, creando un agujero no superior a 30 μ m en la zona pelúcida con láser (diódo infrarrojo de 1480 nm), para proceder a realizar la defragmentación. Se sostuvo con una micropipeta de sostén (diámetro interno:

120- 150 μm), se procedió a la aspiración de fragmentos suave y de uno en uno, utilizando una micropipeta de 10-12 μm para aspirar los fragmentos. Para poder acceder a todos los fragmentos se rotó el embrión sin soltarlo nunca de la pipeta holding.

Transferencia de embriones

Luego de la aspiración ovocitaria se transfirió un máximo de 2 embriones, 72 horas luego de la fertilización.

Seguimiento de Resultados

Se midió la β -hCG el día 14 posterior a la transferencia, se realizó ultrasonido transvaginal a las 6 semanas de gestación para constatar polo embrionario y frecuencia cardíaca y nuevamente a las 12 semanas de gestación. Se documentaron pérdidas del embarazo, embarazos bioquímicos y/o clínicos.

Consideraciones éticas

Por tratarse de un procedimiento terapéutico rutinario, sin agregarse otra intervención riesgosa, se cataloga como una investigación con riesgo mínimo según el artículo Número 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario, aceptado con la clave de registro GI19-00004.

Consentimiento informado y protección de confidencialidad

Las pacientes incluidas en el presente estudio firmaron de forma voluntaria el consentimiento informado (ver anexos) teniendo completamente claro todo el proceso que se llevaría cabo.

Se resguardó la información personal de los participantes para salvaguardar la confidencialidad de su participación en el estudio.

CAPITULO VI

RESULTADOS

Se incluyeron 26 pacientes que cumplían con criterios de inclusión. El grupo control constó de 13 pacientes con embriones calidad 1 a quienes no se le realizó micromanipulación cosmética y aceptaron participar en el estudio. El grupo de casos fue conformado de 13 pacientes con embriones calidad 2 o 3 a quienes se les realizó micromanipulación cosmética previa a la transferencia y que aceptaron participar en el estudio. Las características basales de la población estudiada se describen en la tabla 1.

Al realizar comparación de medias y análisis de varianza (ANOVA), no se encontró diferencias significativas en la edad, patologías crónicas, tipo y factor de infertilidad y número de ciclos de FIV/ICSI previos entre los casos y controles. El único valor que reportó tendencia hacia la varianza fue el índice de masa corporal con una media de 30.26 (\pm 6.9) para los casos y una media de 26.1 (\pm 4.95) para los controles ($p = 0.09$). Lo anteriormente descrito confirma que ambos grupos de estudio eran muy similares e ideales para su análisis estadístico.

Tabla 1. Características de pacientes estudiados

Características	Casos (n=13)	Controles (n=13)	p
Edad, media (DS)	35.2 (± 5.2)	35 (± 3.7)	0.9
IMC, media (DS)	30.26 (± 6.9)	26.1 (± 4.95)	0.09
Clasificación según IMC			
Normal	4 (30.8%)	7 (53.8%)	
Sobrepeso	3 (23.1%)	3 (23.1%)	
Obesidad clase I	3 (23.1%)	2 (15.4%)	
Obesidad Clase II	2 (15.4%)	1 (7.7%)	
Obesidad clase III	1 (7.7%)	0	
APP			0.42
DM2	2 (14.3%)	1 (7.14%)	
HAS	1 (7.14%)	0	
Hipotiroidismo	2 (14.3%)	0	
LES	0	1 (7.14%)	
AR	0	1 (7.14%)	
Esclerosis múltiple	0	1 (7.14%)	
Ninguna	9 (64.3%)	9 (64.3%)	
Tipo de infertilidad			1
Infertilidad primaria	8 (61.5%)	8 (61.5%)	
Infertilidad secundaria	5 (38.5%)	5 (38.5%)	
Factor de infertilidad			0.16
Ovárico	7 (41.2%)	4 (23.5%)	
Tubárico	1 (5.9)	5 (29.4%)	
Masculino	4 (23.5%)	3 (17.6%)	
Metabólico	5 (29.4%)	2 (11.8%)	
Inflamatorio	0	2 (11.8%)	
Inexplicable	0	1 (5.9 %)	
Número de ciclos FIV/ICSI previos, media	0.62 (± 1.4)	0.23 (± 0.44)	0.35

a. Los datos se expresan como No. (%) de participantes a menos que se indique lo contrario

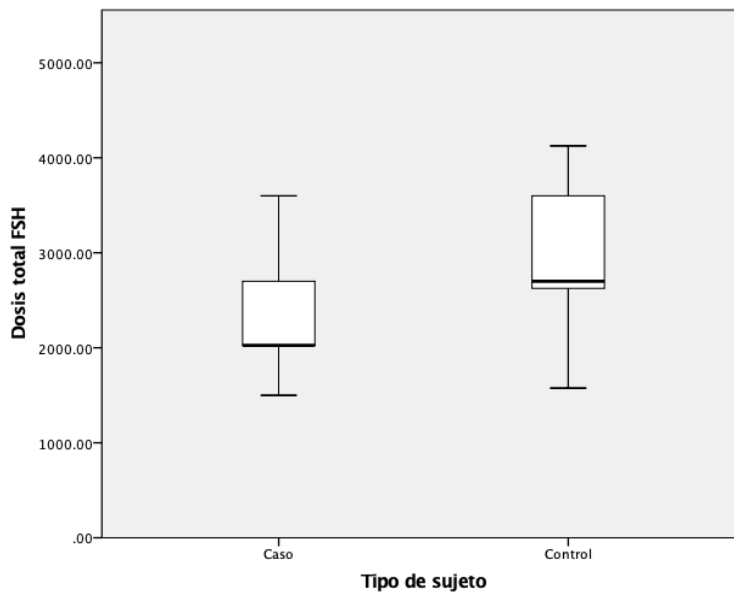
Ambos grupos fueron sometidos a protocolos de técnicas de reproducción asistida similares (Tabla 2). Al realizar comparación de medias y análisis de varianza, se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la dosis total de FSH recibida por ambos grupos. La dosis recibida por el grupo control fue un 24.6% mayor (2896 ± 718 vs 2325 ± 626) a la dosis recibida por los controles ($p = 0.04$) (Gráfico 1).

Tabla 2. Protocolo de técnicas de reproducción asistida realizadas en el estudio.

Descripción	Casos (n=13)	Controles (n=13)	p
Días de estimulación ovárica, media	9.46 (± 0.96)	10.15 (± 1.2)	0.12
Dosis total de FSH (mg), media	2325 (± 626)	2896 (± 718)	0.04
Dosis total de LH (mg), media	161.54 (± 307.5)	276.92 (± 374.2)	0.39
Inducción de ovulación, N (%)			0.35
Ovidrel	9 (69.2%)	11 (84.6%)	
Choragon	4 (30.8%)	2 (15.4%)	
a-Gnrh	0	0	
Número total de ovocitos recuperados	10.5 (± 5)	11.5 (± 6.9)	0.67
MII	7.08 (± 3.6)	7.4 (± 5.2)	0.86
MI	2 (± 2.45)	3 (± 3.67)	0.42
Intermedios	1.08 (± 1.8)	1.15 (± 1.67)	0.91
Atrésicos	0.38 (± 0.77)	0	0.08
Número de ovocitos inseminados	0.31 (± 1.1)	0.08 (± 0.27)	0.48
Número de ovocitos inyectados	7 (± 3.6)	6.9 (± 4)	0.92
Fertilizaciones normales	5.1 (± 2)	5.5 (± 3.5)	0.78
Fertilizaciones tardías	0.39 (± 2)	0.16 (± 0.37)	0.43
Cigotos divididos en D2	5.7 (± 2)	5.4 (± 3)	0.71
Cigotos divididos en D3	5 (± 2)	5 (± 3)	0.94

a. Los datos se expresan en medias (Desviación estándar) a menos que se indique lo contrario

Grafico 1. Relación entre dosis total de FSH y el tipo de sujeto



El análisis de los demás valores solo reportó una tendencia hacia la variación no significativa en el número de ovocitos atrésicos recuperados en ambos grupos. En esta ocasión, el grupo de casos reportó una recuperación mayor de ovocitos atrésicos ($p = 0.08$).

Los resultados reproductivos se resumen en la tabla 3. La tasa de embarazo general del estudio fue de 36.4%. Los casos representaron el 55.6% vs el 44.4% de los controles ($\chi^2 = 0.17$, 1 grado de libertad, $N = 26$, $p = 0.68$).

No se encontró una relación significativa entre la realización de micromanipulación cosmética y la proporción de éxito de embarazo; pero se debe detallar que el número de embarazos bioquímicos confirmados en el grupo de casos fue mayor al esperado, $\chi^2 = 0.17$ (1 grado de libertad, $N = 26$), $p = 0.68$. Aunque la proporción de embarazos bioquímicos y clínicos fue mayor entre las pacientes cuyos embriones fueron sometidos a eliminación de fragmentos (38.5% vs 30.8%), esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.7$) (tabla número 4).

Tabla 3. Resultados reproductivos

No. de px	Tipo de sujeto	Resultado de β hCG post transferencia	Embarazo bioquímico	Embarazo clínico	Edad gestional (semanas) al momento del diagnostico	Embarazo múltiple	Aborto
1	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
2	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
3	Caso	Positiva	Si	Si	6.2	No	No
4	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
5	Caso	Positiva	Si	Si	21.3	No	No
6	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
7	Caso	Positiva	Si	Si	7	No	Si
8	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
9	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
10	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
11	Caso	Negativa	No	No	-	No	No
12	Caso	Positiva	Si	Si	11.2	No	No
13	Caso	Positiva	Si	Si	7	No	Si
14	Control	Negativa	No	No	-	No	No
15	Control	Positiva	Si	Si	12.1	No	No
16	Control	Negativa	No	No	-	No	No
17	Control	Negativa	No	No	-	No	No
18	Control	Negativa	No	No	-	No	No
19	Control	Positiva	Si	Si	23.2	No	No
20	Control	Negativa	No	No	-	No	No
21	Control	Negativa	No	No	-	No	No
22	Control	Positiva	Si	Si	14.4	Si	No
23	Control	Positiva	Si	Si	7	No	No
24	Control	Negativa	No	No	-	No	No
25	Control	Negativa	No	No	-	No	No
26	Control	Negativa	No	No	-	No	No

Se reportaron 2 abortos en el estudio, ambos en pacientes con embriones sometidos a micromanipulación cosmética. Los casos tuvieron el doble de probabilidad de sufrir un aborto (OR 2.1, IC 1.4-3.37) (Gráfico número 2).

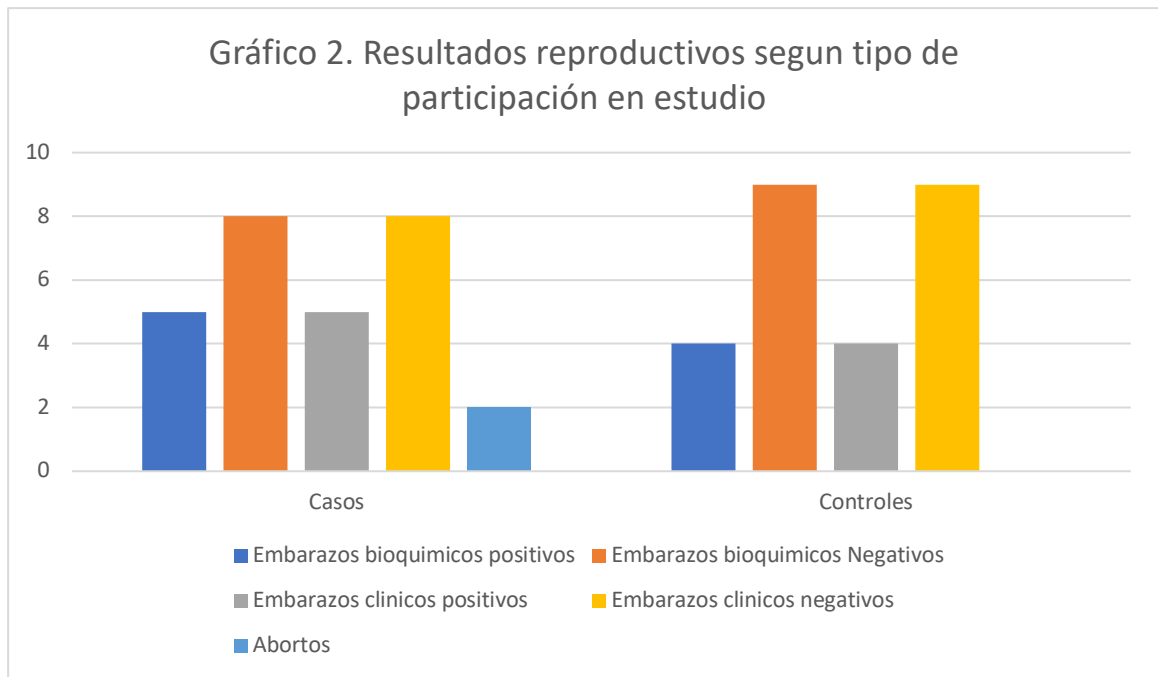


Tabla 4. Resultados reproductivos según tipo de participación en estudio (N = 26)

Tipo de sujeto	Casos	Controles	p
hCG Positiva	5 (38.5%)	4 (30.8%)	0.68
Embarazo bioquímico positivo	5 (38.5%)	4 (30.8%)	0.68
Embarazo en curso	5 (38.5%)	4 (30.8%)	0.68
Aborto	2 (15.4%)	0	0.14

a. Los resultados se expresan en N (%)

Al realizar el análisis independiente de las posibles covariables, no se encontró relación entre edad y la calidad embrionaria inicial ($p = 0.9$) ni entre la edad y el grado de fragmentación inicial ($p = 0.8$). La media de edad para los grados de fragmentación inicial A fue de 35 ± 4 , la media para los grados de fragmentación inicial B fue de 36 ± 5 y la media para los grados de fragmentación inicial C fue de 35 ± 6 . (Tabla número 5).

De igual manera, los días de estimulación ovárica no mostraron relación significativa con la calidad embrionaria inicial ($p = 0.12$) o el grado de fragmentación inicial ($p = 0.15$).

Tabla 5. Características embrionarias de las pacientes estudiadas

No. de px ^a	Tipo de sujeto	Calidad embrionaria (CE) inicial	GFE inicial ^b	CE final	GFE final	Observaciones	Tipo de transferencia de embriones	Dosis diaria progesterona recibida (mg)
1	Caso	7 C2, 8 C2	B	7 C1, 8 C1	A	Arresto embrionario	En fresco	600 mg
2	Caso	8 C2	B	8 C1	A	-	En fresco	600 mg
3	Caso	8 C2 x 2	2 grado B	8 C1, 8 C2	1 grado A y 1 grado B	-	En fresco	600 mg
4	Caso	8 C2, 7 C2	B	8 C1, 7 C1	A	-	En fresco	600 mg
5	Caso	8 C2, 7 C3	C	7 C2, 8 C1	1 grado A, 1 grado B	-	En fresco	600 mg
6	Caso	9 C2 x 2	B	9 C1 x 2	A	-	En fresco	600 mg
7	Caso	4 C2, 8 C2 x 2	B	4 C2, 8 C1, 8 C1	A	-	En fresco	600 mg
8	Caso	9 C3, 7 C2	1 grado C y 1 grado B	7 C1, 9 C2	1 grado A, 1 grado B	-	En fresco	600 mg
9	Caso	6 C3, 9 C3, 8 C2	1 grado C y 1 grado B	6 C2, 8 C1, 9 C2	1 grado A, 1 grado B	-	En fresco	600 mg
10	Caso	8 C2, 8 C3	1 grado B, 1 grado C	8 C1, 8 C2	1 grado A, 1 grado B	-	En fresco	600 mg
11	Caso	7 C2	B	7 C1	A	Arresto embrionario	En fresco	600 mg
12	Caso	8 C3, 7 C2	1 grado C y 1 grado B	8 C1, 7 C1	A	-	En fresco	600 mg
13	Caso	6 C2, 8 C3, 7 C2	1 grado C y 1 grado B	8 C1, 7 C1, 6 C1	A	-	En fresco	600 mg
14	Control	7 C1	A	7 C1	A	-	En fresco	600 mg
15	Control	8 C1 x 2	A	8 C1 x 2	A	-	En fresco	600 mg
16	Control	6 C1, 5 C1	A	6 C1, 5 C1	A	-	En fresco	600 mg
17	Control	9 C1	A	9 C1	A	-	En fresco	600 mg
18	Control	8 C1 x 2	A	8 C1 x 2	A	-	En fresco	600 mg
19	Control	8 C1, 13 C1	A	8 C1, 13 C1	A	-	En fresco	600 mg
20	Control	8 C1	A	8 C1	A	-	En fresco	600 mg
21	Control	7 C1, 8 C1	A	7 C1, 8 C1	A	-	En fresco	600 mg
22	Control	8 C1, 8 C2	A	8 C1, 8 C2	A	-	En fresco	600 mg
23	Control	7 C1 x 2	A	7 C1 x 2	A	-	En fresco	600 mg
24	Control	8 C1	A	8 C1	A	-	En fresco	600 mg
25	Control	8 C1	A	8 C1	A	-	En fresco	600 mg
26	Control	6 C1	A	6 C1	A	-	En fresco	600 mg

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

La fragmentación embrionaria se asocia con una variedad de factores, que incluyen condiciones inadecuadas de cultivo, mala calidad del óvulo y el espermatozoide, aumento de la edad materna, anomalías cromosómicas, ciclo celular anormal, apoptosis y estrés oxidativo en los embriones (16) (4). Debido a la pérdida de la calidad embrionaria con el aumento en la edad materna la mayoría de los estudios excluyen pacientes ≥ 40 años con ciclos de óvulos propios. Nuestro punto de corte fue 45 años con el objetivo de analizar este factor, sin embargo, no encontramos relación entre la edad y grado de fragmentación. La media de edad para los grados de fragmentación inicial A fue de 35 ± 4 , la media para los grados de fragmentación inicial B fue de 36 ± 5 y la media para los grados de fragmentación inicial C fue de 35 ± 6 .

Ambos grupos de estudio eran muy similares e ideales para su análisis estadístico, incluyendo las características basales. El único valor que reportó tendencia hacia la varianza fue el índice de masa corporal con una media de $30.26 (\pm 6.9)$ para los casos y una media de $26.1 (\pm 4.95)$ para los controles, con un valor de $p = 0.09$. Este hallazgo es compatible con lo descrito en la literatura, ya que los efectos adversos de la obesidad materna en la concepción natural han sido ampliamente descritos, sin embargo, se han reportado efectos heterogéneos e inconsistentes en TRA (17). Una revisión de 2007 concluyó que

las mujeres con sobrepeso y obesas con índices de masa corporal (IMC) 25 o más tienen tasas de embarazo más bajas después de la fertilización in vitro (FIV), requieren dosis más altas de gonadotropinas para lograr una respuesta ovárica suficiente y tienen tasas más altas de aborto espontáneo; sin embargo los autores concluyeron que no había pruebas suficientes sobre el efecto del IMC en la cancelación del ciclo, la recuperación de ovocitos y el nacimiento vivo (18).

Un estudio retrospectivo, que incluyó 1721 mujeres que se sometieron a su primer ciclo de FIV con TE en fresco reportó en comparación con las mujeres con un IMC normal bajo, aquellas con obesidad de clase I, II y III tenían niveles de estradiol significativamente más bajos el día de la administración de gonadotropina coriónica humana, 2.047 pg / ml en comparación con 1.756, 1.498 y 1.360 respectivamente, ($p \leq 0.002$). Las mujeres con obesidad grado II y III también tenían 18% y 17% menos de embriones con dos pronúcleos que la población de referencia normal (9.3 en comparación con 7.6 y 7.7, $p=0.03$) (19).

Ambos grupos fueron sometidos a protocolos de técnicas de reproducción asistida similares. Al realizar comparación de medias y análisis de varianza, se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la dosis total de FSH recibida por ambos grupos. La dosis recibida por el grupo control fue un 24.6% mayor (2896 ± 718 vs 2325 ± 626) a la dosis recibida por los controles ($p = 0.04$). Una revisión realizada en el 2017 por Bosch y colaboradores sobre el impacto de los diferentes protocolos de estimulación, sus dosis sobre los ovocitos y la calidad

embrionaria reportó paradójicamente que no se han demostrado diferencias entre el ciclo estimulado y el ciclo natural, mientras que los estudios en animales de laboratorio y pacientes con FIV han demostrado efectos nocivos de dosis más altas en comparación con dosis más bajas de gonadotropinas. Estudios recientes sugieren que el uso de altas dosis de gonadotropinas como factor independiente se correlaciona negativamente con la probabilidad de nacidos vivos por una menor respuesta ovárica, debido a la disponibilidad de más euploides y de buena calidad de embriones (20). Esto difiere con la tendencia encontrada en nuestros resultados de mayor dosis de FSH en el control, quienes tuvieron embriones morfológicamente de mejor calidad que los casos.

La fragmentación es un biomarcador importante para resultados adversos del embarazo. Se ha propuesto que la fragmentación citoplasmática induce la apoptosis y limita la velocidad de escisión de los blastómeros. Múltiples estudios han demostrado una menor tasa de implantación y embarazo en embriones con morfología no favorable. Check et al (2005) reportaron una tasa de embarazo clínico y nacido vivo de 10% para ambos, en embriones con un porcentaje de fragmentación >25% en comparación con el 22.2% de los embriones sin fragmentación (21). Por lo tanto, nuestro estudio apoyaría la hipótesis que la eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión puede mejorar la división celular y la implantación; ya que reportamos una tasa mayor de embarazo clínico de 38.5% en comparación con el 10% reportado por Check et al.

Recientemente, Halvaei et al. (2015) en una serie reporte de casos documentó que la eliminación de fragmentos y gránulos gruesos de embriones de bajo grado mejoró las tasas de embarazo en pacientes con falla de implantación (5). Nuestra población tiene características similares como el número de ciclos previos 0.62 (± 1.4) y 0.23 (± 0.44) para los casos y controles respectivamente ($p=0.35$); en quienes todas las transferencias se realizaron en fresco. Se plantea la interrogante sobre si la micromanipulación cosmética tiene mayores beneficios en cierto grupo de pacientes, como pacientes con falla en la implantación o transferencia de embriones congelados.

La micromanipulación cosmética (defragmentación) en embriones en etapa de escisión con fragmentación moderada (<50%) equipararon los resultados reproductivos a los de los embriones sin fragmentación. Halvaei y colaboradores (2016) en un estudio prospectivo reportaron datos similares, aunque incluyeron únicamente embriones con fragmentación del 10-50% (1). Seok-Gi et al., (2018) reportaron una notable mejoría en las tasas de embarazo clínico (43.7%), embarazo en curso (36.8%) e implantación (25.8%) en el grupo experimental en el que los embriones en etapa de escisión fueron sometidos a defragmentación resultaron significativamente más altas que las tasas correspondientes en el grupo control (28.8%, 22.1% , y 14.0%, respectivamente, $p < 0.05$). Hay que tomar en cuenta que en su grupo control se trató de embriones con el mismo porcentaje de fragmentación que no se sometieron a defragmentación (16). Hasta el momento este es el primer estudio prospectivo que equipara los resultados

reproductivos de la defragmentación y los compara con embriones de buena calidad espontáneamente.

Entre los estudios prospectivos más extensos reportados (n= 120) se encuentra el de Poopak et al (2006), cuyo objetivo fue valorar el potencial de desarrollo in vitro de los embriones sometidos a defragmentación y eclosión asistida 50-56 hrs después de la inyección del espermatozoide. En el día 6, los embriones que se expandieron a 4-8 células fueron evaluados. El grupo experimental, especialmente en los blastocistos de grado IV, el tamaño y el número de blastómeros mejoraron en comparación con los del grupo control (42.3 versus 20.0%; $19,205.7 \pm 1060.3$ versus $15,825.9 \pm 448.7 \mu\text{m}^2$ y 100.14 ± 13.48 versus 63.75 ± 19.79 respectivamente, $p < 0.05$). Ellos concluyeron que la defragmentación tiene un efecto positivo sobre los embriones fragmentado y produce una mejor calidad de blastocisto (22), sin embargo, no se transfirieron por lo que se desconoce su capacidad de implantación y de producir un nacido vivo, pero apoya la teoría que la eliminación de fragmentos puede mejorar la viabilidad y el potencial de desarrollo de los embriones de baja calidad al mejorar las interacciones entre células. También podría evitar la liberación de probables sustancias nocivas por los fragmentos, que pueden conducir a la degeneración o lisis de blastómeros adjuntos sanos (13).

No se ha logrado llegar a un consenso sobre hasta que grado de fragmentación la eliminación de fragmentos puede mejorar los resultados clínicos. Diferentes autores han establecido como punto de corte < 10%, < 35%, y <50% (23) . Alikani y col. siguieron retrospectivamente transferencias homogéneas de embriones fragmentados y reportaron que la implantación se redujo significativamente después de la transferencia de embriones con > 15% de fragmentación, a pesar de la eliminación de fragmentos antes de transferencia embrionaria (13). Sin embargo, esta teoría ha sido descartada por múltiples autores que han encontrado beneficios en embriones con grado de fragmentación <50 (5) (2) (16). Estos hallazgos difieren de nuestros hallazgos ya que incluimos embriones hasta con un porcentaje $\leq 50\%$, encontrando que el grupo de casos se equipara al grupo control al comparar la tasa de implantación y embarazo.

Los dos abortos en el estudio se presentaron en pacientes sometidos a micromanipulación cosmética. Los casos tuvieron el doble de probabilidad de sufrir un aborto (OR 2.1, IC 1.4-3.37). De las primeras teorías sobre la procedencia de los fragmentos es que exhiben características de necrosis y son células destinadas a morir (24). Esta teoría explicaría porque el grupo de los casos reportó una recuperación mayor de ovocitos atresicos ($p = 0.08$). Sin embargo, estudios más recientes como el de Halvei y colaboradores (2016) quienes estudiaron la ultraestructura de los fragmentos citoplasmáticos en embriones humanos en etapa de escisión, encontraron que los fragmentos estaban compuestos principalmente por complejos mitocondria- vesículas. Su tasa de embarazo clínico en los grupos control, simulado y de casos no tuvo

diferencias significativas (24, 18 y 18%, respectivamente). Las tasas de nacimientos vivos, abortos espontáneos, embarazos múltiples y anomalías congénitas también fueron similares entre los diferentes grupos (2).

En un estudio retrospectivo, con una cohorte de 460 transferencias de embriones en fresco, analizaron los 164 embarazos resultantes y correlacionaron la presencia de fragmentación con la tasa de embarazo clínico y sus resultados obstétricos y complicaciones neonatales. En 460 TE, se transfirió un total de 1.176 embriones (número medio, 2.5 6 1.0 embriones por transferencia), de los cuales 198 (16.8%) se implantaron. Se detectó una influencia significativa (al menos $p=0.05$) de la fragmentación en la tasa de implantación y la tasa de embarazo clínico, mientras que no se observaron diferencias con respecto a la tasa de embarazo múltiple y la tasa de embarazo en curso. No se encontró tal relación con respecto a complicaciones, tasa de embarazo múltiple, incidencia de cesárea, semana de gestación, peso al nacer y tiempo promedio en la neonatología. Con eso concluyeron que la transferencia de embriones con > 50% de fragmentación debe considerarse solo después de consultar con la paciente (12). De igual manera, Seoki- Gi y colaboradores, no encontraron diferencias en la tasa de aborto en el grupo sometido a defragmentación ($p = 0.635$) (16).

Es necesario un análisis con una población más numerosa donde se eliminen ciertas covariables que puedan interferir con los resultados, tales como la edad materna y correlacionar el grado de fragmentación con los abortos. Con el fin de poder definir el porcentaje de fragmentación para que resulte beneficioso someter al embrión a micromanipulación cosmética.

LIMITANTES DEL ESTUDIO

La principal limitante de este trabajo es que solo incluyó pacientes de un centro de reproducción asistida. Sería ideal corroborar en una población más grande los hallazgos con ensayos clínicos multicéntricos y aleatorizados. En el periodo que abarcó el estudio, no se realizó micromanipulación cosmética a pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión, por lo que no pudimos cumplir con uno de los objetivos que era comparar el efecto de la eliminación de fragmentos en embriones transferidos en fresco y vitrificados.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

Nuestros datos sugieren que la eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión con grado de fragmentación moderada (<50%) arroja resultados reproductivo en cuanto al embarazo bioquímico y clínico equiparables a los de embriones sin fragmentación. Esto indica que es una técnica que en embriones de menor calidad (grado 2 y 3), mejora su apariencia morfológica que consecuentemente mejora su capacidad de implantación y subsiguiente embarazo.

Los casos tuvieron el doble de probabilidad de sufrir un aborto . Se deben realizar estudios con mayor número de participantes, que eliminen posibles cofactores para valorar el efecto de la proporción de fragmentación y la perdida gestacional temprana.

No se encontró relación entre las características basales, como la edad, comorbilidades, tipo y factor de infertilidad y protocolo de estimulación con la calidad embrionaria y grado de fragmentación. El único factor que no fue estadísticamente significativo, pero con cierta tendencia de predominancia en el grupo control fue la obesidad.

CAPITULO IX

ANEXOS

9.1 CUESTIONARIO

HOSPITAL UNIVERSITARIO "Dr. José Eleuterio González"
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA
CENTRO UNIVERSITARIO DE MEDICINA REPRODUCTIVA
PROTOCOLO: ELIMINACION DE FRAGMENTOS EN EMBRIONES EN ETAPA
DE ESCISION

Nombre: _____ Fecha: _____
Edad: _____ Origen: _____
Teléfono: _____

PA: _____ Talla: _____ Peso: _____ IMC: _____

Historia Gineco Obstétrica: G: _____ P: _____ A: _____ C: _____ E: _____

Antecedentes Patológicos: DM _____ HAS _____ Hipotiroidismo _____ AR _____
LES _____
SAAF _____ otros _____

Diagnostico: _____

de Ciclos de FIV/ICSI previos: _____

Protocolo de estimulación utilizado: _____

Laboratorio: Estradiol: basal: _____ Previo al disparo: _____

Registro de laboratorio de FIV _____

Fecha de recuperación: _____ # de ovocitos recuperados: _____

Maduros: _____ Intermedios _____ Inmaduros _____
Atrésicos _____

Fertilización: _____

de ovocitos inseminados _____ # de ovocitos inyectados _____

fertilizaciones normales _____ # fertilizaciones tardías _____

de cigotos divididos D2: _____ %Fragmentación: _____
D3: _____ % Fragmentación: _____

Eclosión asistida _____ Micromanipulación cosmética _____

Calidad embrionaria inicial: _____ Final: _____

Transferencia de embriones: Fresco: _____ Congelados _____

Complicaciones/Observaciones:

Progesterona (dosis): _____

Congelados

Fecha de Calentamiento: _____

Porcentaje de fragmentación actual: _____ → Igual Menor Mayor

Calidad embrionaria: _____

Fecha de Transferencia: _____

Seguimiento:

hCG-β (14 días post transferencia) = Fecha _____

Resultado: _____

US transvaginal 6 SG : Fecha: _____ Hallazgos:

Evaluación subsiguiente: Fecha: _____ EG:

US:

Hallazgos:

9.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio	Efecto de eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión y su impacto sobre técnicas de reproducción asistida.
Nombre del Investigador Principal	Dr. Luis Humberto Sordia Hernández
Servicio / Departamento	Biología de la Reproducción Humana
Teléfono de Contacto	8126552043
Persona de Contacto	Dra. Lorna Marissa Frazer Moreira
Versión de Documento	4.0
Fecha de Documento	10 de mayo del 2019

Usted ha sido invitado(a) a participar en un estudio de investigación. Este documento contiene información importante acerca del propósito del estudio, lo que Usted hará si decide participar, y la forma en que nos gustaría utilizar su información personal y la de su salud. Puede contener palabras que Usted no entienda. Por favor solicite a su médico o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara.

1.- ¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DEL ESTUDIO?

Determinar si al eliminar los fragmentos en embriones, es decir el remover tejido que no contiene ADN que es producido por el embrión pero que puede interferir con el desarrollo e interacción, mejora las tasas de embarazo en los ciclos de fertilización in vitro.

2.- ¿CUÁL SERÁ LA DURACIÓN DEL ESTUDIO Y CUÁNTOS PARTICIPANTES HABRÁ EN ESTE ESTUDIO?

La duración del estudio será de mayo a noviembre del 2019. Se incluirán 26 pacientes cuya participación será completamente voluntaria. En caso de que decida participar, y su prueba de embarazo sea positivo documentaremos su evolución hasta la doceava semana de gestación.

3.- ¿CUÁLES SON LOS REQUISITOS QUE SE TOMARÁN EN CUENTA PARA MI PARTICIPACIÓN?

Los requisitos para participar son: pacientes que se sometan a fertilización in vitro en el centro de medicina reproductiva de hospital universitario, en edades de 18-45 años, que hayan desarrollado embriones que contengan fragmentos. Enfatizamos que estos fragmentos no contienen material genético ni cromosómico que afecte a las características propias del embrión.

4.- ¿CUÁL ES EL TRATAMIENTO DEL ESTUDIO?

Este estudio no implica ningún tratamiento, ya que se trata de un estudio observacional. Con este estudio queremos obtener información adicional sobre la eliminación de fragmentos en embriones (tejido que no contiene ADN que se encuentra entre las células en desarrollo dentro del embrión) mejorando su calidad, y valorar si consecuentemente aumenta la probabilidad de embarazo.

5.- ¿CUÁLES SON LOS PROCEDIMIENTOS QUE SE ME REALIZARÁN?

El procedimiento que se le realizara ha sido explicado en consentimientos previamente firmados en el centro de medicina reproductiva. La eliminación de fragmentos en embriones es un procedimiento de rutina que se le realiza a embriones que han desarrollado cierta cantidad de material entre las células dentro del embrión pero que puede llegar a interferir con su desarrollo, donde a través de una técnica precisa y cuidadosa se extrae este tejido que no contiene ADN por lo que no afecta al futuro desarrollo de los mismos embriones.

6.- ¿QUÉ VA A HACER SI USTED DECIDE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

El médico del estudio determinara si cumple con los criterios del estudio y solicitara la firma de este documento. Al participar en este estudio no requiere de citas adicionales de las ya establecidas por su médico. Se seguirá la rutina normal de manejo y seguimiento de los embriones según las diferentes características que presenten. El estudio registrara su evolución en caso de prueba de embarazo positiva hasta la doceava semana de gestación.

7.- ¿CUÁLES SON LOS POSIBLES RIESGOS O MOLESTIAS?

Los fragmentos son tejidos anucleados dentro del embrión, por lo que no contienen ADN (no material genético). Múltiples estudios han demostrado que no conlleva mayor riesgo de alteraciones cromosómicas, ya que es resultado de un proceso fisiológico dentro del mismo embrión. La realización de estas técnicas no conlleva mayor riesgo ni molestias para su persona o futuro bebe.

8.- ¿CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS PARA USTED O PARA OTROS?

Los posibles beneficios para usted o otros es el poder mejorar la calidad embrionaria y por ende incrementar las posibilidades de que usted logre su embarazo.

9.- ¿QUÉ OTROS PROCEDIMIENTOS O TRATAMIENTOS PODRÍAN ESTAR DISPONIBLES PARA USTED?

La eliminación de fragmentos en embriones es un procedimiento de rutina como lo hemos establecido previamente, con el objetivo de mejorar las características del embrión sin afectar su contenido genético. Si usted no desea que se le realice la eliminación de fragmentos, se puede someter a un nuevo ciclo de estimulación y recuperación de ovocitos.

10.- ¿SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO LE GENERARÁ ALGÚN COSTO?

Este estudio no le generará ningún costo adicional, ya que es un procedimiento que se realiza de rutina a los embriones. No requiere medicamentos, ni citas adicionales.

11.- ¿SE LE PROPORCIONARÁ ALGUNA COMPENSACIÓN ECONÓMICA PARA GASTOS DE TRANSPORTACIÓN?

No se le proporcionara ninguna compensación económica para gastos de transportación porque no requiere citas adicionales que las requeridas por su protocolo de estimulación y fertilización in vitro.

12.- ¿RECIBIRÁ ALGÚN PAGO POR SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO?

Usted no recibirá ningún pago por la participación en este estudio.

13.- ¿SE ALMACENARÁN MUESTRAS DE SANGRE O TEJIDOS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES?

No se almacenarán muestras de sangre, tejidos o embriones para futuras investigaciones.

14.- ¿QUÉ DEBE HACER SI LE PASA ALGO COMO RESULTADO DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

El presente estudio es un estudio observacional, por lo que usted ni sus futuros bebés tendrán efectos adversos como consecuencia de este procedimiento.

15.- ¿CUÁLES SON SUS DERECHOS COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN?

Usted tiene derecho a ser tratado con respeto, incluyendo la decisión de continuar o no su participación en el estudio. Usted es libre de terminar su participación en este estudio en cualquier momento y sin repercusiones en su tratamiento o en el trato recibido.

16.- ¿PUEDE TERMINAR SU PARTICIPACIÓN EN CUALQUIER MOMENTO DEL ESTUDIO?

Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento. Si elige no participar o retirarse del estudio, su atención médica presente y/o futura no se verá afectada y no incurrirá en sanciones ni perderá los beneficios a los que usted tendría derecho de algún otro modo.

Su participación también podrá ser suspendida o terminada por el médico del estudio, sin su consentimiento, por cualquiera de las siguientes circunstancias:

- Que el estudio haya sido cancelado.
- Que el médico considere que es lo mejor para Usted.
- Que necesita algún procedimiento o medicamento que interfiere con esta investigación.
- Que no ha seguido las indicaciones del médico lo que pudiera traer como consecuencias problemas en su salud.

Si Usted decide retirarse de este estudio, deberá realizar lo siguiente:

- Notificar a su médico tratante del estudio
- Deberá de regresar todo el material que su médico le solicite.

Si su participación en el estudio se da por terminada, por cualquier razón, por su seguridad, el médico continuará con seguimientos clínicos. Además, su información médica recabada hasta ese momento podrá ser utilizada para fines de la investigación.

17.- ¿CÓMO SE PROTEGERÁ LA CONFIDENCIALIDAD DE SUS DATOS PERSONALES Y LA INFORMACIÓN DE SU EXPEDIENTE CLÍNICO?

Si acepta participar en la investigación, el médico del estudio recabará y registrará información personal confidencial acerca de su salud y de su tratamiento. Esta información no contendrá su nombre completo ni su domicilio, pero podrá contener otra información acerca de Usted, tal como iniciales y su fecha de nacimiento. Toda esta información tiene como finalidad garantizar la integridad científica de la investigación. Su nombre no será conocido fuera de la Institución al menos que lo requiera nuestra ley.

Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo con la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La solicitud será procesada de acuerdo con las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto con la finalidad de proteger la integridad del Estudio.

El centro de medicina reproductiva del UANL, la Facultad de Medicina y Hospital Universitario, así como el Investigador serán los responsables de salvaguardar la información de acuerdo con las regulaciones locales.

Usted tiene el derecho de solicitar por escrito al médico un resumen de su expediente clínico.

La información personal acerca de su salud y de su tratamiento del estudio podrá procesarse o transferirse a terceros en otros países para fines de investigación y de reportes de seguridad, incluyendo agencias

reguladoras locales (Secretaría de Salud SSA a través de la COFEPRIS), así como al Comité de Ética en Investigación y al Comité de Investigación de nuestra Institución.

Para los propósitos de este estudio, autoridades sanitarias como la Secretaría de Salud y el Comité de Ética en Investigación y/o el Comité de Investigación de nuestra Institución, podrán inspeccionar su expediente

clínico, incluso los datos que fueron recabados antes del inicio de su participación, los cuales pueden incluir su nombre, domicilio u otra información personal.

En caso necesario estas auditorías o inspecciones podrán hacer fotocopias de parte o de todo su expediente clínico. La razón de esto es asegurar que el estudio se está llevando a cabo apropiadamente con la finalidad de salvaguardar sus derechos como sujeto en investigación.

Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones o en publicaciones.

La información recabada durante este estudio será recopilada en bases de datos del investigador, los cuales podrán ser usados en otros estudios en el futuro. Estos datos no incluirán información médica personal confidencial. Se mantendrá el anonimato.

Al firmar este documento, Usted autoriza el uso y revelaciones de la información acerca de su estado de salud y tratamiento identificado en esta forma de consentimiento. No perderá ninguno de sus derechos legales como sujeto de investigación. Si hay cambios en el uso de su información, su médico le informará.

18.- SI TIENE PREGUNTAS O INQUIETUDES ACERCA DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN, ¿A QUIÉN PUEDE LLAMAR?

En caso de tener alguna pregunta relacionada a sus derechos como sujeto de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario podrá contactar al **Dr. José Gerardo Garza Leal**, presidente del Comité de Ética en Investigación de nuestra Institución o al **Lic Antonio Zapata de la Riva** en caso de tener dudas en relación con sus derechos como paciente.

Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n

Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León México.

CP 64460

Teléfonos: 83294050 ext. 2870 a 2874

Correo electrónico: investigacionclinica@meduanl.com

RESUMEN CONSENTIMIENTO

PARA LLENAR POR EL SUJETO DE INVESTIGACIÓN

- Mi participación es completamente voluntaria.

- Confirmo que he leído y entendido este documento y la información proporcionada del estudio

- Confirmo que se me ha explicado el estudio, que he tenido la oportunidad de hacer preguntas y que se me ha dado el tiempo suficiente para decidir sobre mi participación. Sé con quién debo comunicarme si tengo más preguntas.

- Entiendo que las secciones de mis anotaciones médicas serán revisadas cuando sea pertinente por el Comité de Ética en Investigación o cualquier otra autoridad regulatoria para proteger mi participación en el estudio.

- Acepto que mis datos personales se archiven bajo códigos que permitan mi identificación.

- Acepto que mis óvulos recolectados puedan usarse para los fines que convengan a este estudio.

- Acepto que mi médico general sea informado de mi participación en este estudio.

- Acepto que la información acerca de este estudio y los resultados de cualquier examen o procedimiento pueden ser incluidos en mi expediente clínico.

- Confirmo que se me ha entregado una copia de este documento de consentimiento firmado.

Nombre del Sujeto de Investigación

Firma

Fecha

PRIMER TESTIGO

Nombre del Primer Testigo

Firma

Dirección

Fecha Investigación

Relación con el Sujeto de

SEGUNDO TESTIGO

Nombre del Segundo Testigo

Firma

Dirección

Fecha
Investigación

Relación con el Sujeto de

PERSONA QUE OBTIENE CONSENTIMIENTO


He discutido lo anterior y he aclarado las dudas. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.


Nombre de la Persona que obtiene el Consentimiento

Firma

Fecha

9.3 CARTA AUTORIZACION DE COMITÉ DE ETICA

 **UANL**
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

 **FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO**

DR. LUIS HUMBERTO SORDIA HERNANDEZ
Investigador principal
Departamento de Ginecología y Obstetricia
Presente.-

Estimado Dr. Sordia:

En respuesta a su solicitud con número de Ingreso **PI19-00056** con fecha del **28 de febrero del 2019**, recibida en las Oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente **DICTAMEN FAVORABLE** con fundamento en los artículos 4° párrafo cuarto y 16 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; así como los artículos 14-16, 99 párrafo tercero, 102, 106 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud; así como de los artículos 111,112 y 119 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; Además Punto 4.4, 4.7, 6.2, 8de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento interno de Investigación de Nuestra Institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que su Protocolo de Investigación clínica abajo mencionado cuenta con la calidad técnica y mérito científico que la Sociedad Mexicana demanda.

"Efecto de eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión y su impacto sobre técnicas de reproducción asistida", registrado con la clave **G19-00004**.

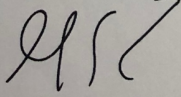
A continuación se enlistan los documentos aprobados:


- Protocolo en extenso, 3.0 de fecha 29 de Abril del 2019.

Le reitero que es obligación del Investigador principal presentar a este Comité de Investigación un informe técnico final.


Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior este debidamente consignado, en caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el beneficio y seguridad de todo el personal y sujetos en investigación.

Atentamente.-
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, Nuevo León 10 de Junio del 2019


DR. C. GUILLERMO ELIZONDO RIOJAS
Presidente del Comité de Investigación


COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

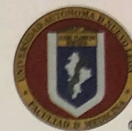
Comité de Investigación
Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: 818329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com


Full Accreditation
September 18, 2017



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

DR. LUIS HUMBERTO SORDIA HERNANDEZ

Investigador principal
Departamento de Ginecología y Obstetricia
Presente.-

Estimado Dr. Sordia:

Les informo que nuestro **Comité de Ética en Investigación** del Hospital Universitario "Dr. Jose Eleuterio Gonzalez", ha **evaluado y aprobado** el proyecto de investigación titulado: **"Efecto de eliminación de fragmentos en embriones en etapa de escisión y su impacto sobre técnicas de reproducción asistida"**, registrado con la clave **G119-00004**, participando además la Dra. Lorna Marissa Frazer Moreira, Lilit Villarreal Pineda, Est. Daniel Eduardo Alarcon Casanova y la Est. Brianda Enríquez Saenz como Co-Investigadores. Además del siguientes documentos.

- Protocolo en extenso, 3.0 de fecha 29 de Abril del 2019.
- Formato de Consentimiento Informado, versión 4.0 de fecha 10 de mayo del 2019

Le pedimos mantenernos informados del avance o terminación de su proyecto.

Sin más por el momento, me despido de ustedes.

Atentamente,
"Alere Flamman Veritatis"
Monterrey, N.L. 10 de Junio del 2019

DR. med. JOSE GERARDO GARZA LEAL
Presidente del Comité de Ética en Investigación

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



CAPITULO X
BIBLIOGRAFIA

1. Halvaei I, Khalili MA, Nottola AS. A Novel Method for Transmission Electron Microscopy Study of Cytoplasmic Fragments From Preimplantation Human Embryos. MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE. 2016 March; 79(459-462).
2. Halvaei I, Khalili M, Esfandiari N, et al. Ultrastructure of cytoplasmic fragments in human cleavage stage embryos. J Assist Reprod Genet. 2016 Dec; 33(12).
3. Safari S, Khalili M, Barekati Z, et al. Cosmetic micromanipulation of vitrified-warmed cleavage stage embryos does not improve ART outcomes: An ultrastructural study of fragments. Reproductive Biology. 2017 May; 17(3): 210-217.
4. Keltz M, Skorupski J, Bradley K, et al. Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in invitro fertilization. Fertility and Sterility. 2006 August; 86(2): 95-116.
5. Halvaei I, Ghazali S, Nottola AS. Cleavage-stage embryo micromanipulation in the clinical setting. Systems Biology in Reproductive Medicine. 2017 November.

6. Cohen J, Alikani M, Liu H, et al. Rescue of human embryos by micromanipulation. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 1994 March; 8(1).
7. Veck L. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In Rosenwaks Z, editor. *An Atlas of human gametes and conceptuses*. New York: Taylor & Francis Group; 1999. p. 46-51.
8. Hill G, Freeman M, Bastias M, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertility and Sterility*. 1989 Nov; 54(5).
9. Keltz M, Fritz R, Gonzales E, et al. Defragmentation of low grade day 3 embryos resulted in sustained reduction in fragmentation, but did not improve compaction or blastulation rates. *Fertility and Sterility*. 2010 November; 94(6).
10. Technology Sfar. Preliminary CSR for 2016 [SART national summary report]. United States of America; 2016.
11. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, et al. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human reproduction*. 2000 Dec; 15(12).
12. Ebner T, Yaman C, Moser M, et al. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertility and sterility*. 2001 August; 76(2).

13. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*. 1999 May; 71(5).
14. Gurgan T, Demiroglu A, Sari T, et al. Effect of Embryo fragment removal of day 3 embryos in recurrent implantation failure. *Fertility and Sterility*. 2005 September; 84(1).
15. Khalili M, Mojibian M, Sultan A. Role of oocyte morphology on fertilization and embryo formation in assisted reproductive technique. *Middle East fertility society journal*. 2005 Dec; 10(1).
16. Seok-Gi K, Kim Y, Park JY. Early fragment removal on in vitro fertilization day 2 significantly improves the subsequent development and clinical outcomes of fragmented human embryos. *Clin Exp Reprod Med*. 2018 Jul; 45(3).
17. Shah D, Missmer S, Berry K. Effect of Obesity on Oocyte and Embryo Quality in Women Undergoing In Vitro Fertilization. *The American College of Obstetricians and Gynecologists*. 2011 July; 118(1).
18. Maheshwari A, Stofberg L. Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review. *Human Reproduction Update*. 2007; 13: 433-34.
19. Shah D, Missmer S, Berry K. Effect of Obesity on Oocyte and Embryo Quality in Women Undergoing In Vitro Fertilization. *The American College of Obstetricians and Gynecologists*. 2011 July; 118(1).

20. Bosch E, Labarta E. Regimen of ovarian stimulation affects oocyte and therefore embryo quality. *Fertility and Sterility*. 2016 January;; 0015-0282.
21. Check JH, Summer-Chse D. The Importance of Blastomere Number, Fragmentation and Symmetry as Determined by Evaluation of Outcome of Single Embryo Transfer. *Fertility and Sterility*. 2005 May; 83(Suppl 2).
22. Eftekhari-Yazdi P, Rezazadeh M. Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos. *Reproductive BioMedicine Online*. 2006; 13(6): 823-832.
23. Alikani M. The origins and consequences of fragmentation in mamalian eggs and embryos. In Elder K, Cohen J, editors. *Human preimplantation embryo selection*. London: Informa Healthcare; 2007. p. 51-78.
24. Hee-Jun C, Jung-Jin K, Soon-Young C. Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. *Fertility and sterility*. 2011 July; 96: 0015-0282.
25. Fujimoto V, Browne R, Bloom M, et al. Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertility and Sterility*. 2011 March; 95(4).
26. Halvae I, Khalili M, Safari S, et al. Ongoing Pregnancies following Cosmetic Micromanipulation of Preimplantation Embryos in Patients with Implantation Failure. *Hindawi Publishing Corporation*. 2015 June; 2015(Case report in medicine).

27. Chavez S, Loewke K, Han J, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four cell stage. *Nature communications*. 2012 Dec;(2249).
28. Liu W, Luo M, Huang P, et al. EFFECTS OF REMOVAL OF NECROTIC BLASTOMERES FROM HUMAN CRYOPRESERVED EMBRYOS ON PREGNANCY OUTCOME. *CryoLetters*. 2007; 28(2).
29. Lu X, Liu Y, Cao X. Laser-assisted hatching and clinical outcomes in frozen-thawed cleavage-embryo transfers of patients with previous repeated. *Lasers in Medical Science*. 2019 January.
30. Li D, Yang DL, An J. Effect of assisted hatching on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Scientific Reports*. 2016 August; 6.
31. Hardy K, Stark J, Winston R. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biology of Reproduction*. 2003 Apr; 68(4).
32. Warner C, Cao W, Exley G, et al. Genetic regulation of egg and embryo survival. *Hum Reprod*. 1998 Jun; 13(3).
33. HMG is as good as recombinant human FSH in terms of oocyte and embryo quality: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*. 2001 Feb; 16(2).
34. Check J, Summer-Chase D, Yuan W. The Importance of Blastomere Number, Fragmentation and Symmetry as Determined by Evaluation of

- Outcome of Single Embryo Transfer. *Fertility & Sterility*. 2005 May; 83(Suppl 2).
35. Alikani M, Ferry K, Tomkin G, Garrisi M. High pregnancy loss rate following implantation of IVF human embryos with extensive fragmentation. *Fertil Steril*. 2008 Sept; S90(S113-4).
 36. Van de Velde H, De Vos A, Joris H, et al. Effect of timing of oocyte denudation and microinjection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998 Nov; 13(11).
 37. Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R, et al. Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998 Apr; 13(4).
 38. Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992 Jul; 340(8810).
 39. Palermo G, Cohen J, Alikani M, et al. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7(2).
 40. Ardoy M, Calderon G, Cuadros J. Criterios de valoración morfológicos de oocitos. *Cuaderno de embriología clínica*. Madrid: ASEBIR. 2007.
 41. Desai N, Goldstein J, Rowland D, et al. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod*. 2000 Oct; 15(10).

42. Juriscova A, Casper R, Varmuza S. Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise. *Fertil Steril.* 1999; 1(6).
43. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effect on development competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Human Reprod.* 1999 Feb; 14(2).

CAPITULO XI
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Lorna Marissa Frazer Moreira

Candidata para el grado de

Subespecialista en Biología de la Reproducción Humana

**Tesis: EFECTO DE ELIMINACIÓN DE FRAGMENTOS EN EMBRIONES EN
ETAPA DE ESCISIÓN Y SU IMPACTO SOBRE TÉCNICAS DE
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en Tegucigalpa, Francisco Morazán, Honduras; el 24
de septiembre 1988.

Educación: Egresada de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras
obteniendo el grado de Médico cirujano y partero en el año 2013. Y egresada
por la misma universidad obteniendo el grado de Ginecología y Obstetricia en el
año 2016.

CAPITULO XII

ABSTRACT

Introduction:

One of the most important factors that determines the success of assisted reproduction techniques (ART) is the quality of embryos generated in vitro. Fragmentation or generation of small anuclear cytoplasmic fragments is a common feature of developing human embryos. The mechanism of its generation is not known, but they have adverse effects on ART such as a lower implantation and pregnancy rate.

Several researchers have removed these fragments in order to improve reproductive results, but the findings have been controversial and not definitive.

Objectives:

Determine if the removal of fragments in embryos during excision stage improves pregnancy rates in the IVF and ICSI cycles.

Materials and methods:

A prospective, observational, cross-sectional study of cases and controls was conducted in patients undergoing IVF/ICSI at the Center for Reproductive Medicine of the University Hospital of the UANL. The cases were patients with 2 or 3 quality embryos, who underwent cosmetic micromanipulation prior to transfer. The controls were patients with quality 1 embryos, to whom no cosmetic micromanipulation was performed. Quantitative variables are expressed in measures of central tendency and analysis of variance. The chi-square method was used to search for a statistical relationship of qualitative variables. Considering an alpha error of 5%, a value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Ethical aspects:

It was approved by the research ethics committee of the Autonomous University of Nuevo León, accepted with the registration key GI19-00004.

Results:

26 patients were analyzed, 13 in each group. The dose of FSH received by the control group was significantly higher (2896 ± 718 mg vs. 2325 ± 626 mg) at the dose received by the controls ($p = 0.04$). No statistically significant relationship was found between performing cosmetic micromanipulation and the pregnancy rate; however, there was a tendency for a higher proportion of biochemical and clinical pregnancies among patients whose embryos were subjected to fragment removal (38.5% vs. 30.8%, $p = 0.7$).

Conclusions:

The removal of fragments in embryos during the excision stage with a moderate degree of fragmentation (<50%) equals the reproductive results of embryos without fragmentation. These findings should be corroborated with multicenter and randomized studies that allow a larger sample.

Keywords: Fragment removal, In vitro fertilization, pregnancy rate, abortion, embryonic quality, cosmetic micromanipulation.