

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



CARACTERÍSTICAS SEMINALES Y SU EFECTO EN LA VIABILIDAD DE EMBRIONES OBTENIDOS POR REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EL CENTRO DE FERTILIDAD Y GINECOLOGÍA DEL SUR – CUSCO

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. Gaby Jaqueline Bernal Torres

**PARA OPTAR AL TÍTULO
PROFESIONAL DE:**

Biólogo.

ASESOR:

M. Sc. Jorge Acurio Saavedra

CUSCO – PERÚ

2019

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur (CFGS) - Cusco, a su director médico, el Ginecólogo especialista en Fertilidad, Luis Vargas Tominaga, y a todo el equipo del laboratorio del CFGS, que me acompañaron en mi formación y en la obtención de los datos para el presente estudio.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y a toda la plana de docentes de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias.

A mi asesor Blgo. M. Sc. Jorge Acurio Saavedra por el asesoramiento y apoyo en el presente trabajo de investigación, así como también por su infinita paciencia, profesionalismo, y enseñanza, que me ayudaron en mi formación profesional.

A todas las personas que me ayudaron no solo en mi formación profesional sino también en todos los aspectos de mi vida, mis padres, hermanos amigos que me apoyaron y alentaron en la culminación del presente estudio. Gracias.

DEDICATORIA

*Con todo mi amor para mis queridos padres, Victor y Encarnación,
por comprenderme, apoyarme siempre, y darme una vida maravillosa.*

Sin ellos nunca hubiera llegado hasta donde estoy,

*A mis queridos hermanos, Erika, Albert y mis cuñados,
que no solo son mi familia sino también mis amigos.*

A mis hermosas sobrinas que llenan mi vida de alegría.

*A mí querida tía Ceferina, y a toda mi familia por estar
siempre presente en mi vida, apoyarme y comprenderme.*

ÍNDICE

Pag.

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	IV
JUSTIFICACIÓN	V
OBJETIVOS	VI
HIPOTESIS.....	VII
I. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES:.....	1
1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES:.....	6
1.1.3 ANTECEDENTES LOCALES	7
1.2 GENERALIDADES.....	7
1.2.1 GAMETO MASCULINO - ESPERMATOZOIDE	7
1.2.2 MORFOLOGÍA DEL GAMETO MASCULINO.....	9
1.2.3 FACTORES IMPLICADOS EN LA DISMINUCIÓN DE LA FERTILIDAD MASCULINA ASOCIADA A TERATOZOOSPERMIA.....	11
1.2.4 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA NATURAL.....	11
1.2.5 VALORACIÓN DEL SEMEN.....	12

1.2.6	INTERPRETACIÓN DEL EXAMEN ESPERMATOBIOSCOPICO.....	13
1.3	GAMETO FEMENINO:.....	17
1.3.1	DESARROLLO DEL OVOCITO:	18
1.4	FUNCIÓN DEL MOCO CERVICAL EN EL PASO DE LOS ESPERMATOZOIDES A TRAVÉS DEL CUELLO UTERINO.	21
1.5	EL ENDOMETRIO EN EL RECORRIDO ESPERMÁTICO	21
1.6	RECORRIDO DEL ESPERMATOZOIDE A TRAVÉS DEL OVIDUCTO E INTERACCIÓN CON SUS CÉLULAS.....	22
1.7	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA (ICSI)	23
1.7.1	PUNCIÓN FOLICULAR: RECUPERACIÓN DE OVOCITOS.....	23
1.7.2	CLASIFICACIÓN DEL COMPLEJO CORONA-CÚMULO-OVOCITO ...	23
1.7.3	MORFOLOGÍA OVOCITARIA	26
1.8	CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA <i>IN VITRO</i>	29
1.8.1	GRADIENTES DE DENSIDAD.....	30
1.8.2	INMOVILIZACIÓN Y ASPIRACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.....	30
1.9	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA PROPIAMENTE DICHO.....	31
1.10	VALORACIÓN DE LA FECUNDACIÓN	32
1.11	CLASIFICACIÓN DE LOS CIGOTOS	33
1.11.1	TAMAÑO Y POSICIÓN RELATIVA DE LOS PRONÚCLEOS	33
1.11.2	CUERPOS PRECURSORES DE NUCLEÓLOS	33

1.11.3 HALO CITOPLASMÁTICO:.....	34
1.12 FECUNDACIÓN ANÓMALA	34
1.12.1 CIGOTOS CON UN SOLO PRONÚCLEO	34
1.12.2 CIGOTOS CON TRES O MÁS PRONÚCLEOS	34
1.12.3 FALLOS DE LA FECUNDACIÓN	35
1.13 VALORACIÓN MORFOLÓGICA DEL BLASTOCISTO	35
1.13.1 TIPOS DE BLASTOCISTO	36
1.13.2 PARTES DEL BLASTOCISTO	38
II. MATERIALES Y MÉTODOS	42
LUGAR DE	42
2.1 EJECUCIÓN DEL TRABAJO	42
2.2 MATERIALES	42
2.3 METODOLOGÍA	44
2.3.1 VARIABLES:.....	46
2.3.2 ESPERMATOBIOSCOPIA:.....	46
2.3.3 RECUPERACIÓN DE OVOCITOS DURANTE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR (Pella & Bartolo, 2013).....	51
2.3.4 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA (Selles, <i>et al.</i> , 2012) (Fig. 26) (Anexo 4).....	54

2.3.5	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE (Pella & Bartolo, 2013) (Fig. 27) (Anexo 5)	56
2.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
3.1	EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MOTILIDAD, LA MORFOLOGÍA Y CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN SEMEN HUMANO.....	62
3.2	RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE FECUNDACIÓN, TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS Y TASA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA.	65
3.2.1	RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE FECUNDACIÓN.....	65
3.2.2	RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS	66
3.2.3	RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA	68
3.3	RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS, TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS, Y TASA BUENA CALIDAD DE BLASTOCISTOS.....	69
3.3.1	RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS.....	69

3.3.2	RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS.....	70
3.3.3	RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA	71
3.4	RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS, TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS Y TASA DE BUENA CALIDAD DE BLASTOCISTOS.....	73
3.4.1	RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS.....	73
3.4.2	RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS.....	74
3.4.3	RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA.....	75
	CONCLUSIONES.....	80
	RECOMENDACIONES.....	81
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	82
	ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Pag.

FIGURA 1: Secuencia de estadios de la maduración del espermatozoide (Gilbert, 2005).	8
FIGURA 2: Descripción del espermatozoide (Martínez <i>et al.</i> 2013).	10
FIGURA 3: Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides humanos (WHO, 2010).	16
FIGURA 4: Ovocito en estadio MII, puede observarse la corona laxa (A), que permite visualizar el corpúsculo polar en la posición horario de los 5 h (200 X). (Pehlivan 2013).	24
FIGURA 5: Ovocitos de Grado I, la flecha A señala una estructura que puede ser el primer corpúsculo polar (200 X) (Pehlivan 2013).	25
FIGURA 6: Ovocitos de Grado II, la flecha señala el primer corpúsculo polar (200 X) (Pehlivan 2013).	25
FIGURA 7: Ovocito normal (200 X) (Romero <i>et al.</i> , 2013).	26
FIGURA 8: Alteración del corpúsculo polar, la flecha señala el corpúsculo polar alterado (200 X) (Romero <i>et al.</i> , 2013).	27
FIGURA 9: Alteración del espacio perivitelino, la flecha señala el espacio perivitelino amplio (200 X) (Romero <i>et al.</i> 2013).	28
FIGURA 10: Ovocito con zona pelucida gruesa, la flecha hace referencia a la alteración (200 X) (Romero <i>et al.</i> , 2013).	29
FIGURA 11: Ovocito con zona pelucida estrecha, la flecha señala la alteración (200 X) (Romero <i>et al.</i> , 2013).	29

FIGURA 12: Representación esquemática de los cuatro grupos de cigotos en función del número y distribución de los cuerpos precursores de nucléolos. (Gamiz <i>et al.</i> 2013)...	33
FIGURA 13: Ovocitos con fecundación anómala (200 X) (Gamiz <i>et al.</i> 2013).....	35
FIGURA 14: Ovocitos con fecundación anómala (Gámiz <i>et al.</i> 2013)	35
FIGURA 15: Blastocisto cavitado, la flecha señala la m.c.i. (Masa celular interna) (200 X) (Mercader <i>et al.</i> , 2013).....	36
FIGURA 16: Blastocisto expandido (200 X) (Mercader <i>et al.</i> , 2013).....	37
FIGURA 17. Blastocisto eclosionado, la flecha señala la salida del blastocele de la zona pelucida (200 X) (Mercader <i>et al.</i> 2013).....	37
FIGURA 18. Blastocisto eclosionando, las flechas señalan el lugar de la eclosión (200 X) (Mercader <i>et al.</i> , 2013).....	38
FIGURA 19. Masa celular interna de tipo A, la flecha señala la m.c.i. (200 X) (Mercader <i>et al.</i> , 2013).	39
FIGURA 20. Masa celular de tipo B (200 X) (Mercader <i>et al.</i> , 2013).	39
FIGURA 21. Masa de celular interna tipo C. La flecha señala la masa celular interna (200 X) (Mercader <i>et al.</i> 2013)	40
FIGURA 22. Embrión de tipo D. Las flechas señalan la masa celular interna degenerada (200 X) (Mercader <i>et al.</i> , 2013)	40
FIGURA 23. Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad y del MCI y el trofoectodermo (ASEBIR , 2015).	41
FIGURA 24: Procedimiento en el que se explica el paso a paso del procedimiento de ICSI	45
FIGURA 25: Método usado para el análisis de semen humano (Espermatobioscopía)	50

FIGURA 26: Procedimiento de aspiración y pelado de los cúmulo ovocitos.....	53
FIGURA 27: Procedimiento de la capacitación espermática	55
FIGURA 28: Clasificación blastocitaria según ASEBIR (Cortés et al., 2008).....	59
FIGURA 29: Secuencia del procedimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides humanos	60
FIGURA 30: Evaluación de la fecundación de los ovocitos inyectados mediante ICSI.	78
FIGURA 31: Evaluación del desarrollo de blastocistos según el porcentaje de desarrollados en cada caso (N).	79
FIGURA 32: Evaluación de la buena calidad embrionaria.	79
FIGURA 33: Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur.....	88
FIGURA 34: Llevar la muestra de semen a la incubadora 37 °C.....	89
FIGURA 35: Preparación de la placa para analizar la motilidad.....	89
FIGURA 36: Preparación de la cámara Neubauer para evaluar la concentración espermática.....	89
FIGURA 37: Se realiza un frotis a la muestra de semen para evaluar la morfología...	89
FIGURA 38: Tinción de la placa.....	89
FIGURA 39: Se llevan las placas al microscopio para su observación.....	89
FIGURA 40: Evaluación de la motilidad espermática. (400X).....	90
FIGURA 41: Evaluación de la concentración espermática. (400X).....	90
FIGURA 42: Evaluación de la morfología espermática. (1000X).....	90

FIGURA 43: Se mantiene la muestra de semen en la incubadora a 37 °C.....	91
FIGURA 44: Atemperar los tubos contenidos de los gradientes y el medio de lavado..	91
FIGURA 45: Se rotulan los tubos con el nombre de los pacientes.....	91
FIGURA 46: Se atemperan los materiales fungibles para realizar el procedimiento....	91
FIGURA 47: Se prepara el tubo con los gradientes y el medio de cultivo.....	91
FIGURA 48: Se llevan a la incubadora todos los tubos preparados.....	91
FIGURA 49: Los tubos se mantienen en la incubadora a 37 °C.....	92
FIGURA 50: El rango de tiempo en el que se encontraran en la incubadora será de 10 minutos.....	92
FIGURA 51: Se colocan 10 microlitros de la muestra en la cámara Makler.....	92
FIGURA 52: Se extraen 10 microlitros de la muestra.....	92
FIGURA 53: Colocar el cubre de la cámara.....	92
FIGURA 54: Llevar la cámara Makler al microscopio para la evaluación de la muestra.....	92
FIGURA 55: Contar la cantidad de espermatozoides motiles pre capacitación espermática (200 X).....	93
FIGURA 56: Verter la muestra seminal en el tubo con los gradientes de densidad y centrifugar.....	93

FIGURA 57: Descartar el sobrenadante y dejar solamente la muestra decantada.....	93
FIGURA 58: Descartar el sobrenadante y dejar solamente la muestra decantada.....	93
FIGURA 59: Sacar la muestra del fondo del tubo cónico con una pipeta de plástico estéril.....	93
FIGURA 60: Trasladar la muestra al tubo contenido del medio de lavado.....	93
FIGURA 61: Centrifugar, descartar el sobrenadante hasta dejar una pequeña cantidad en el tubo por encima de la, sacar 10 microlitros de la superficie y verterla en la cámara Makler.....	94
FIGURA 62: Evaluar la muestra en la cámara Makler post capacitación espermática (400X).....	94
FIGURA 63: Preparar las placas de cultivo en la cámara de seguridad.....	95
FIGURA 64: Observación de las agujas de microinyección.....	97
FIGURA 65: Preparación de las agujas de microinyección.....	97
FIGURA 66: Se inyectaran los espermatozoides en los óvulos donados.....	97
FIGURA 67: Traslado de los ovocitos inyectados a la placa de cultivo.....	97
FIGURA 68: Traslado de las placas de cultivo a la incubadora.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Pag.

Tabla 1: Análisis espermatooscópico en semen humano de 58 pacientes del CFGS.	62
Tabla 2: Análisis espermatooscópico en semen humano incluyendo elementos estadísticos	63
Tabla 3: Análisis de la frecuencia de múltiples alteraciones en muestras espermáticas específicas en semen humano en 58 casos evaluados en el CFGS	64
Tabla 4: Relación entre la motilidad espermática y la fecundación de los ovocitos inyectados por caso	66
Tabla 5: Relación entre la motilidad espermática y el desarrollo de blastocistos de los ovocitos inyectados por caso.	67
Tabla 6: Relación entre la motilidad espermática y la buena calidad de blastocistos de los ovocitos inyectados por caso.....	68
Tabla 7: Relación entre la concentración espermática y la fecundación de los ovocitos inyectados por caso.	69
Tabla 8: Relación entre la concentración espermática y el desarrollo de blastocistos del total de ovocitos inyectados por caso.....	71
Tabla 9: Relación entre la concentración espermática y blastocistos con buena calidad del total de ovocitos inyectados por caso.....	72
Tabla 10: Relación entre la morfología espermática y fecundación de los ovocitos inyectados	73
Tabla 11: Relación entre la morfología espermática y desarrollo a blastocistos de los ovocitos inyectados por caso.	74

Tabla 12: Relación entre la morfología espermática y la buena calidad de los blastocistos del total de ovocitos inyectados por caso..... 76

Tabla 13: Evaluación de la fecundación, desarrollo de blastocistos y buena calidad embrionaria de los ovocitos evaluados por caso..... 78

RESUMEN

La presente investigación fue realizada en el Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur de la ciudad del Cusco, en los laboratorios de Andrología y Embriología clínica, en el cual se efectúan los diferentes procedimientos de reproducción humana asistida, para ayudar a los pacientes con problemas de infertilidad.

Esta investigación comprende un estudio retrospectivo de los diferentes casos encontrados en el Centro, desarrollado en diferentes etapas, la recopilación de bibliografía y datos hasta el estudio estadístico de los mismos resolviendo las interrogantes planteadas.

Se estudiaron 58 casos de parejas que acudieron a realizarse procedimientos de reproducción asistida, en la modalidad de Inyección intracitoplasmática de espermatozoides propios y óvulos donados, entre los años 2015 al 2017, de los cuales 66.42% tenían alteraciones espermáticas, siendo la alteración de la morfología espermática la más prevalente.

El alcance de la presente investigación fue ampliada hasta el estudio de la calidad de blastocistos de quinto día, en el cual se pudo estudiar el alcance que tienen las alteraciones espermatozoides en la calidad embrionaria.

La población estudiada muestra que la morfología espermática alterada afecta a la cantidad de blastocistos desarrollados por caso, demostrándose que 29 (50%) de los 58 casos estudiados, pasaron de óvulos fecundados a ser blastocistos en una cantidad menor al 50%. Datos obtenidos mediante el análisis de varianza de la correlación. Demostrando de esta manera que la alteración de la morfología espermática probablemente sea la causante de dicha dificultad evolutiva de los embriones.

INTRODUCCIÓN

En la sociedad humana, la procreación es un suceso complejo resultado de la interacción de procesos biológicos y sociales. La generación de descendencia es un acto social fundamental y no un mero hecho de la naturaleza, que cambia el estatus de los progenitores y por el que se reconstituyen sus vínculos. Aunque los efectos de la infertilidad son biológicos y sociales, su concepto hace referencia a las disfunciones exclusivamente biológicas del proceso de reproducción humana. Los tratamientos para fertilidad se ejercen sobre la dimensión biológica de la procreación y tienen por objeto proporcionar un hijo biológico a los pacientes, con el genotipo de estos o con el genotipo de uno de ellos en caso de donación (Bestard *et al.*, 2003).

El estudio primario en el varón de la pareja infértile, se inicia con un análisis predictivo, mediante la espermatobioscopia, en la cual se valoran las principales características que conforman el semen. En la actualidad se realiza según los lineamientos del manual del semen humano de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a excepción de la evaluación morfológica, según el criterio estricto de (Kruger *et al.*, 1988). El análisis del semen está orientado a la valoración de dos parámetros: macroscópico (volumen, apariencia, viscosidad, licuefacción y pH) y microscópico (presencia de otros cuerpos celulares, vitalidad, concentración, motilidad y morfología espermática); ambos reflejan la salud de los órganos propios del aparato reproductor masculino (Sanchez *et al.*, 2014), pero también podría ser un predecesor de la viabilidad de los embriones.

Las causas que conllevan a una pareja a realizar procedimientos de reproducción asistida, específicamente mediante programas de ICSI (Inyección intracitoplasmática de espermatozoides), son muchas; en el caso de la mujer la baja reserva ovárica permite optar por la donación de óvulos y en el caso del varón características como la azoospermia, teratozoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia, abortos repetitivos, prolongación de tratamientos de fertilidad; que finalmente pueden afectar en la calidad embrionaria producto de tal procedimiento; así como lo menciona Kruger *et al.*, (1988) que los resultados de fertilización *In vitro* fueron subóptimos cuando la proporción

de espermatozoides es menor a 4%; Collodel *et al.*, (2007), sugieren que la presencia de aneuploidias podría estar asociada con la reducción de la motilidad del esperma y, por lo tanto, con un resultado comprometido, y Strassburger *et al.*, (2000), describieron que un predictor negativo para los resultados de ICSI es el recuento muy bajo de espermatozoides ($<1 \times 10^4$).

El presente trabajo tiene por finalidad evaluar las características seminales estudiadas mediante espermatobioscopía y su relación con la viabilidad de los embriones en el procedimiento de reproducción asistida denominada inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las características seminales como la concentración, motilidad y morfología pueden alterarse debido a varias causas: Pre testiculares como infecciones sistémicas, incluyendo enfermedades virales y tuberculosis; testiculares como varicocele; post testiculares como la obstrucción de conductos eyaculadores; infecciones genitourinarias; causas inmunológicas y factores idiopáticos de igual manera (Palma & Vinay, 2014).

Es importante entender el papel que tiene el gameto masculino en el proceso de la reproducción asistida, que muchas veces se deja de lado. Se debe de puntualizar lo siguiente, que el procedimiento de ICSI se creó precisamente para proporcionar a las parejas infértiles una solución a su problema, en las que el varón ofrece pobres características en la calidad del semen (Sanchez *et al.*, 1999).

En el presente estudio se pretende a través de un análisis espermatooscópico determinar estas características seminales ya antes mencionadas y con la ayuda de un estudio estadístico poder evaluar la relación entre estas con las tasas de tres estadios de desarrollo embrionario los cuales comprenden la tasa de fecundación, tasa de desarrollo de blastocito y la tasa de buena calidad embrionaria. Por las cuales se podrá determinar si estas influyen en la calidad de los embriones obtenidos por procedimientos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides y óvulos donados, de pacientes que acuden, al Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur de la ciudad del Cusco, muestreo que se efectuó en el período comprendido a partir del año 2015 hasta el 2017, tomando en cuenta parámetros propuestos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) y la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Ahumada *et al.*, 2006), por lo que se plantea la interrogante siguiente:

¿Las características seminales estudiadas afectaran considerablemente en la viabilidad de los embriones producto del procedimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides humanos y ovodonación en el Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur?

JUSTIFICACIÓN

Es importante determinar la influencia que tiene las alteraciones espermáticas como la astenozoospermia, oligozoospermia y teratozoospermia en las diferentes tasas de estadíos del desarrollo embrionario *In vitro* como son la tasa de fecundación, desarrollo de blastocistos y buena calidad embrionaria, la cual podría ser un predecesor para saber si este embrión podrá implantarse y probablemente desarrollarse hasta un embarazo a término o final. El estudio de esta influencia ayuda a los profesionales en la reproducción asistida no solo a brindar a los pacientes un mejor tratamiento de fertilidad, y sobre todo con mejores resultados los cuales en este caso es un embarazo exitoso, ya que las repetidas intervenciones y repetidas fallas de implantación afectan a la pareja no solo en la parte fisiológica, emocional sino también psicológica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar las características seminales y su efecto en la viabilidad de embriones obtenidos por reproducción asistida en el Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur – Cusco

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar y caracterizar por espermatobioscopía la motilidad *in vivo*, la morfología y concentración de espermatozoides *post mortem* en semen humano, de pacientes del CFGS.
- Determinar la relación entre motilidad espermática y las tasas de fecundación, desarrollo de blastocitos y buena calidad embrionaria.
- Establecer la relación entre concentración espermática y las tasas de fecundación, desarrollo de blastocitos y buena calidad embrionaria.
- Determinar la relación entre morfología espermática y las tasas de fecundación, desarrollo de blastocitos y buena calidad embrionaria.

HIPOTESIS

Las características seminales alteradas como astenozoospermia, oligozoospermia y teratozoospermia afectan considerablemente en la tasa de fecundación, tasa de desarrollo de blastocistos y tasa de buena calidad embrionaria producto del procedimiento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides y óvulos donados de pacientes que acuden al Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES:

- **HIRSCH *et al.* (1986) y VAN UEM *et al.* (1985).** En sus estudios “*In vitro* fertilization in couples with male factor infertility” y “Male factor evaluation in *In vitro* fertilization: Norfolk experience” indican que, la reducción en la tasa de embarazo se atribuye principalmente a una baja tasa de fertilización debido a una disminución en el conteo y / o motilidad de los espermatozoides.
- **KRUGER *et al.* (1988).** Revelaron que, en aquellas parejas sometidas a procedimientos de FIV (Fertilización *In vitro*), la tasa de fertilización fue de 7,6% en el grupo que tenía menos de 4% de formas normales, a diferencia del 63% cuando la morfología era mayor del 14% de formas normales, en una publicación nombrada como “Predictive value of abnormal sperm morphology in IVF”.
- **MANSOUR *et al.*, (1995).** Arguyeron en un estudio intitulado “The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection”, que las tasas de fertilización y embarazo no se ven afectadas por los diferentes parámetros del semen, siempre y cuando se puedan usar espermatozoides vivos y morfológicamente bien formados para la inyección, en el estudio se valoraron 130 parejas con diagnóstico de infertilidad masculina o con fertilización fallida previa en FIV convencional o inyección subzonal de esperma, se recuperaron un total de 1,433 ovocitos y se inyectaron 1,071 ovocitos en metafase II. La fecundación normal ocurrió en 620 ovocitos (58%). La transferencia de embriones se realizó en 128 (98,5%) pacientes y se logró un total de 46 (35%) embarazos clínicos. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las tasas de fertilización o embarazo entre los pacientes que habían fracasado

previamente en la FIV convencional, los pacientes con semen subfétil, los pacientes con semen entre $1 \text{ y } 10 \times 10^6 / \text{mL}$, y los pacientes con semen $< 1 \times 10^6 / \text{mL}$. Tampoco hubo diferencias significativas en las tasas de fertilización y embarazo entre los pacientes con $< 95\%$ o $> 95\%$ de teratozoospermia (alteración morfológica de los espermatozoides).

- **OMBELET et al. (1995).** Consideraron que la morfología estricta tiene una importante relevancia clínica, al punto tal que se le considero como un biomarcador de la capacidad fecundante *in vivo* e *In vitro*, independiente de la motilidad y la concentración, en su publicación intitulada “Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility”.
- **NAGY et al. (1995).** Asumieron que cuando el recuento de espermatozoides se enfrentaba con su motilidad, este último era el más relacionado con un buen resultado en el ciclo de ICSI, alcanzaron estas conclusiones por medio del estudio “The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters”. La relación entre tres parámetros básicos de espermatozoides (recuento total de espermatozoides, motilidad y morfología del espermatozoide) y el resultado de ICSI mediante análisis retrospectivos de fertilización, desarrollo de embriones y tasas de embarazo en 966 ciclos de microinyección, realizado con semen eyaculado. Los resultados mostraron que no hubo una influencia importante ni del tipo ni del alcance del deterioro del espermatozoide en el resultado de ICSI. Incluso en los casos más extremos de infertilidad masculina, donde se diagnosticó criptozoospermia o asteno total o teratozoospermia total en la muestra de semen inicial, ICSI obtuvo altas tasas de fertilización y embarazo. Solo una condición tuvo una fuerte influencia negativa en el resultado de la ICSI: donde se inyectó un espermatozoide inmóvil (presumiblemente muerto) en el ovocito. Por lo tanto, el único criterio final para el éxito de ICSI, según el mencionado estudio, es la presencia de al menos un espermatozoide vivo por ovocito en el sedimento de la muestra de semen tratada utilizada para la microinyección.

- **SAKKAS et al. (1999).** Señalaron en un artículo titulado “Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway” que, los espermatozoides con fragmentación en las cadenas de ADN son normalmente eliminados durante la espermatogénesis, como un mecanismo de control, pero pueden persistir en el eyaculado debido a una falla en el proceso de apoptosis, lo que podría resultar en una fecundación con desarrollo embrionario anormal y posterior muerte del embrión.
- **STRASSBURGER et al. (2000).** Describieron que un predictor negativo para los resultados de ICSI es el recuento muy bajo de espermatozoides ($<1 \times 10^4$), en un estudio denominado “Very Low Sperm Count Affects the Result of Intracytoplasmic Sperm Injection” en la que observaron una disminución significativa en la tasa de embarazo en el grupo criptozoospermico en comparación con el grupo control (20% frente a 31%). La tasa de fertilización en el grupo de muestras criptozoospermicas (Ausencia de espermatozoides en la muestra de semen eyaculado, pero presentes en el sedimento de la misma muestra centrifugada), fue significativamente más baja en comparación con todos los otros grupos evaluados, respectivamente. La calidad del embrión fue inferior en el grupo criptozoospermico en comparación con el grupo control y se observó una tasa de aborto más alta pero no estadísticamente significativa en el grupo criptozoospermico en comparación con el grupo control (15%).
- **VAN RUMSTE et al. (2000) ESHRE, Capri Workshop Group (2007).** Mostraron que el conteo total de motiles en semen humano es un predictor de fracaso de la fertilización y las tasas de embarazo durante el tratamiento de fertilización *In vitro*, arrojando resultados contradictorios a otros autores. Estos resultados fueron expuestos en dos publicaciones, “Intracytoplasmic sperm injection versus partial zona dissection, subzonal insemination and conventional techniques for oocyte insemination during *In vitro* fertilisation “ e “. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: evidence and evolution” respectivamente.

- **TESARIK (2005).** En su estudio encabezado como “Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo”, menciona que, las divisiones celulares en el embrión de preimplantación humana pueden verse comprometidas por deficiencias en el genoma nuclear del esperma o factores citoplásmicos relevantes para el desarrollo derivados del esperma, la sustancia activadora de ovocitos y el centriolo. Las deficiencias nucleares de los espermatozoides generalmente no se detectan antes de la etapa de desarrollo de 8 embriones de las células, cuando ha comenzado una expresión importante de los genes derivados de los espermatozoides.
- **CHATZIMELETIOU *et al.* (2007).** Informó que la motilidad espermática se correlaciona directamente con la tasa del desarrollo de 2 pronúcleos (2PN), las profundas deformidades del citoesqueleto sirven como un factor hipotético que podría explicar dicha correlación, en su artículo intitulado “Is the sperm centrosome to blame for the complex polyploid chromosome patterns observed in cleavage stage embryos from an OAT patient?”.
- **COLLODEL *et al.* (2007).** Sugirieron que la presencia de aneuploidias podría estar asociada con la reducción de la motilidad del esperma y, por lo tanto, con un resultado comprometido, estudio expuesto con el nombre de “Sperm aneuploidies and low progressive motility”.
- **GILL *et al.* (2007)** Revelaron, en su artículo intitulado “Muerte embrionaria temprana ¿Tiene influencia el factor masculino?” que, diversas variaciones en las células espermáticas podrían conducir a fallas reproductivas en el hombre que abarcan una amplia gama que va desde la incapacidad para fecundar, hasta malformaciones que pueda presentar el recién nacido atribuibles a factores paternos; por esto no es ilógico suponer que un daño en el gameto masculino pueda tener un papel significativo en las pérdidas tempranas.
- **MERCAN *et al.* (2009)** Exhortaron en un estudio denominado “The outcome of clinical pregnancies following intracytoplasmic sperm injection is not affected by semen

quality”, con el objetivo de investigar el impacto de la oligoastenoterozoospermia grave (OAT) en el resultado del embarazo en 279 ciclos consecutivos de inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) en el cual se observaron diferencias con respecto a las tasas de implantación, embarazo clínico, parto y aborto espontáneo entre los tres grupos, pero la tasa de fertilización fue significativamente más baja en el grupo en el que se incluyó pacientes con ICSI con oligoastenoterozoospermia grave, frente a grupos en los que se trabajó con pacientes que se sometieron a ICSI por otras causas no masculinas y pacientes de Fertilización *In vitro* (FIV), concluyendo que, las parejas que se someten a ICSI con infertilidad masculina severa (oligoastenoterozoospermia) tienen una tasa de fertilización ligeramente reducida, pero sus posibilidades de parto y pérdida del embarazo son similares a las de otros pacientes que se someten a ICSI clínico y FIV con infertilidad no masculina.

- **COOPER et al. (2010).** En una investigación denominada como “World Health Organization reference values of human semen characteristics”, sugieren que las causas más frecuentes relacionadas con los problemas masculinos, son los defectos en la función espermática. La calidad del semen se toma como una buena medición en fecundidad masculina, toxicología reproductiva, epidemiología y riesgo de embarazo.
- **WHO, (2010).** Propone en su “laboratory manual for the Examination and processing of human semen” que, en cuanto a la motilidad de los espermatozoides dentro del semen debe evaluarse lo antes posible después de la licuefacción de la muestra, preferiblemente a los 30 minutos, pero en cualquier caso dentro de 1 hora después de la eyaculación, para limitar los efectos perjudiciales de la deshidratación, el pH o los cambios en temperatura sobre motilidad, para la cual sugiere como límite de referencia inferior para la motilidad progresiva (RP) es del 32%. En cuanto al número de espermatozoides en el eyaculado se calcula a partir de la concentración de espermatozoides, que se mide durante la evaluación del semen, para el cual el límite de referencia inferior para la concentración de espermatozoides es de 15×10^6 espermatozoides por ml. En el caso de la morfología espermática el límite de referencia más bajo para las formas normales es del 4%.

- **MARTINEZ et al. (2012).** Indicaron que si bien no es posible afirmar que los espermatozoides con una forma ligeramente anormal carezcan de capacidad fecundante, si se ha registrado en diversos estudios una disminución de las tasas de gestación en función de los porcentajes de espermatozoides anormales. También observaron que distintos tipos de factores físicos y químicos ambientales pueden afectar a la funcionalidad espermática y, por ende, a las características morfológicas; por ello, el análisis de la morfología podría ser un indicador del estilo de vida, riesgos ocupacionales o factores medioambientales. Sin embargo también comentaron que un alto porcentaje de formas normales presentarían niveles de colesterol en su membrana, así como niveles de Ca^{2+} superiores a muestras con teratozoospermia intensa, lo cual influiría en el proceso de capacitación del espermatozoide. Estos importantes datos fueron estudiados en un fragmento del libro “Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. *Laboratorio de reproducción asistida*”, intitulado: “Morfología espermática”.
- **DI SANTO et al. (2011); BHAVNI et al. (2014)** Indicaron en sus estudios acerca de los espermatozoides intitulados “Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART” y “Study of human sperm motility post criopreservation” respectivamente que, la disminución de la motilidad de los espermatozoides se ha atribuido al daño en la membrana mitocondrial (un deterioro de la actividad mitocondrial puede explicar la reducción de la motilidad, pues el ATP generado por la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna se transfiere a los microtúbulos, para llevar a cabo el movimiento), entonces aunque la motilidad no está directamente relacionada con la capacidad de fecundación, es uno de los factores más importantes que afectan a la calidad del esperma.

1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES:

- **BURGA, (2016).** Realizo un estudio mediante espermatobioscopía denominado, “Evaluación de la calidad seminal en pacientes con problemas de fertilidad”, realizado a 292 pacientes varones que acudieron por primera vez al Laboratorio de Andrología

del Centro de Reproducción Humana de Lima, NACER de Mayo del 2015 a Mayo del 2016, en el comprobó que, la morfología y motilidad son predictores importantes de la fertilidad, mostrando que una concentración normal no justifica la capacidad fecundante cuando hay alteraciones en estos dos parámetros mencionados, ya que encontró que en el grupo de 27 a 36 años tiene una concentración mayor a 15 millones pero presenta una prevalencia alta de teratozoospermia, del mismo modo ocurrió en los pacientes mayores de 47 años, donde se pudo evidenciar una relación entre las alteraciones de motilidad y morfología, encontrándose estas anormalidades en el mismo paciente.

1.1.3 ANTECEDENTES LOCALES

- **BERNAL, (2015).** En un estudio de seminario de investigación de la UNSAAC denominado “Evaluación de alteraciones por espermatobioscopia y factores macroscópicos de semen humano de pacientes que acuden al Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur”, se observó que en 30 pacientes varones la alteración con más prevalencia fue la morfología espermática, ya que el 60% de las muestras no superaron el 4 % de espermatozoides normales morfológicamente, que es el límite inferior indicado por la OMS.

1.2 GENERALIDADES

1.2.1 GAMETO MASCULINO - ESPERMATOZOIDE

Cada espermatozoide consiste en un núcleo haploide, un sistema de propulsión para trasladar el núcleo, y un saco de enzimas que le permitirían al núcleo penetrar al gameto femenino. La mayor parte del citoplasma del espermatozoide es eliminada durante la maduración (Fig. 1), dejando solo ciertas organelas que son modificadas para la función del espermatozoide. Durante el curso de la maduración del espermatozoide, el núcleo haploide se vuelve muy acrodinámico, y su ADN ha resultado fuertemente comprimido. Por delante de este núcleo haploide comprimido se localiza la vesícula acrosómica, o

acrosoma, que es derivada del aparato de Golgi y que contiene enzimas que digieren proteínas y glúcidos complejos. Por lo tanto, ésta puede ser considerada una vesícula secretora modificada. Las enzimas almacenadas en el acrosoma son utilizadas para degradar y travesar la cubierta externa del gameto femenino (Gilbert, 2005).

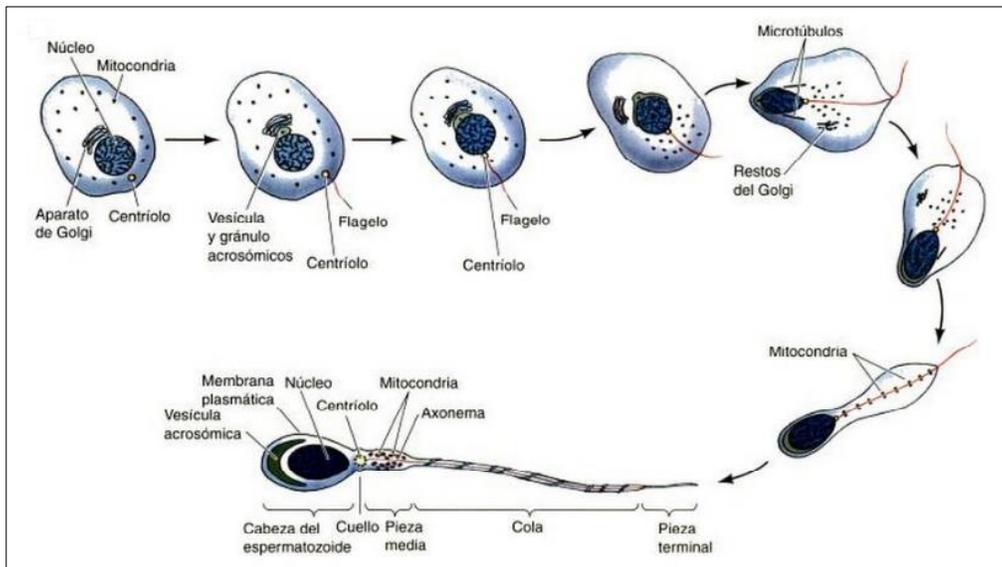


FIGURA 1: Secuencia de estadios de la maduración del espermatozoide (Gilbert, 2005).

El acrosoma y el núcleo constituyen en conjunto la cabeza del espermatozoide. Los medios por los cuales el espermatozoide es impulsado varían de acuerdo a cómo la especie se ha adaptado a las condiciones ambientales, en la mayoría de las especies el flagelo ayuda al espermatozoide a viajar por largas distancias. Los flagelos son estructuras complejas. La principal porción motora del flagelo es denominada axonema. Este está formado por microtúbulos que emanan a partir del centriolo localizado en la base del núcleo del espermatozoide. El centro del axonema consiste en dos microtúbulos centrales rodeados por una hilera de nueve dobletes de microtúbulos. La base de la estructura del flagelo es la tubulina, aunque existen otras proteínas como la dineína que proporciona la fuerza para el impulso del espermatozoide (Gilbert, 2005).

El ATP necesario para agitar el flagelo e impulsar el espermatozoide viene de los anillos de mitocondrias localizados en la pieza media del espermatozoide. Los espermatozoides liberados durante la eyaculación son capaces de moverse, pero todavía cuentan con la capacidad para unirse y fecundar al gameto femenino. Estos estadios finales de la

maduración del espermatozoide (denominado capacitación) no se producen hasta que los espermatozoides se encuentran dentro del tracto reproductor femenino por un cierto periodo (Gilbert, 2005).

1.2.2 MORFOLOGÍA DEL GAMETO MASCULINO

Junto con la concentración y la motilidad espermática, la morfología sigue representando el primer eslabón del análisis básico del semen. Desde 1980, en que se editó el primer WHO *laboratory manual for the examination and processing of human semen*, hasta la reciente edición de 2010 (WHO, 2010), la evaluación de la morfología espermática ha sido una constante en todos los manuales. En un eyaculado es muy frecuente encontrar una población muy heterogénea en cuanto a su morfología. Llama la atención de hecho que los espermatozoides, tanto en hombres fértiles como infértiles, posean una gran cantidad de formas inmaduras o bien presenta una forma que dista mucho de ser la ideal (Remohi *et al.* 2013).

1.2.2.1 CARACTERÍSTICAS DE UN ESPERMATOZOIDE NORMAL

En el espermatozoide es posible distinguir varias regiones y sus estructuras correspondientes (Fig. 2).

Según la actual edición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las características que debe de cumplir un espermatozoide para considerarse normal son las que se describen a continuación:

- **Cabeza:** Debe de ser lisa, sin irregularidades y oval. Ha de disponer de una región acrosomal bien definida que ocupe entre el 40 y el 70% del área de la cabeza. La región acrosomal no debe presentar vacuolas que ocupen más del 20% de la cabeza. No deberían existir vacuolas en la región post acrosomal (Martinez *et al.*, 2013).
- **Pieza intermedia:** La pieza intermedia debe de ser delgada, regular y de la misma longitud de la cabeza. El eje mayor de la pieza intermedia debe estar alineado con el

de la cabeza. La gota citoplasmática se considera anormal, cuando excede un tercio del tamaño de la cabeza acrosomal (Martínez *et al.*, 2013).

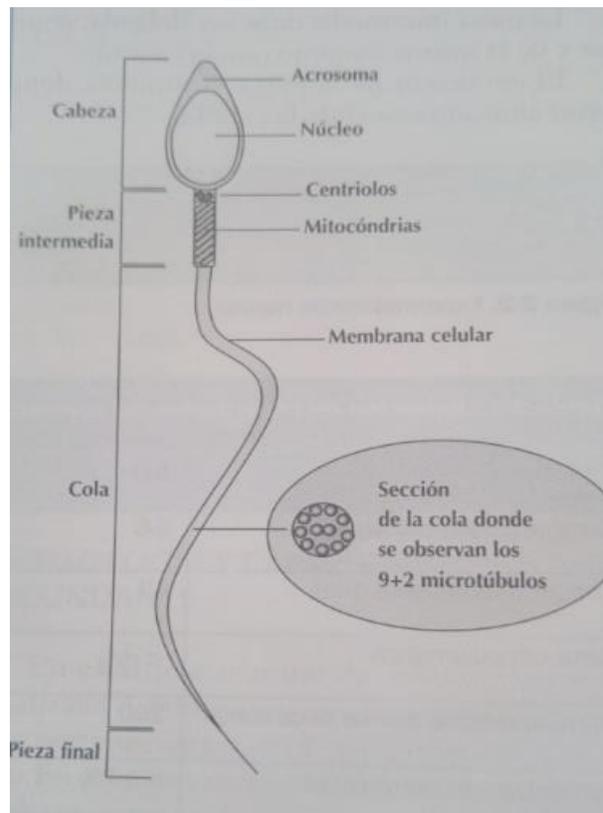


FIGURA 2: Descripción del espermatozoide (Martínez *et al.* 2013).

- **Cola:** Debe ser única, recta, con un calibre uniforme en toda su longitud, algo más fina que la pieza intermedia y de aproximadamente 45 μm de longitud acrosomal (Martínez *et al.*, 2013).

Estos criterios de clasificación requieren que todas las formas dudosas sean consideradas anormales. En el último manual de la OMS, se han analizado 4,500 muestras de semen de varones pertenecientes a 14 países y 4 continentes. En aquellos varones que consiguieron un embarazo antes de 12 meses de relaciones sin protección, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal se situaba en torno al 4%. La relación entre morfología espermática y fertilidad ha sido muy controvertida, sin embargo existen investigaciones que indican que, con un porcentaje de espermatozoides con características morfológicas normales inferior al 4%, disminuye considerablemente el éxito de tratamiento de fertilidad, de hecho según varios autores, con valores inferiores

al ya mencionado, estaría indicada la realización de una microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (Remohi *et al.* 2013).

1.2.3 FACTORES IMPLICADOS EN LA DISMINUCIÓN DE LA FERTILIDAD MASCULINA ASOCIADA A TERATOZOOSPERMIA

Las posibles causas que afectan en la disminución de la fertilidad masculina son:

- Alteraciones moleculares que impiden o dificultan el desplazamiento del espermatozoide, el reconocimiento entre gametos, la fecundación y el posterior desarrollo embrionario (Martinez *et al.*, 2013).
- Relación entre anomalías morfológicas y reacción acrosómica (Martinez *et al.*, 2013).
- Altos contenidos de especies reactivas del oxígeno en muestras teratozoospermicas (Martinez *et al.*, 2013).
- Muestras con un alto porcentaje de formas normales presentarían niveles de colesterol en su membrana, así como niveles de calcio superiores a muestras con teratozoospermia intensa, lo cual influiría en el proceso de capacitación del espermatozoide (Martinez *et al.*, 2013).
- También se han asociado ciertos grados de teratozoospermia tanto al aumento en la fragmentación del ADN, como un incremento en el porcentaje de anomalías cromosómicas (Martinez *et al.*, 2013).

1.2.4 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA NATURAL

El espermatozoide, en la cola del epidídimo y en el vaso deferente, sufre cambios en los dominios de los esteroides de membrana, en la cabeza y en la cola, confiriendo una distribución heterogénea de los mismos a lo largo de toda la membrana. Estos dominios llamados complejos de esterol-caveolina, sirven como andamio en la membrana para acoplar proteínas que inducirán diferentes rutas de señalización. En la cabeza hay dos subdominios de membrana plasmática, la acrosomal y la subacrosomal. La primera cubre la región del mismo nombre y se caracteriza por presentar islas de composición ordenada de colesterol y esfingolípidos anclados a caveolinas, inmersas en una membrana de composición “desordenada”. La segunda, o región subacrosomal, es rica

en fosfolípidos. Las islas juegan un papel importante en la compartimentalización de las vías de señalización en regiones específicas de la célula; son diseños prefabricados durante la espermatocitogénesis ya que, el espermatozoide, una vez en el lumen testicular, no puede transcribir ni traducir. La capacitación, se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol. (Olivera *et al.*, 2006)

Los diferentes procesos que experimentara el espermatozoide desde el momento de la eyaculación se denominan capacitación espermática y en ellos se consideran todos los cambios que ocurren antes de (y que preparan al espermatozoide para) la reacción acrosómica (RA) (Vigil *et al.*, 2015).

1.2.5 VALORACIÓN DEL SEMEN

La espermatobioscopia es la primera aproximación diagnóstica en el varón de una pareja estéril. Si existe una muestra de semen normal no es necesario repetir el análisis, mientras que si existe una muestra de semen anormal o *borderline* es conveniente la repetición para afirmar que si existe un factor masculino (Martinez & Gil, 2012).

1.2.5.1 CONDICIONES DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA

- **Método de obtención de la muestra**

El método de recogida de la muestra debe de ser por masturbación, vertiéndola directamente en un recipiente adecuado de polipropileno de boca ancha y con tapa para poder cerrarlo durante el transporte. Siempre manteniendo las normas de bioseguridad presentes para evitar una contaminación en el momento de la emisión. En la cual se incluye el aseo personal de manera general, el lavado de manos antes y después de la obtención de la muestra, asegurarse que la muestra fue completamente depositada en el recipiente y que no hubo pérdida de la muestra, y sobre todo rotular la etiqueta del frasco de manera correcta para evitar confusiones (Martinez & Gil, 2012).

- **Periodo de abstinencia previo**

Debe ser de 3 a 5 días y nunca menor de 2 días ni mayor de 7. El periodo de abstinencia tanto los días y las horas reflejaría con más exactitud la capacidad de los testículos para producir espermatozoides (Martinez & Gil, 2012).

- **Lugar de acopio**

Preferentemente debe de ser en el mismo Centro, en una habitación tranquila y adecuadamente acondicionada. En cualquier caso, el tiempo en llegar al laboratorio desde su obtención será inferior a 30 minutos. La muestra de semen debe ser examinada a la hora de su recogida, ya que alguno de los parámetros, especialmente la motilidad, se puede ver afectada por un retraso en la evaluación. El semen debe ser colocado en una incubadora a 37 °C durante 30 minutos hasta que se produzca la licuefacción (Martinez & Gil, 2012).

1.2.6 INTERPRETACIÓN DEL EXAMEN ESPERMATOBIOSCOPICO

1.2.6.1 EXAMEN MACROSCÓPICO:

- **Coagulación**

El semen se emite en estado líquido pero rápidamente se convierte en un estado semisólido. La coagulación se produce por efecto de la seminogelina, producida en las vesículas seminales, por lo que su ausencia produce falta de coagulación del semen, lo cual se asocia con la ausencia de fructosa en el plasma seminal (Martinez & Gil, 2012).

- **Licuefacción**

La licuefacción ocurre en 10-20 minutos, lo que ocurre por acción de la serín-proteasa denominada antígeno prostático específico (PSA) en cuya activación junto con otros factores influyen en la licuefacción del coágulo. La adecuada licuefacción es indicativa de un normal funcionamiento prostático. Si no ocurre en este periodo, puede ser sugestivo de prostatitis. La falta de licuefacción puede ser causa de infertilidad al no liberarse los espermatozoides del coagulo (Martinez & Gil, 2012).

- **Viscosidad:**

El semen es ligeramente más viscoso que el agua. El incremento de la viscosidad puede ser indicativo de un funcionamiento anormal de la próstata secundario a una infección del tracto genital (Martinez & Gil, 2012).

- **Color:**

El color del semen normal es grisáceo y opaco, y cambia a amarillento con el incremento de los días de abstinencia. La presencia de sangre reciente le da un color rojo, mientras que sangre antigua le dará un color marrón (Martinez & Gil, 2012).

- **Volumen:**

El volumen normal del eyaculado tras 3-5 días de abstinencia sexual es de 1,5 a 6 ml. El líquido seminal es producido fundamentalmente por las vesículas seminales y la próstata con una pequeña cantidad procedente de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo. Volúmenes bajos pueden ser secundarios a: recogida de muestra incompleta de la muestra, hipogonadismo, obstrucción secundaria a infección, ausencia congénita de vesículas seminales y deferentes (asociado a la ausencia de fructosa) y disfunción de vesículas seminales. Volúmenes bajos también pueden ser secundarios a eyaculación retrograda, especialmente en pacientes con patología neurológica que puede afectar al normal funcionamiento del cuello vesical o con cirugía previa al cuello vesical o de la próstata (Martinez & Gil, 2012).

- **pH**

El pH del eyaculado es el resultado del equilibrio de las secreciones de las glándulas accesorias, especialmente la secreción alcalina de las vesículas seminales y la secreción ácida de la próstata. Oscila normalmente entre 7,2 a 8. En caso de prostatitis aguda, vesiculitis o epididimitis bilateral, suele ser mayor de 8,0. En caso de infecciones crónicas el pH tiende a ser más ácido. En caso de conductores eyaculatorios o agenesia de deferentes es inferior a 7,0 y se asocia a bajos volúmenes del eyaculado (Martinez & Gil, 2012).

1.2.6.2 ANÁLISIS MICROSCÓPICO:

- **Recuento espermático:**

Para realizar el recuento espermático es recomendable utilizar una cámara como la de Neubauer que se definió como el patrón para el recuento espermático, al igual que la cámara Makler. En ausencia de obstrucción de la vía seminal, se ha relacionado el número de espermatozoides en el eyaculado con el volumen testicular, aunque esta correlación es relativamente baja, mientras que la concentración no estaría influida por el volumen seminal, con lo que no sería específica de la función testicular. Sin embargo, sí que se ha relacionado la concentración con la capacidad de fertilización y con la tasa de embarazos. En el nuevo manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010), el límite inferior de referencia para la concentración espermática es de 15 millones de espermatozoides/ml. Se denomina OLIGOZOOSPERMIA a una concentración de espermatozoides inferior a 15 millones de espermatozoides/ml. Cuando no se encuentran espermatozoides se procede a centrifugar la muestra y analizar el pellet, si en este nuevo análisis se encontrarían espermatozoides se denominaría como CRIPTOZOOSPERMIA, sin en cambio no se llegaría a encontrar ningún espermatozoide entonces se dirá que estamos frente a una muestra AZOOSPERMICA (Martinez & Gil, 2012).

- **Motilidad:**

La motilidad y morfología son especialmente importantes cuando el recuento espermático es bajo. La proporción de motilidad espermática progresiva se relaciona con las tasas de embarazo (Martinez & Gil, 2012).

Los espermatozoides se clasifican en 4 grupos entonces según su motilidad.

- **G3:** Progresivos motiles rápidos: Espermatozoides que se mueven activamente de forma lineal (WHO, 2010).
- **G2:** Progresivos motiles lentos: Espermatozoides con progresión lenta y en círculos (WHO, 2010).

- **G1:** Motilidad no progresiva: Cualquier otro patrón de motilidad en ausencia de progresión (WHO, 2010).
- **G0:** Inmóviles: Ningún movimiento (WHO, 2010).

A partir de esta clasificación se define como ASTENOZOOSPERMIA cuando existen igual o menos de 32% de espermatozoides con motilidad progresiva o menos del 40% con cualquier tipo de motilidad (progresiva o no). La presencia de espermatozoides rápidamente progresivos puede influir en la capacidad de fertilización de los mismos (Martinez & Gil, 2012).

- **Morfología espermática:**

Existe una gran variabilidad en la morfología espermática (Fig. 3), lo que dificulta el establecer cuál es la apariencia normal de los espermatozoides con capacidad fertilizante.

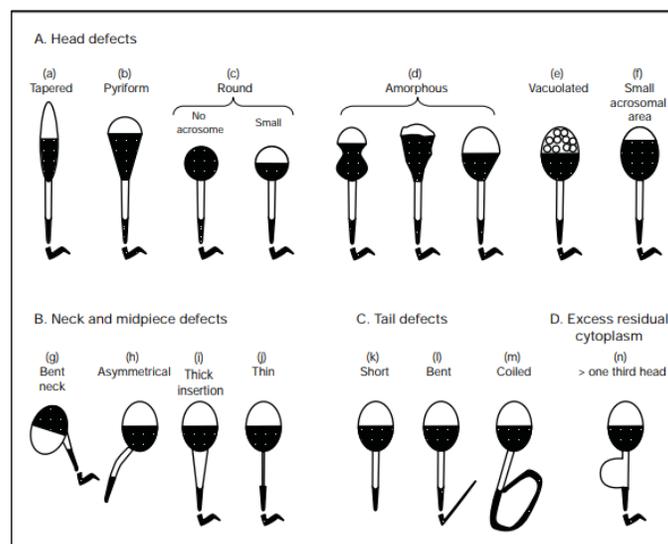


FIGURA 3: Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides humanos (WHO, 2010).

Los criterios establecidos para definir un espermatozoide como normal se basa en los denominados criterios de Kruger. Cualquier forma borderline debe ser considerado como anormal. Sin embargo el amplio espectro de formas del espermatozoide convierte en difícil establecer una línea clara entre espermatozoides borderline y normal. Así, uno de

los problemas a la hora de evaluar la morfología es la de reproductibilidad de los resultados, con una gran variabilidad interobservador. La alteración de la morfología se denomina teratozoospermia (Martinez & Gil, 2012).

En el nuevo manual de la OMS, el valor inferior de referencia es de 4%, lo que hace pensar que la morfología espermática cada vez más se convierte en un valor inferior, anteriormente se consideraba como límite inferior a un valor de 15%, pero ahora se considera mayor a 4% como espermatozoides morfológicamente normales. Lo más frecuente es la combinación de anomalías en el recuento, la morfología y la motilidad, lo que se denomina oligoastenoteratozoospermia (Martinez & Gil, 2012).

- **Vitalidad**

La vitalidad se puede determinar de forma rutinaria pero es recomendable cuando la motilidad es baja. Puede determinarse mediante la tinción con eosina. Permite diferenciar la necrozoospermia (alteración de la vitalidad espermática) de la alteración en la motilidad por alteraciones estructurales en el flagelo, como en el síndrome de Kartagener. El porcentaje de espermatozoides no viables no debe de exceder al de inmóviles. El límite inferior de espermatozoide viables es del 58%. La necrozoospermia puede ser indicativa de patología epididimaria (Martinez & Gil, 2012).

1.3 GAMETO FEMENINO:

Los ovarios son unas estructuras pares, de aproximadamente 3 cm a 4 cm, localizados a ambos extremos del útero, cuyo hilio se une por el mesovario al ligamento ancho, y se acerca al extremo de las fimbrias de la trompa de Falopio. Tiene una zona periférica que rodea la médula, la corteza y en cuyo tejido conjuntivo se incluyen los folículos, que contiene, a su vez, a los ovocitos. La unidad anatómica funcional del ovario está representada por el folículo que está formado principalmente por el ovocito. El ovario constituye, además, la glándula sexual más importante de la mujer. En él se sintetiza el estradiol indispensables para el desarrollo sexual femenino y el mantenimiento del embarazo, funciones fundamentales para la preservación de la especie (Urbina & Lerner, 2008).

1.3.1 DESARROLLO DEL OVOCITO:

De los casi dos millones de ovocitos primarios presentes en los ovarios en el momento del nacimiento, sólo sobreviven hasta la pubertad alrededor de 400.000, todos ellos en la primera fase meiótica. Aproximadamente 400 se ovulan en realidad, uno en cada ciclo menstrual, el resto de los ovocitos primarios degeneran sin salir del ovario, pero gran cantidad de ellos se desarrollan y después se vuelven atrésicos. Al nacimiento, los ovocitos primarios están investidos con una o dos capas de células foliculares, este complejo recibe el nombre de folículo primario (Linares, 2016).

Las células foliculares y el ovocito, secretan conjuntamente una capa de material celular compuesto por glicoproteínas dispuestas sobre la superficie del ovocito que se denomina zona pelucida. Las conexiones de las microvellosidades entre el ovocito y las células foliculares se mantienen a través de esta zona pelucida. Estas uniones permiten el intercambio de aminoácidos y metabolitos de la glucosa, indispensables para el crecimiento del ovocito (Linares, 2016).

La zona pelucida contiene receptores de espermatozoides y otros componentes importantes para la fecundación. El aumento del tamaño del ovocito y del número de células foliculares son los responsables que durante los años previos a la pubertad muchos de los folículos primarios se agrandan, llamándose folículos en crecimiento. A partir de este momento del desarrollo, algunos de los folículos en crecimiento inician un proceso de degeneración y otros aumentan su tamaño como consecuencia de los niveles en crecimiento de FSH, desarrollando estos una cavidad central llena de líquido, denominado antro y llamándose a éstos folículos a partir de este momento, antrales o vesiculares. Uno de los folículos en desarrollo continua creciendo debido a la absorción de líquido, mientras que el resto de los folículos degenera dando lugar a la atresia de los mismos (Linares, 2016).

El ovocito rodeado de células foliculares denominadas cúmulo u ooforo, se proyecta hacia el antro en expansión, aunque permanece conectado a la capa de células

foliculares que recubre a la cavidad antral. Esta capa se denomina membrana granulosa, y el folículo se denomina folículo maduro o secundario o folículo de De Graaf maduro. Aun el ovocito no ha reanudado la meiosis. Alrededor del día 13 o 14 del ciclo menstrual se produce una brusca e intensa elevación de los niveles de FSH y LH. Este pico ovulatorio de las gonadotropinas hipofisarias, estimula al ovocito primario del folículo De Graaf para que reanude la meiosis, por lo que la membrana de la vesícula germinal del ovocito se rompe. Después de aproximadamente 20 horas, los cromosomas se encuentran en metafase, e inmediatamente después se produce la división celular para formar el ovocito secundario y el primer corpúsculo polar (Linares, 2016).

El ovocito secundario inicia rápidamente la segunda división meiótica, que queda detenida en la segunda metafase meiótica. El proceso de ovulación, es decir la expulsión del ovocito secundario del folículo, es comparable a una respuesta inflamatoria, ya que se inicia con la secreción de histamina y prostaglandinas. En las horas siguientes del pico ovulatorio de FSH y LH se incrementa la vascularización del folículo el cual sufre un edema y adquiere un color rosado. El folículo se desplaza a la superficie del ovario en donde hace prominencia iniciándose en los momentos previos a la ovulación un adelgazamiento de la pared del folículo que se encuentra proyectada en la superficie del ovario, en este momento se denomina folículo terciario, dando lugar a una proyección en forma de pezón llamada estigma. El ovocito secundario está situado en un pequeño montículo de células conocido como cumulus oophorus que se sitúa en un lado del antro muy desarrollado, las células del cumulus secretan una abundante matriz extracelular formada fundamentalmente por ácido hialurónico, que hace que la masa de células del cumulus incremente varias veces su tamaño original, este proceso denominado de expansión del cúmulo podrían intervenir en el progreso de la meiosis y de la ovulación (Linares, 2016).

La rotura del folículo se produce por dos mecanismos que coinciden en el tiempo, uno por el aumento de tensión producido por las células musculares lisas sobre la pared del folículo y otro por la liberación de enzimas que degradan al colágeno, lo que provocaría la rotura folicular. No se trata de una rotura explosiva sino de un desplazamiento lento a través de la superficie del ovario (Linares, 2016).

La ovulación tiene lugar unas 38 horas después del pico ovulatorio de gonadotropinas hipofisarias las fimbrias de las trompas uterinas arrastran a la masa adherente formada por el ovocito y el cumulus hacia la ampolla de la trompa, gracias al movimiento sincrónico de los cilios de la pared tubárica. El ovocito permanece viable en el interior de la ampolla durante un periodo de 24 horas antes de perder su capacidad para ser fecundado. Tras la ovulación, las células de la membrana granulosa de la pared rota del folículo comienzan a proliferar y originan las células luteínicas y el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo es una estructura endocrina encargada de secretar hormonas esteroideas responsables del mantenimiento del endometrio en estado de recibir al embrión, si no se produce la implantación del embrión en el útero, el cuerpo lúteo degenera al cabo de unos 14 días convirtiéndose en una estructura cicatricial denominada cuerpo albicans. A partir del quinto día del ciclo menstrual, las células foliculares y la teca de los folículos activos secretan estrógenos, que serán los responsables de estimular la proliferación y remodelación del revestimiento endometrial del útero. Esta fase proliferativa se inicia hacia el quinto día y termina hacia el día decimocuarto del ciclo. Una vez que se ha producido la ovulación, las células de la teca de la pared del cuerpo lúteo continúan secretando estrógenos y las células luteicas, diferenciadas a partir de células foliculares, secretan grandes cantidades de hormonas esteroideas, la progesterona. La progesterona luteínica estimula el endometrio para aumentar aún más su espesor, forma estructuras glandulares e incrementa su vascularización. Esta fase secretora de la diferenciación endometrial dura 13 días, salvo cuando el embrión se implanta en el endometrio. Cerca del final del ciclo menstrual el cuerpo lúteo se contrae y la secreción de progesterona disminuye (Linares, 2016).

El endometrio desarrollado, que depende de la progesterona, degenera y comienza a descamarse, iniciándose la fase menstrual de cuatro a cinco días de duración, en la que el endometrio se descama junto con el oocito no fecundado y unos 40ml. de sangre, indica el comienzo de un nuevo ciclo (Linares, 2016).

1.4 FUNCIÓN DEL MOCO CERVICAL EN EL PASO DE LOS ESPERMATOZOIDES A TRAVÉS DEL CUELLO UTERINO.

La primera barrera que atraviesan los espermatozoides en su recorrido por el tracto genital femenino es la del moco (o secreción) cervical. Esta sustancia, fundamental para el proceso reproductivo, corresponde a un hidrogel altamente hidratado que además contiene mucinas (glicoproteínas viscoelásticas) y algunos compuestos minoritarios como hormonas (Cortes *et al.* 2014). Se ha descrito, la existencia de dos formas de transporte a través del moco cervical: una rápida, en la cual los espermatozoides, tan pronto como a los 5 a 10 minutos después de ser depositados en el tercio superior de la vagina, ya se encontrarían en las tubas uterinas y una forma lenta, en la cual los espermatozoides serían almacenados en las criptas cervicales. El período de almacenamiento en estas criptas es variable, pudiendo transcurrir desde horas hasta incluso 5 a 7 días cuando hay presencia de moco estrógeno. El paso o permanencia del espermatozoide en el cuello del útero reviste una gran importancia en el humano, ya que el moco ejerce una serie de funciones biológicas sobre el gameto masculino, tales como: 1) la selección de espermatozoides morfológicamente anormales; 2) la conservación del acrosoma para mantener su capacidad de fecundar; 3) la acción antimicrobiana de algunos metabolitos presentes en el moco cervical; y 4) brindar un medio nutritivo adecuado. La presencia de este hidrogel podría deberse, a la necesidad evolutiva de contar con una barrera selectiva que actué como filtro para los espermatozoides anormales (Vigil *et al.* 2015).

1.5 EL ENDOMETRIO EN EL RECORRIDO ESPERMÁTICO

Después de su paso por el canal cervical, el espermatozoide se ubicará en la cavidad uterina y tomará contacto con las células endometriales y sus secreciones, en donde podría estar por un tiempo de 2 a 2,5 días. Durante este proceso, aumenta la fluidez de membrana y ocurren fosforilaciones de diversas proteínas en sus residuos de tirosina. Las células endometriales secretan una variedad de citoquinas, de las cuales la más estudiada es interleuquina-6 (IL-6) que tiene la capacidad de inducir la reacción

acrosómica (RA). Sin embargo, en altas concentraciones tendría un efecto deletéreo sobre el espermatozoide, disminuyendo su motilidad y viabilidad. Durante la fase proliferativa del ciclo menstrual, las células endometriales epiteliales facilitarían la capacitación espermática a través de la secreción de IL-6. Luego, durante la fase lútea, se produciría un aumento en la producción de IL-6 endometrial, lo cual podría afectar negativamente la capacidad fecundante del espermatozoide (Vigil *et al.*, 2015).

En el endometrio, también se ha encontrado la presencia de dos proteínas chaperonas: Hsp60 (Heat Shock Protein 60) y GRP78 (glucose-regulated protein 78 kDa), las cuales también estarían participando en el proceso de capacitación espermática aumentando el calcio inducido por progesterona que estarían sensibilizando al gameto masculino para experimentar la reacción acrosómica en el momento en que se encuentre en el tercio distal del oviducto, donde se sabe que las concentraciones de progesterona son mayores al momento de la ovulación. El Hsp60 previene parcialmente la fosforilación en tirosina de proteínas, durante el proceso de capacitación espermática, lo cual haría suponer una modulación altamente selectiva de los procesos moleculares que estarían ocurriendo en el espermatozoide (Vigil, *et al.* 2015).

1.6 RECORRIDO DEL ESPERMATOZOIDE A TRAVÉS DEL OVIDUCTO E INTERACCIÓN CON SUS CÉLULAS

En humanos, después del paso por la cavidad endometrial, unos pocos miles de espermatozoides ascenderán hacia el oviducto en su viaje hacia el encuentro con el ovocito. Es en este sitio donde el espermatozoide concluye su capacitación, y se gatilla la RA. Se ha demostrado que durante el paso del espermatozoide a través del oviducto, este no nada libremente por el lumen, sino que establece una interacción con la secreción mucosa del oviducto (Vigil *et al.* 1994) además de tener una estrecha relación física con las células ciliadas del epitelio oviductal (Vigil *et al.* 2012). Se ha propuesto que las células epiteliales oviductales participarían en una selección espermática, asegurando la disponibilidad de gametos viables, posiblemente por una unión dependiente de la integridad de su membrana. También existe la posibilidad de que actúen liberando

paulatinamente una población seleccionada, hiperactivada, con una alta capacidad fecundante (Pollard *et al.* 1991).

Durante el proceso de capacitación, el espermatozoide se hiperactiva. Los espermatozoides hiperactivados muestran un aumento del barrido flagelar. El aumento en la fuerza del barrido flagelar, puede proveer la fuerza necesaria para superar la atracción entre el espermatozoide y el epitelio oviductal (Suarez, 2008).

De este modo, el oviducto estaría cumpliendo tres importantes funciones en el recorrido del espermatozoide: 1) ser un reservorio espermático; 2) actuar como agente selector y 3) inducir la RA en el momento adecuado (Vigil *et al.*, 2015).

1.7 INYECCIÓN INTRACITOPASMÁTICA (ICSI)

El fundamento de algunos procesos que conllevan al procedimiento en general de la microinyección intracitoplasmática son los siguientes:

1.7.1 PUNCIÓN FOLICULAR: RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

Los resultados de un procedimiento de reproducción asistida son producto de una serie de actuaciones que el equipo ha de llevar a cabo de manera coordinada y rápida. Con la recuperación de los ovocitos del líquido folicular, se inicia una compleja serie de acontecimientos, cuyo fin es conseguir la gestación y el nacimiento de un niño sano. El objetivo de este procedimiento es la recuperar los ovocitos contenidos en los líquidos foliculares mediante punción ecoguiada de los folículos ováricos. El médico tratante es el encargado de realizar esta tarea (Remohi *et al.* 2013).

1.7.2 CLASIFICACIÓN DEL COMPLEJO CORONA-CÚMULO-OVOCITO

La valoración de la calidad por el aspecto morfológico y grado de expansión de las células del cúmulo proporciona una idea aproximada del estado de maduración ovocitario. Este grado de expansión no siempre se correlaciona con el estado de maduración, lo que da

un carácter subjetivo a esta clasificación. Se puede hablar de maduración nuclear si el ovocito ha alcanzado la metafase de la segunda división meiótica y ha extruido el primer corpúsculo polar; es lo que se conoce como ovocito en metafase II (Fig.4) (Pehlivan, 2013).

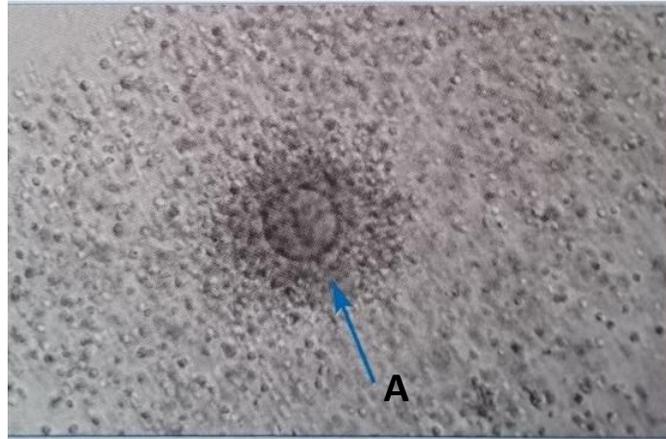


FIGURA 4: Ovocito en estadio MII, puede observarse la corona laxa (A), que permite visualizar el corpúsculo polar en la posición horario de los 5 h (200 X). (Pehlivan 2013).

La maduración citoplasmática se refiere a la adquisición por parte del ovocito de factores que van a permitir que la fecundación y el desarrollo embrionario se produzcan normalmente. Es necesario conocer la importancia de la maduración, alteración o asincronía en estos procesos puede resultar en alteraciones importantes; en función del momento en que tenga lugar esta alteración, tendrá diferentes resultados, tales como fallos de la fecundación, aneuploidias o alteraciones del desarrollo embrionario. La maduración ovocitaria tiene una relación intrínseca con las células del cúmulo, las cuales interfieren con la membrana ovocitaria a través de procesos citoplasmáticos y transportan nutrientes al ovocito a través de las uniones de tipo gap. El ovocito podría ejercer un efecto paracrino en la capacidad de las células del cúmulo para expandirse o mucificarse (Pehlivan, 2013). Las células del complejo corona-cúmulo-ovocito se podrían clasificar de la siguiente manera:

- **Grado I:** Presentan una corona laxa en general (Fig. 5), son ovocitos en estadio de metafase II (MII) (Pehlivan, 2013).

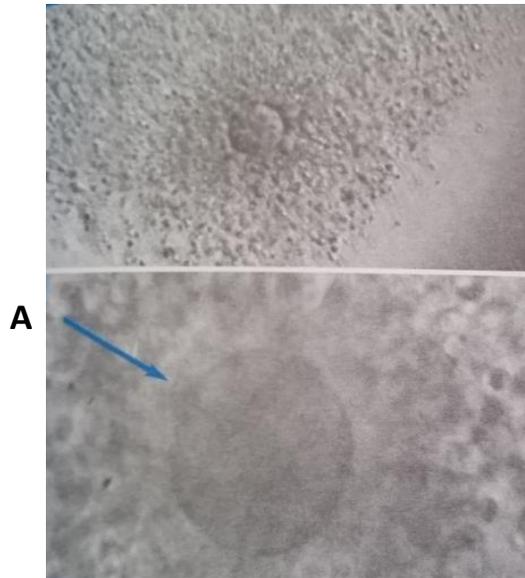


FIGURA 5: Ovocitos de Grado I, la flecha A señala una estructura que puede ser el primer corpúsculo polar (200 X) (Pehlivan 2013).

- **Grado II:** presentan un cúmulo en estado intermedio entre compacto y laxo, podría tratarse de ovocitos en metafase I (Fig. 6) o en metafase II (Pehlivan, 2013).

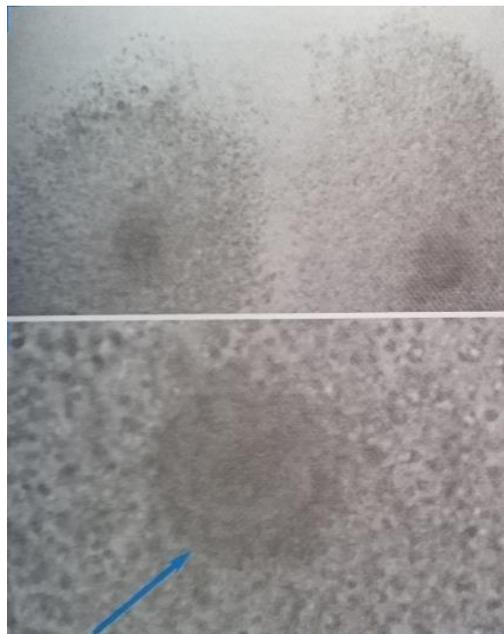


FIGURA 6: Ovocitos de Grado II, la flecha señala el primer corpúsculo polar (200 X) (Pehlivan 2013).

Grado III: corresponde a ovocitos con cúmulo compactado, la flecha muestra el cúmulo compactado, en general son ovocitos en estadio de vesícula germinal (Remohi *et al* 2013).

1.7.3 MORFOLOGÍA OVOCITARIA

Para la realización de ICSI es necesario decumular los ovocitos correctamente, de tal manera que se pueda visualizar su estado de madurez nuclear, lo que permite seleccionar los ovocitos maduros para el procedimiento. Pues bien, además de conocer la madurez nuclear, esta madurez permite evaluar la morfología ovocitaria y todas sus variables dismórficas y efectuar un seguimiento de su evolución en todo el ciclo, posibilitando un pronóstico aproximado del comportamiento de cada uno de estos dimorfismos frente a la microinyección, fecundación, evolución embrionaria y tasas de gestación y de implantación (Remohi *et al.*, 2013).

- **Características de un ovocito normal:**

Un ovocito normal es aquel que presenta una zona pelucida proporcionada, definida y regular (Fig. 7). El espacio perivitelino debe de ser prácticamente virtual, y no deben observarse zonas más amplias que aquella en la que se encuentra el corpúsculo polar.

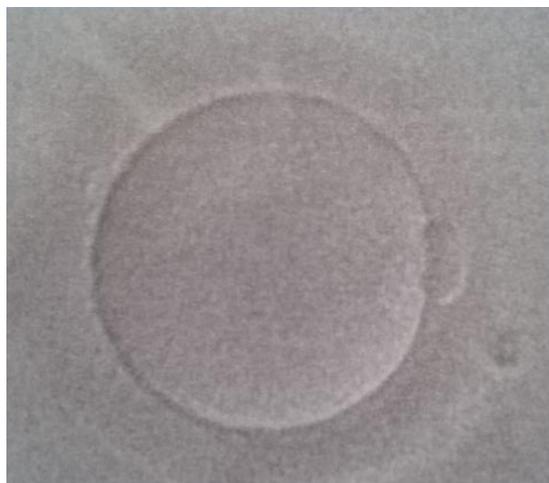


FIGURA 7: Ovocito normal (200 X) (Romero *et al.*, 2013).

La forma ha de ser perfectamente esférica y el citoplasma, homogéneo en densidad y sin ninguna estructura que llame la atención en su interior. El corpúsculo polar será ligeramente aplanado, bien definido, único y de contenido también definido. Son los ovocitos que se encuentran en un estado de maduración metafase II, son ovocitos de referencia y con los que se comparan los diferentes dimorfismos (Romero *et al.*, 2013).

Estos ovocitos presentan una buena tasa de fecundación. Son más frecuentes cuando las estimulaciones ováricas han sido regulares y con respuesta homogénea y sincrónica, aparecen sobre todo, en mujeres jóvenes. Su evolución embrionaria es buena, aunque no diferente a gran parte de los distintos dimorfismos. Su inyección es fácil y poco traumática (Romero *et al.*, 2013).

Evaluación de los diferentes dimorfismos ovocitarios:

- **Alteraciones del corpúsculo polar:**

La fecundación de estos ovocitos es sensiblemente inferior a la de los ovocitos normales. La tasa de degeneración (Fig. 8) es más alta en tendencia, aunque no significativamente de la zona pelucida (Fig.9), lo que obliga frecuentemente a variar la trayectoria de la pipeta de inyección después de traspasar la zona pelucida para incidir en un plano correcto al ovocito (Romero *et al.*, 2013).

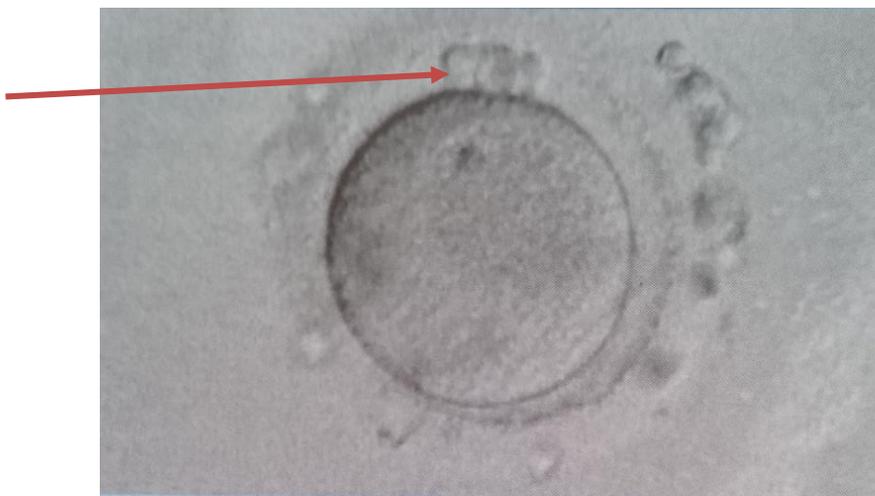


FIGURA 8: Alteración del corpúsculo polar, la flecha señala el corpúsculo polar alterado (200 X) (Romero *et al.*, 2013).

- **Alteraciones del espacio perivitelino:**



FIGURA 9: Alteración del espacio perivitelino, la flecha señala el espacio perivitelino amplio (200 X) (Romero *et al.* 2013).

- **Alteraciones de la forma ovocitaria:**

Estos ovocitos aparecen con más frecuencia cuando las dosis de la hormona foliculoestimulante (FSH) han sido altas. Muestran una tendencia a la compactación temprana (Romero *et al.*, 2013).

- **Alteraciones del citoplasma y los orgánulos:**

Estos ovocitos por lo general presentan escasa resistencia a la microinyección y mayor tasa de degeneración con una tasa de fecundación inferior a la de los ovocitos normales (Romero *et al.*, 2013).

- **Alteraciones múltiples:**

Presentan una tendencia a la tasa de fecundación inferior a la de los ovocitos normales. Aparecen con mayor frecuencia cuando se usa como estimulación ovárica FSH y gonadotropina menopáusica humana (Romero *et al.*, 2013).

- **Alteraciones de la zona pelúcida:**

Entre las cuales se encuentran la zona pelúcida densa (Fig. 10), dura, estrecha (Fig. 11), elongada, irregular, rugosa, tabicada. Que generalmente influyen en la dificultad de la

inyección, y también en cuanto al tiempo de exposición del ovocito que será inyectado al ambiente (Romero *et al.*, 2013).



FIGURA 10: Ovocito con zona pelucida gruesa, la flecha hace referencia a la alteración (200 X) (Romero *et al.*, 2013).



FIGURA 11: Ovocito con zona pelucida estrecha, la flecha señala la alteración (200 X) (Romero *et al.*, 2013).

1.8 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA *IN VITRO*

Este concepto se refiere a la mejora e incremento del potencial de fertilidad de los espermatozoides realizando una serie de procedimientos en el laboratorio. La capacitación espermática da lugar a una modificación en la motilidad flagelar y al bateo

de la cabeza del espermatozoide. Permiten obtener un mayor número de espermatozoides móviles y morfológicamente normales (Selles *et al.*, 2012), que luego serán seleccionados para la posterior inyección intracitoplasmática en el óvulo.

Antes de cualquier tratamiento de reproducción asistida, toda la muestra seminal debe de ser procesada mediante una técnica de capacitación espermática, que consiste en la selección aquellos espermatozoides con mejor motilidad a través de la eliminación del plasma seminal (que contiene prostaglandinas e inhibidores de la inmotilidad) y los espermatozoides inmóviles, junto con las células inmaduras y detritos (Remohi *et al.*, 2013)

Existen varias técnicas de capacitación espermática, la que se usa en el Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur es:

1.8.1 GRADIENTES DE DENSIDAD

El método de separación por gradientes puede ser una buena técnica de selección espermática, en la que se separan otros tipos celulares incluidos en el eyaculado. Consiste en la centrifugación de la muestra sobre silicatos que separan las células por densidad. Esta técnica genera la obtención de una fracción de espermatozoides móviles y libres de impurezas. Se ha demostrado que puede separar a los espermatozoides con integridad de la cromatina, con lo que ocurre una menor fragmentación de ADN y menor generación de radicales libres de oxígeno (Carballo *et al.*, 2011).

Los espermatozoides deben de vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad del 90 y el 45% y llegar hasta el fondo del tubo, además de actuar como filtro para el plasma seminal, células redondas, detritos y aquellos espermatozoides con motilidad no progresiva. Siendo esta técnica la mejor para recuperar espermatozoides de muestras oligozoospermicas y astenozoospermicas (Selles *et al.*, 2012).

1.8.2 INMOVILIZACIÓN Y ASPIRACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

La inmovilización del espermatozoide, previa rotura de su flagelo, es necesaria tanto para facilitar la manipulación del espermatozoide y para que no destruya las estructuras del

ovocito una vez que se encuentren dentro de este, como para facilitar la descondensación del núcleo. La manera de hacerlo depende del origen y la calidad de la muestra seminal (Zulategui *et al.*, 2013).

1.9 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA PROPIAMENTE DICHO

La primera inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con ovocitos humanos la realizó Lanzendorf en 1988, y aunque el grado de daño a los ovocitos fue alto, sus experimentos demostraron que el gameto femenino era capaz de sobrevivir la microinyección, y logro la fecundación con la formación de ambos pronúcleos (Urbina & Lerner, 2008).

En la ICSI el espermatozoide seleccionado se coloca en una micropipeta y se inyecta directamente en el ooplasma del ovocito, atravesando en un solo paso las envolturas del gameto femenino. El espermatozoide se introduce íntegro en el citoplasma. Con la inyección intracitoplasmática, se obvian los pasos fisiológicos necesarios para la interacción entre gametos, como reacción acrosómica, unión del espermatozoide a la zona pelúcida y penetración e interacción de membranas ovocitaria y espermática. Una vez que se fusionan las membranas de los gametos, se desencadena la activación ovocitaria y el incremento en los niveles de calcio intracelular, lo que ocasiona la exocitosis de los gránulos corticales, ubicados debajo de la membrana plasmática ovocitaria, que liberan su contenido enzimático al espacio perivitelino, por lo que se modifica la zona pelúcida para impedir la polispermia. Luego, se reinicia la segunda meiosis, con la extrusión del segundo cuerpo polar. A continuación, se ensambla el huso meiótico, se condensa la cromatina ovocitaria, se rompe la membrana nuclear y se forman las membranas de los pronúcleos. Así culmina el proceso de la fecundación y se inicia la transición del genoma materno hacia la activación del genoma embrionario (Urbina & Lerner, 2008) .

El éxito puede depender de muchos factores, pero uno de los más importantes es la calidad del espermatozoide seleccionado. La selección del espermatozoide se hace a criterio del embriólogo en el microscopio a 400 aumentos, teniendo en cuenta la

morfología y la motilidad, antes de la ICSI. Una correcta selección del espermatozoide mejora los resultados de ICSI, en la fecundación e implantación (Ruiz *et al.*, 2012). Este procedimiento está indicado para aquellas parejas en que no se puede realizar una fertilización *In vitro* convencional, factor masculino grave, fallo de la fecundación, azoospermia, semen valioso (Zulategui *et al.*, 2013), pacientes varones con muestras de biopsia testicular, con fragmentación de ADN en espermatozoides, etc. (Ruiz *et al.*, 2012).

1.10 VALORACIÓN DE LA FECUNDACIÓN

Antes de que el embrión sea transferido a la madre, será importante evaluar si este ha sido correctamente fecundado, con el fin de asegurar la transferencia de embriones con una dotación diploide, se provoca la activación en la medida de lo posible. La fecundación es un proceso complejo, que supone la unión de un ovocito y un espermatozoide para dar lugar a una nueva entidad genética. La fusión entre ambas membranas provoca la activación del ovocito, lo que pone en marcha una serie de sucesos bioquímicos y físicos que dan lugar por un lado a la extrusión del segundo cuerpo polar y la formación del pronúcleo femenino y, por otro, a la descondensación de la cabeza del espermatozoide y posterior formación del pronúcleo masculino. En la mayoría de los casos aparece primero el pronúcleo masculino en posición central y, a continuación, lo hace del pronúcleo femenino cerca del segundo corpúsculo polar; es entonces cuando el pronúcleo femenino se acerca al masculino y ambos aumentan de tamaño. En su interior, se pueden distinguir los cuerpos precursores de nucléolos (CPN), los cuales se juntan y se dirigen hacia la zona de contacto de los dos pronúcleos. En la especie humana, el pronúcleo masculino tiene más CPN y es mayor que el femenino, aunque no siempre es fácil de apreciar. En la mayoría de los ovocitos, los dos pronúcleos juntos son visibles entre las 17 y las 20 horas posteriores a la inyección, por lo tanto, se considerará que un ovocito está fecundado normalmente cuando, transcurrido este período de tiempo, se observe la presentación de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares (Gamiz *et al.*, 2013).

1.11 CLASIFICACIÓN DE LOS CIGOTOS

Los cigotos se clasifican en distintos grupos que son:

1.11.1 TAMAÑO Y POSICIÓN RELATIVA DE LOS PRONÚCLEOS

Se debe de prestar especial atención al tamaño relativo de los pronúcleos, ya que los embriones procedentes de cigotos con distinto tamaño pronuclear han sido relacionados con una mayor tasa de bloqueo embrionario, una alta tasa de multinucleación en el segundo día de desarrollo y un mayor porcentaje de anomalías cromosómicas (Gamiz *et al.*, 2013).

- Grupo A: Pronúcleos de igual tamaño (Gamiz *et al.*, 2013).
- Grupo B: Pronúcleos de diferente tamaño (Gamiz *et al.*, 2013).

1.11.2 CUERPOS PRECURSORES DE NUCLEÓLOS

Existen grupos en función del número de CPN (Fig. 12), distribución y sincronía de estos.

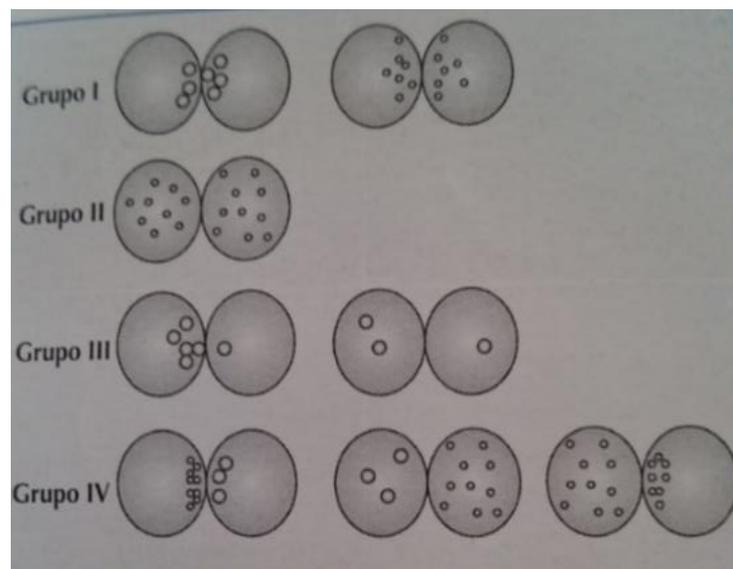


FIGURA 12: Representación esquemática de los cuatro grupos de cigotos en función del número y distribución de los cuerpos precursores de nucleólos. (Gamiz *et al.* 2013).

- **Grupo I:** De tres a siete CPN polarizados y sincrónicos, y con tres o menos de tres CPN de diferencia entre los dos pronúcleos (Gamiz *et al.*, 2013).
 - **Grupo II:** De siete a diez CPN dispersos y sincrónicos (Gamiz *et al.*, 2013).
 - **Grupo III:** Alguno de los dos pronúcleos, o ambos, tiene únicamente uno o dos CPN (Gamiz *et al.*, 2013).
- Grupo IV:** Cualquier otra combinación (Gamiz *et al.*, 2013).

1.11.3 HALO CITOPLASMÁTICO:

El halo citoplasmático es una zona cortical más clara que aparece en la mayoría de los ovocitos tras el proceso de la fecundación. Este halo se produce durante el crecimiento pronuclear y parece estar asociado, principalmente, a una redistribución mitocondrial (Gamiz *et al.*, 2013).

1.12 FECUNDACIÓN ANÓMALA

1.12.1 CIGOTOS CON UN SOLO PRONÚCLEO

La incidencia de cigotos con un solo pronúcleo es ligeramente mayor a 4-7% que una fertilización *In vitro* convencional. Sólo el 9,5% de los ovocitos posee una dotación genética diploide, siendo la mayoría de ellas consecuencia de activación partenogenética del ovocito, la cual resulta favorecida por el tratamiento con hyaluronidasa durante la decumulación y por el mismo proceso de inyección. Estos cigotos pueden dividirse normalmente, pero se descartan para la transferencia debido a su contenido cromosómico anormal (Gamiz *et al.*, 2012).

1.12.2 CIGOTOS CON TRES O MÁS PRONÚCLEOS

Es posible encontrar cigotos con tres pronúcleos y un solo corpúsculo polar; esto ocurre en aproximadamente un 4% de los casos. En ellos la aparición del tercer pronúcleo no se debe a la polipenetración, ya que únicamente se inyecta un espermatozoide por

ovocito, sino que puede explicarse por la ausencia de la extrusión del segundo corpúsculo polar. Se considera que estos cigotos poseen una dotación cromosómica anómala y no deben ser transferidos (Gamiz *et al.*, 2013).

1.12.3 FALLOS DE LA FECUNDACIÓN

Si tras las 17-20 horas posteriores a la inyección no se observan los pronúcleos, se puede considerar que el ovocito no ha sido fecundado (Fig. 13) (Gamiz *et al.*, 2013).

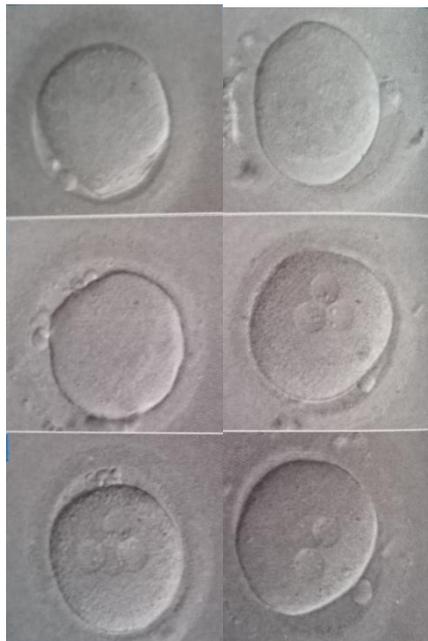


FIGURA 13: Ovocitos con fecundación anómala (200 X) (Gamiz *et al.* 2013)

1.13 VALORACIÓN MORFOLÓGICA DEL BLASTOCISTO

El desarrollo embrionario es un proceso que ocurre durante varios días. Después de la compactación celular, en la que las células pierden su identidad celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocele. Esta nueva disposición morfológica del embrión recibe el nombre de blastocisto (Mercader *et al.*, 2013).

1.13.1 TIPOS DE BLASTOCISTO

Pueden diferenciarse 5 tipos:

1.13.1.1 BLASTOCISTO TEMPRANO O INICIAL (Bi):

Comienzan a formarse la cavidad y empieza la diferenciación celular (Mercader *et al.* 2013) (Fig.14).

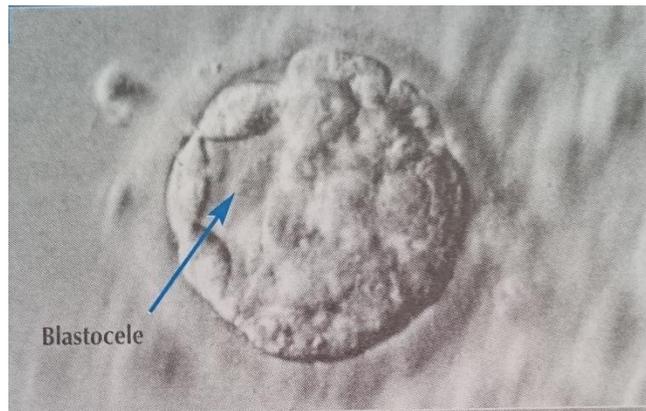


Figura 14: Blastocisto temprano (200 X) (Mercader *et al.* 2013).

1.13.1.2 BLASTOCISTO CAVITADO O INTERMEDIO (Bim):

El blastocele ocupa más del 50% del volumen del embrión (Mercader *et al.* 2013) (Fig. 15).



FIGURA 15: Blastocisto cavitado, la flecha señala la m.c.i. (Masa celular interna) (200 X) (Mercader *et al.*, 2013).

1.13.1.3 BLASTOCISTO EXPANDIDO (Be):

Se observa al blastocele rodeada por una monocapa celular o trofoectodermo, que formara la placenta, y una masa celular interna, que dará lugar al embrión. Con la expansión del embrión, se produce un aumento del volumen y una disminución del grosor de la zona pelucida (Mercader *et al.* 2013) (Fig. 16).



FIGURA 16: Blastocisto expandido (200 X) (Mercader *et al.*, 2013)

1.13.1.4 BLASTOCISTO ECLOSIONADO O HATCHING (Bh):

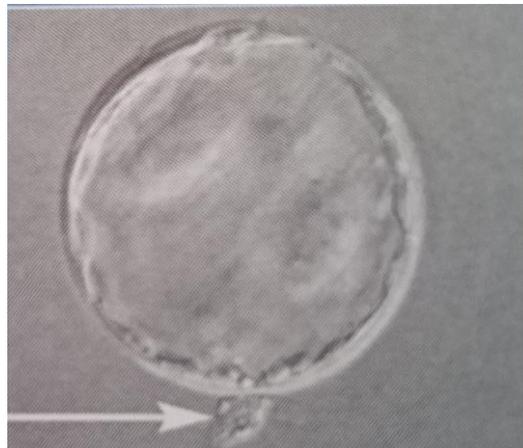


FIGURA 17. Blastocisto eclosionado, la flecha señala la salida del blastocele de la zona pelucida (200 X) (Mercader *et al.* 2013).

El Blastocisto comienza a salir a través de la zona pelucida (Fig. 17). En este tipo, se puede diferenciar entre Blastocisto eclosionando (cuando empieza la eclosión) y Blastocisto eclosionando en 8 (Fig. 18) (cuando la mitad del blastocisto está fuera de la zona pelucida) (Mercader *et al.*, 2013).

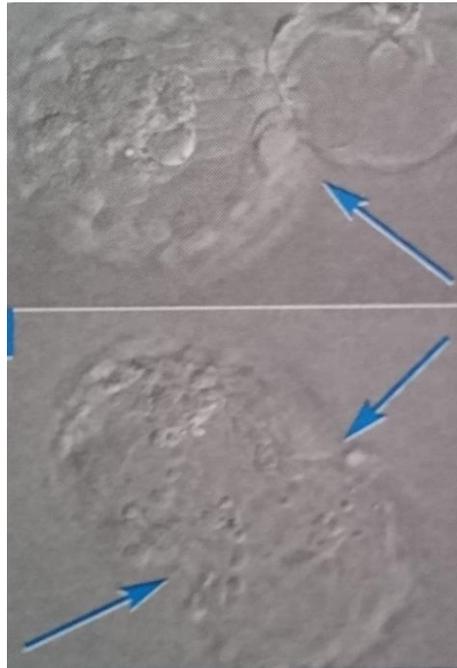


FIGURA 18. Blastocisto eclosionando, las flechas señalan el lugar de la eclosión (**200 X**) (Mercader *et al.*, 2013).

1.13.2 PARTES DEL BLASTOCISTO

Además del estadio del blastocisto, también se clasifica el tipo de masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (Tf) (Mercader *et al.*, 2013).

1.13.2.1 Masa celular interna

Se clasifica por el número de células que se observa

- **A:** Compacta, con muchas células redonda y bien definida (Fig. 19).

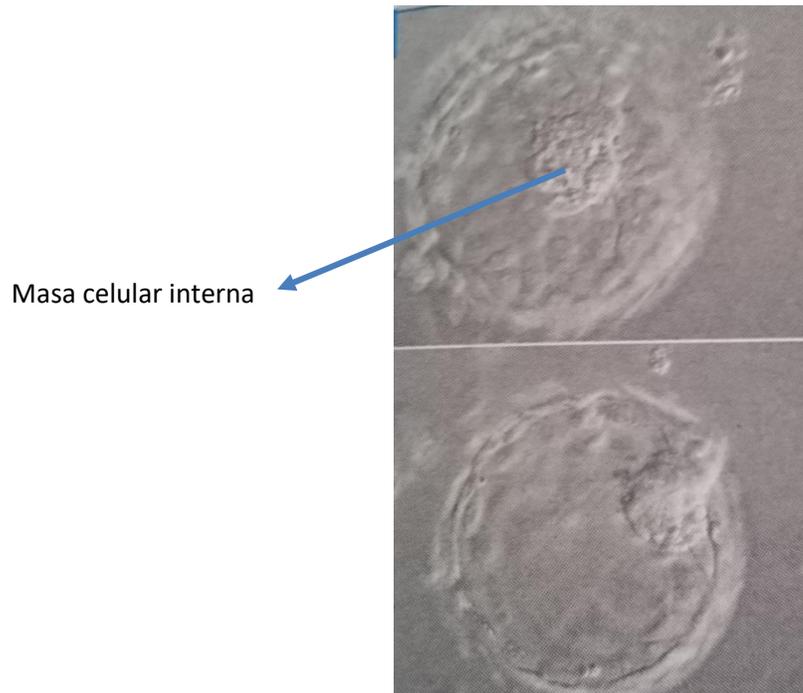


FIGURA 19. Masa celular interna de tipo A, la flecha señala la m.c.i. (200 X) (Mercader *et al.*, 2013).

- **B:** Varias células agrupadas y de aspecto laxo (Fig. 20).

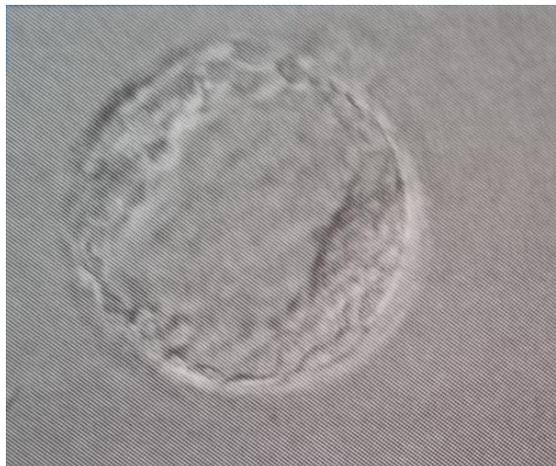


FIGURA 20. Masa celular de tipo B (200 X) (Mercader *et al.*, 2013).

- **C:** Muy pocas células (Fig. 21).

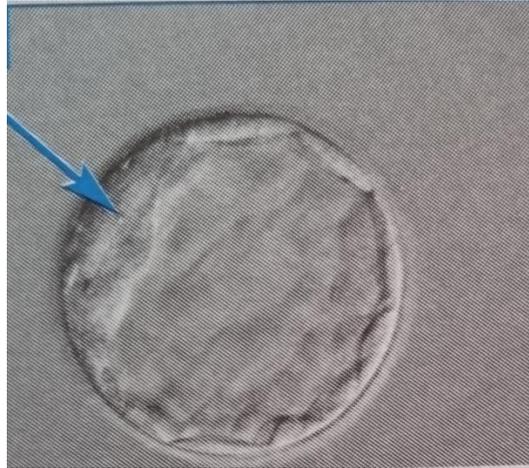


FIGURA 21. Masa de celular interna tipo C. La flecha señala la masa celular interna (200 X) (Mercader et al. 2013)

- **D:** Ausente o degenerada (Fig. 22).

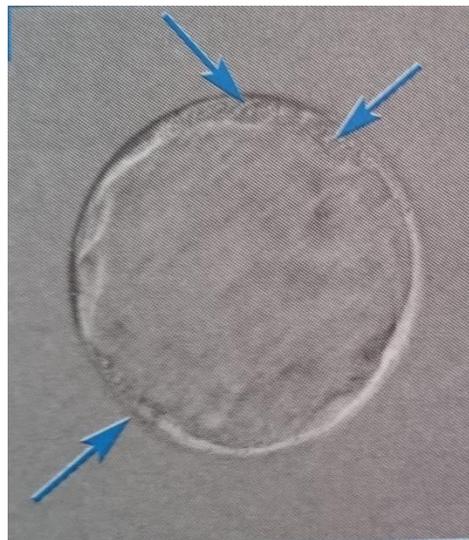


FIGURA 22. Embrión de tipo D. Las flechas señalan la masa celular interna degenerada (200 X) (Mercader *et al.*, 2013)

1.13.2.2 Trofoectodermo

Se diferencia en 4 tipos:

- **A:** Completo, formado por muchas células (Mercader *et al.*, 2013).
- **B:** Incompleto, presenta alguna zona lineal (Mercader *et al.*, 2013).
- **C:** Formado por pocas células (Mercader *et al.*, 2013).
- **D:** Con células degeneradas (Mercader *et al.*, 2013).

		TROFOECTODERMO			
		A	B	C	D
MASA CELULAR INTERNA	A				
	B				
	C				
	D				

FIGURA 23. Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad y del MCI y el trofoectodermo (ASEBIR , 2015).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN DEL TRABAJO

El área de colecta, recepción y procesamiento de datos, es la institución particular de salud de nombre Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur ubicada Mariscal Gamarra segunda etapa B-11, del distrito de Cusco, departamento de Cusco (Anexo 1), donde acuden pacientes con problemas de fertilidad y optan por los diferentes procedimientos de fertilidad que se ofrecen en dicho establecimiento, los pacientes que fueron elegidos para este estudio son aquellos que optaron por el procedimiento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides en óvulos donados.

2.2 MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

- Muestras frescas de semen obtenidas por el propio paciente en un recipiente estéril que la institución brinda debidamente codificado y rotulado. El estudio incluye dentro de sus datos pacientes de los departamentos de Cusco, Puno, Puerto Maldonado, Arequipa y Apurímac en general.
- Óvulos donados previamente aspirados por el médico tratante, y puestos en placas debidamente codificadas y rotuladas.

MATERIALES DE LABORATORIO

APARATOS Y EQUIPOS

- Incubadora Thermo Scientific Forma Series II Water Jacket CO₂ incubator.
- Incubadora Thermo Scientific HERAcell 150i CO₂ incubator.
- Incubadora REUCO *Ultima*.
- Mini incubadora ASTEC DRY INCUBATOR EZ Culture.
- Coda xtra in line Filter Green.

- Microscopio invertido OLYMPUS.
- Microinyectores RI.
- Agujas de microinyección RI.
- Microscopio óptico de campo claro ZEISS Primo star.
- Estereoscopio OLYMPUS.
- Placa térmica TOKAI HIT.
- Cabina de flujo laminar STREAM LINE.
- Digital dry bath ACCUBLOCK.
- Medidor de gases CO₂/O₂ G100.
- Medidor de temperatura Creisenger.
- Laptop SONY VAIO.

REACTIVOS:

- Solución de eosina al 0.5%.
- Batería de coloración Papanicolaou modificado (WHO, 2010) (Hematoxilina de Harris, EA-36, Orange G, alcohol al 90%, alcohol al 70%, agua destilada).
- Dimetilpolixiloxano.
- **MEDIOS: LIFEGLOBAL:**
- Global with HEPES.
- Global total.
- Global for fertilization.
- PVP (Polivinilpirrolidona).
- Lite Oil.
- Hyaluronidasa.
- Sperm slow ORIGIO.

MATERIALES FUNGIBLES:

- Tips de 10, 100, 1000 UI AXYGEM.
- Micropipeta NICHIRYO Le.
- Mouth piece.

- Cámara de Neubauer BOECO Germany.
- Cámara de conteo MAKLER SEFI-MEDICAL INSTRUMENTS.
- Placas 100x15mm, 35x10mm, 60x15mm, 50x9mm, doble pozo 60x15mm, y placas petri FALCON.
- Tubos cónicos de 15 ml FALCON.
- Pipetas de vidrio ORIGIO.
- Filtros de boca SARTORIUS.
- Pipetas de transferencia estéril FALCON.
- Pipetas descartables de primer uso.
- Porta y cubre objetos.
- Tubos de EPENDORF.
- Cubeta para descarte de materiales de vidrio.

OTROS:

- Bolsa especial para descarte de material biológico.
- Cuaderno de datos.
- Paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I.
- Padrón Excel.
- Cintas tornasol de pH MERCK.
- Elementos de bioseguridad personal.

2.3 METODOLOGÍA

Esta investigación corresponde a un diseño experimental al azar. Este estudio corresponde a una investigación descriptiva de corte transversal retrospectivo observacional.

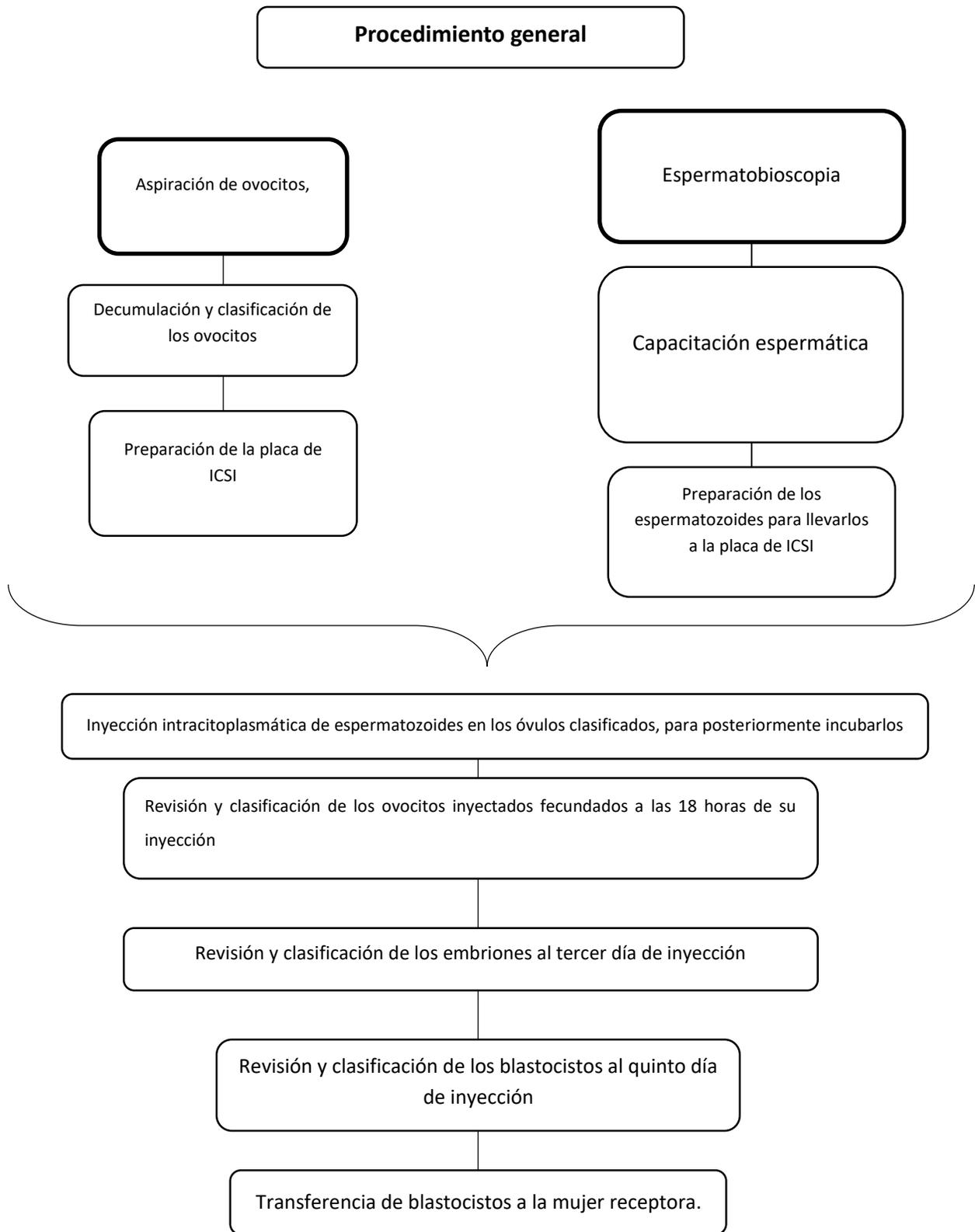


FIGURA 24: Procedimiento en el que se explica el paso a paso del procedimiento de ICSI

Universo muestral: Semen humano y Óvulos humanos de donantes

Tamaño muestral: El tamaño muestral corresponde a la sumatoria del promedio anual (29 parejas), el presente estudio se ejecutó en un periodo de dos años , siendo el total de investigados 58 parejas que acuden al Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur para el procedimiento de fertilidad denominado inyección intracitoplasmática con óvulos donados, de los cuales se obtuvieron dichos datos (Anexo 6).

2.3.1 VARIABLES:

VARIABLE INDEPENDIENTE:

El espermatozoide (morfología, motilidad, concentración).

VARIABLE DEPENDIENTE:

- Tasa de fecundación.
- Tasa de desarrollo embrionario.
- Tasa de buena calidad embrionaria.

2.3.2 ESPERMATOBIOSCOPIA:

Desde su punto de vista aislado, el examen del semen fresco puede considerarse el análisis más importante para determinar el potencial fértil del varón, aunque, de su resultado, no es posible deducir si un varón puede llegar a ser padre biológico o no. El propósito fundamental del análisis de semen radica en evaluar los parámetros descriptivos clásicos de un eyaculado, lo que proporciona información esencial del estado clínico del varón, y ser de ayuda en la investigación de las posibles causas de la infertilidad (Mollá *et al.*, 2013) (Fig. 24).

2.3.2.1 INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:

El paciente mantuvo una abstinencia sexual mínima de 3 y máxima de 5 días, con la recomendación de no haber bebido alcohol, ni consumido ningún tipo de medicamento al menos por 10 días, con el fin de no alterar el resultado final. En condiciones normales,

el paciente obtuvo la muestra de semen por masturbación, en un ambiente cómodo, adecuado y privado, en un frasco estéril que es entregado por el personal del Centro. Antes de obtener la muestra el paciente realizó el aseo personal general, el lavado y secado de las manos, persistiendo en las medidas de bioseguridad para evitar contaminación, al igual que las instrucciones para que el paciente no derrame la muestra y así se obtenga una muestra total. Una vez finalizo la toma de muestra el paciente cerró muy bien el frasco estéril, rotulo su nombre completo y entrego su muestra al laboratorio para su respectivo análisis y procedimiento (Mollá *et al.*, 2013).

2.3.2.2 EXAMEN MACROSCÓPICO (Anexo 2)

- **ASPECTO**

El aspecto del semen se valoró según su color, opacidad/transparencia y presencia de cuerpos mucosos y gelatinosos. El semen humano es normalmente un líquido homogéneo opalescente de color blanquecino-amarillento. Inmediatamente después de la eyaculación el semen es un coagulo semisólido, en pocos minutos empieza a licuarse, si entre 30 a 60 minutos la muestra no licuo debe de reportarse en el informe, posteriormente se podría necesitar un tratamiento adicional (Mollá *et al.*, 2013).

- **VOLUMEN**

El volumen del eyaculado procede de las vesículas seminales y de la glándula prostática y, en menor proporción, de las glándulas bulbouretrales y epididimarias. La medición del volumen seminal en el Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur es mediante una pipeta de plástico, suaves con la muestra. Una muestra por debajo de 1.5 ml se considera como una alteración y puede ser indicador de la ausencia bilateral congénita de los vasos deferentes o de los conductos eyaculadores (Mollá *et al.*, 2013).

- **pH**

El pH de la muestra licuada se determina normalmente con tiras de papel con límites de sensibilidad de 6,5 a 10,0. El pH de las muestras de semen debe ser igual o superior a 7,2, un pH menor de 7 en una muestra de bajo volumen y recuento espermático puede

deberse a una digenesia de los vasos deferentes o a una obstrucción de los conductos eyaculadores (Mollá *et al.*, 2013).

2.3.2.3 EXAMEN MICROSCÓPICO

Para el análisis se puede emplear el microscopio de contraste de fases (Anexo 2)

- **MOTILIDAD**

El análisis de la motilidad se realizó colocando una muestra de 10µl en un portaobjetos y tapando la muestra con una laminilla cubre objetos. Para realizar el recuento de los espermatozoides, se deben de contar al menos 100 espermatozoides en varios campos seleccionados al azar. La OMS redujo a tres categorías en su última edición, y son: Móviles progresivos, móviles no progresivos, inmóviles. Se debe de observar esta muestra con un aumento de 400X (Mollá *et al.*, 2013).

- **CONCENTRACIÓN**

La determinación de la concentración de espermatozoides es muy importante, ya que se consideran fundamentales para evaluar la calidad del eyaculado. La medida de la concentración espermática indicara el estado de la espermatogénesis del individuo (Bajo & Coroleu, 2009). Esta concentración se mide en una cámara de Neubauer con una solución de dilución se prepara disolviendo 50g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y 10 ml. al 35% (v/v) de formaldehido, enrazando en 1000 ml de agua destilada que vendría a ser el fijador de conteo, que posteriormente será homogenizado con 10µl de la muestra (WHO, 2010), luego se colocan 10µl de la muestra homogenizada en la cámara de Neubauer y se lleva al microscopio para ser analizada a 200X (Mollá *et al.*, 2013).

- **MORFOLOGÍA**

La morfología espermática se basó en realizar un frotis con 10µl de la muestra y luego una tinción con la batería de coloración Papanicolaou modificada en un portaobjetos, según (WHO, 2010) el valor mínimo para considerar que un paciente está dentro de lo normal en cuanto a morfología es de 4%. El método por el cual se observó y evaluó la morfología de los espermatozoides es (Mollá *et al.*, 2013):

Método de tinción Papanicolaou modificado (WHO, 2010)

La tinción Papanicolaou modificada se basa en la reacción química de los colorantes con los elementos celulares.

- Hematoxilina de Harris: Se usa para teñir el núcleo ya que este tiene composición ácida y la hematoxilina es básica. La membrana nuclear y la cromatina se tiñe de color azul oscuro o rojizo púrpura y el nucléolo de color rojo, rosado o naranja.
- Orange G (OG – 6): Se usa para teñir el citoplasma (ácido). Tiñe el citoplasma de color naranja. Es una solución de alcohol.
- Eosina Azur 50 (EA – 50): Se usa para teñir los citoplasmas. Coloración cianófila. Colorante ácido.

Una vez teñida la muestra fijada, se debe de llevar al microscopio y observar a un aumento de 1000X con aceite de inmersión. Contando los espermatozoides de la siguiente manera: Espermatozoides normales, alteraciones de la cabeza, de la pieza media, de la cola y espermatozoides inmaduros (Martinez *et al.*, 2013).

FLUJOGRAMA

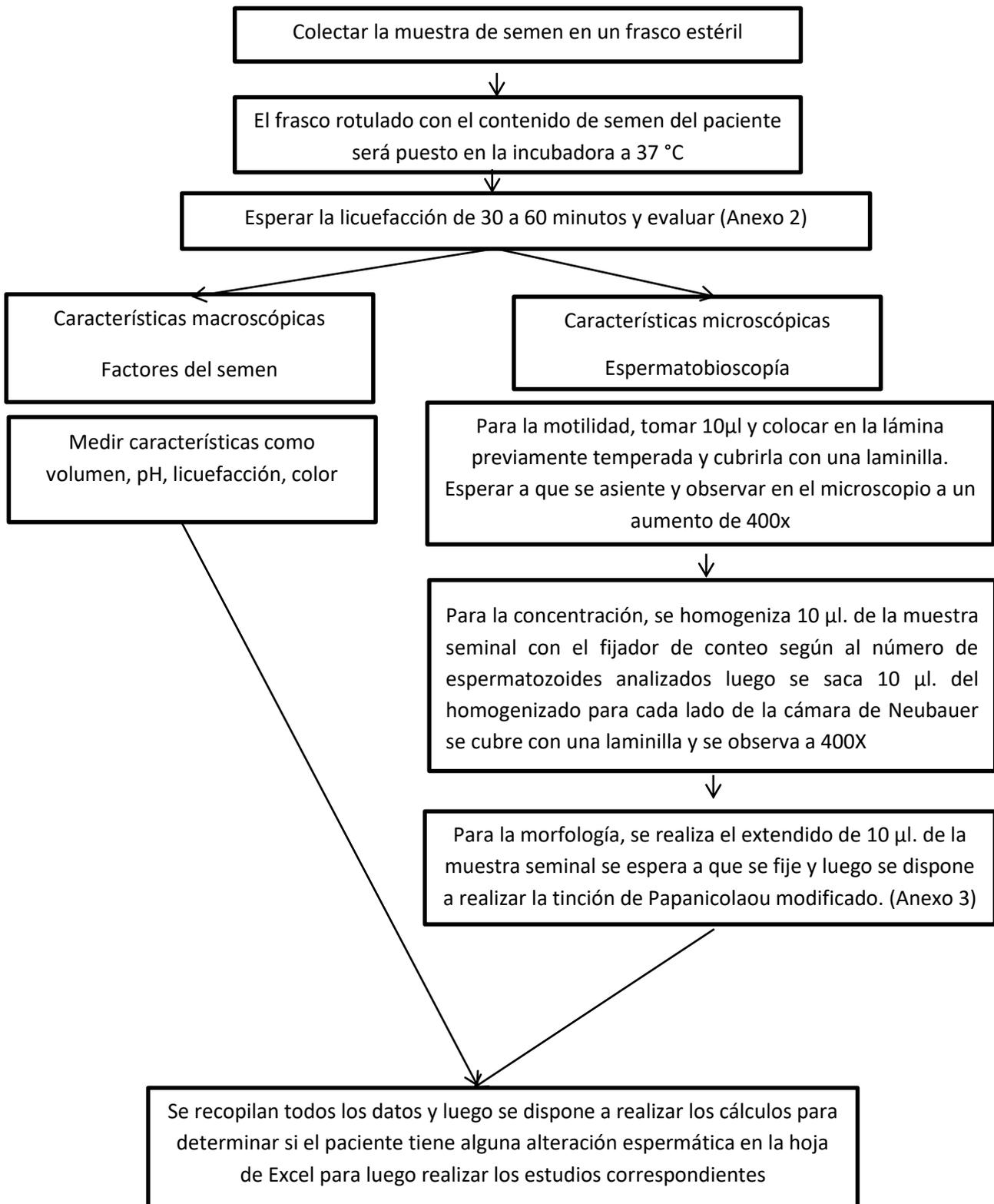


FIGURA 25: Método usado para el análisis de semen humano (Espermatobioscopia)

2.3.3 RECUPERACIÓN DE OVOCITOS DURANTE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR (Pella & Bartolo, 2013)

La punción folicular (Fig. 25) la realizó el médico ginecólogo tratante de la pareja, se realizó de 34-35 horas después de haber inducido la ovulación artificialmente con hCG en una sala de aspiración anexa al laboratorio. El médico tratante se encargó de verter el contenido folicular de la jeringa con la que aspiro en placas Samplix precalentadas a 37 °C que finalmente fueron transportados al laboratorio, donde se identificó, se lavó, clasificó, valoro la madurez y calidad de los ovocitos recuperados. Estos volverán a ser lavados y almacenados en la incubadora de manera temporal.

2.3.3.1 EL DIA ANTERIOR AL CASO:

Se preparó los siguientes materiales

- El medio de lavado global total w/hepes que se colocó en un termobloque de 37 °C.
- **Placa de almacenamiento temporal de ovocitos:** Se colocó en una placa de doble pozo 1 ml de global total for fertilization en el pozo central, luego se cubre con aceite lite oil y se gasea en la incubadora de CO₂ al 9% de concentración, a 37 °C.
- Se colocó también un frasco alicuotado de aceite lite oil en la incubadora para gasearlo a 9% de CO₂ a 37 C°.

2.3.3.2 EL DÍA DE LA ASPIRACIÓN FOLICULAR

El médico tratante debe de realizar la estimulación ovárica para la maduración de los ovocitos que posteriormente se aspiraran, realizando evaluaciones periódicas de los folículos. El día de la aspiración la paciente se encontró en una sala anexa al laboratorio donde fue sedada y monitoreada por el anesthesiólogo y el medico ginecólogo tratante. El médico inserta una aguja de punción y aspira el líquido folicular para la cual se prepararon placas Petri precalentadas a 37°C, en la que se depositaron los cumulo ovocitos y que posteriormente serán trasladadas al laboratorio de reproducción.

- Con un pipeta pasteur bordeada por flameo se sacó 1 ml de global total w/hepes y se cubre con aceite, que será usado para colocar los ovocitos recién aspirados.

Obtención de los ovocitos:

- Se prende el estereoscopio, se ajusta la luz y se desliza hasta el menor aumento
- Luego se recaudó el aspirado folicular y se empezó la búsqueda de los cúmulo-ovocitos haciendo movimientos rotatorios para su mejor visualización, observando muy bien también los bordes de la placa.
- Una vez localizados los cúmulo-ovocitos se extraen con la pipeta Pasteur y se colocó en el pozo central que anteriormente ya se había preparado.
- Luego se colocó el medio global total w/hepes en el segundo pozo de la placa. Se cargó los cúmulo-ovocitos con la pipeta y se trasladó a la periferia para poder lavarlos con movimiento rotatorios.
- Después se trasladó los cúmulo-ovocitos a la placa con medio global total for fertilization gaseado un día antes, este traslado se requiere hacer con la menor cantidad de medio usado anteriormente.
- Se rotulo la placa y finalmente se llevó a incubación por 3 horas.

FLUJOGRAMA

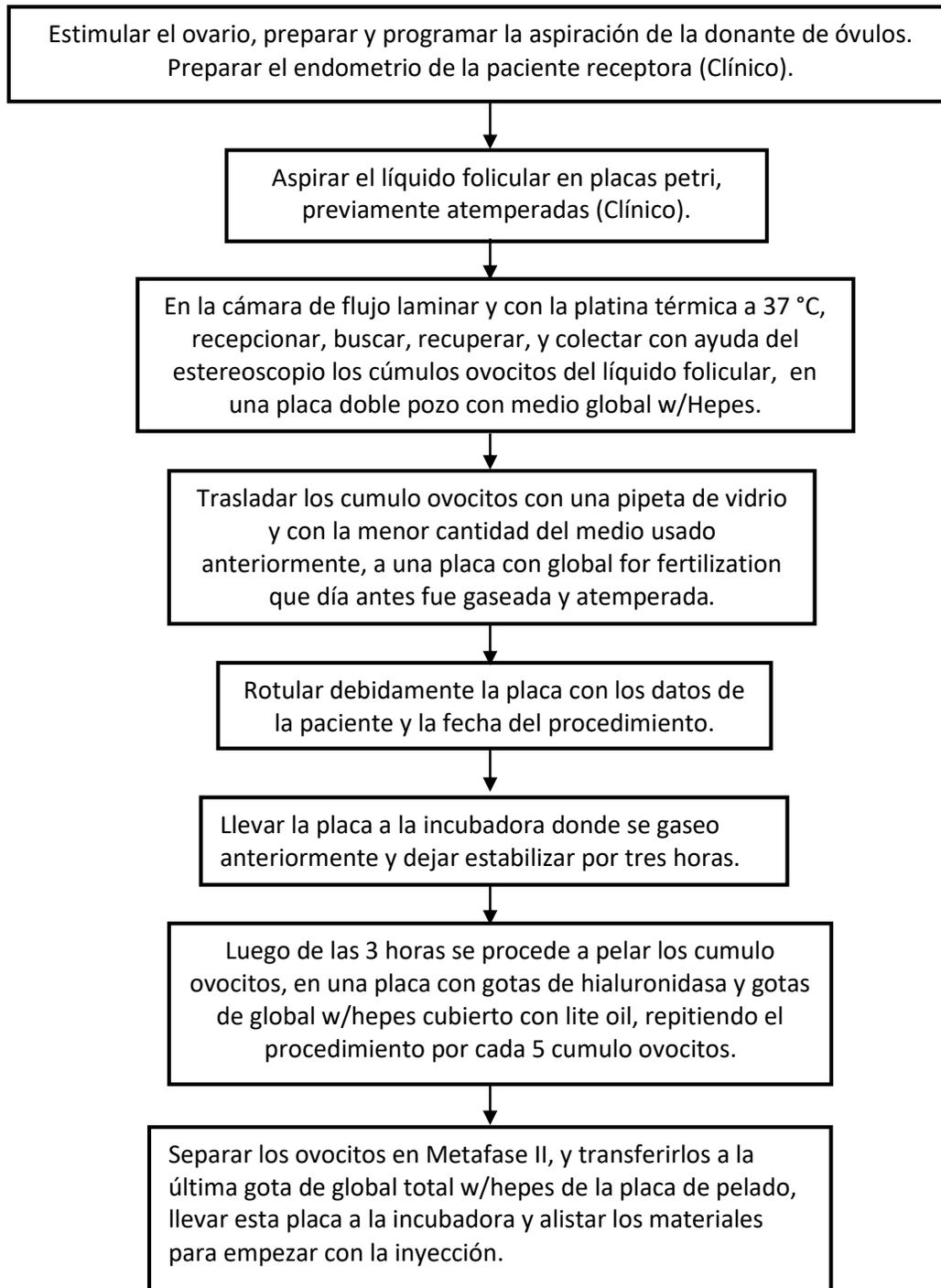


FIGURA 26: Procedimiento de aspiración y pelado de los cúmulo ovocitos.

2.3.4 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA (Selles, *et al.*, 2012) (Fig. 26)

(Anexo 4)

- El paciente obtuvo la muestra mediante masturbación y entregó su muestra en un frasco rotulado con el nombre de él y de su pareja.
- Esta muestra se llevó a la incubadora, procesando la misma en los 15 minutos como máximo luego de su emisión.
- Para revisar el conteo y el movimiento de los espermatozoides, se colocó 10 µl de la muestra en la cámara Makler.

Capacitación espermática

- Contando con estos datos se procedió a preparar los tubos falcón con los medios. Y se procedió a preparar los tubos de gradientes de densidad y de lavado.
- En un tubo falcón se deslizó un volumen determinado (según la concentración y la motilidad) de medio de gradiente al 90% impregnando las paredes hasta el fondo de un tubo cónico
- A continuación se vertió el mismo volumen del gradiente de 45% con mucho cuidado y evitando que se mezclen y se rompa la interface entre ellos
- Se depositó el mismo volumen de muestra de semen con mucho cuidado, deslizando la muestra por la pared del tubo falcón.
- Luego se procedió a centrifugar el contenido de este tubo a 1500 r.p.m. por un lapso de 10 minutos, posteriormente con una pipeta Pasteur, se recuperó el sedimento, que luego se traspasó al tubo de lavado contenido de medio global total w/hepes y se centrifuga a 1500 r.p.m. por 5 minutos.
- El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el botón en 0,4 ml de medio global total w/hepes, se esperó para poder recuperar los espermatozoides de la superficie. Luego se pasó a una segunda evaluación de volumen y concentración.

FLUJOGRAMA

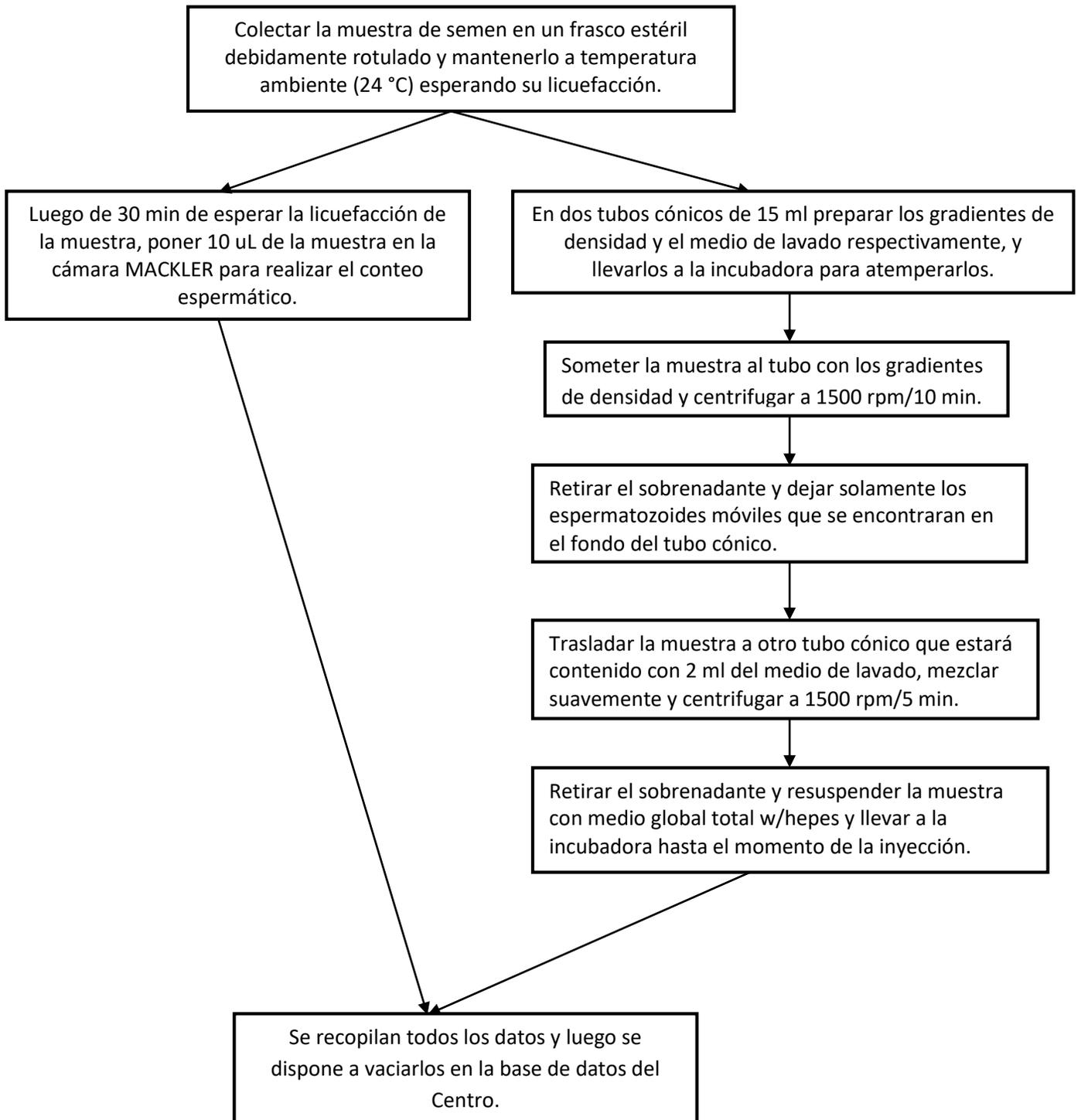


FIGURA 27: Procedimiento de la capacitación espermática

2.3.5 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE (Pella & Bartolo, 2013) (Fig. 27) (Anexo 5)

- **El día anterior al caso:**

Se debe de tener los siguientes materiales listos:

- **Preparación de la placa de cultivo:** Es la placa donde se colocaran los ovocitos luego de ser pelados e inyectados. Este medio soporta todo el desarrollo embrionario preimplantacional. En una placa se coloca 5 gotas de 50 µl de medio global total, y se cubre con aceite lite oil. Luego se debe de guardar en la incubadora para su gaseo con CO₂ al 9% a 37 °C
- **Preparación de las placas**
 - Preparación de la placa de pelado: En una placa se colocan 3 gotas de 50 µl de Hyaluronidasa y 3 gotas de 200 µl de Global total w/hepes, y se cubre con aceite
 - Preparación de la placa de inyección: En una placa se coloca 5 µl de PVP y 4 gotas de 5 µl de global total w/hepes alrededor.
- **Preparación del micromanipulador**
 - Primero se debe de cambiar la pipeta Holding, para lo cual se retira la pipeta Holding de su empaque y con la ayuda de una jeringa y muy suavemente se llena la pipeta de dimetilpolixiloxano. Una vez llena se coloca en el porta pipeta y se enrosca para asegurarla al sujetador.
 - Se repite el mismo procedimiento para la aguja de ICSI
Luego se coloca una placa de ensayo para poder alinear las agujas.

2.3.5.1 PELADO DE OVOCITOS (Pella & Bartolo, 2013)

Luego de guardar los cúmulo-ovocitos en la incubadora por un lapso de 2 a 4 horas, se trabajan de la siguiente manera:

- Se debe de contar con pipetas bordeadas de diferentes calibres.

- Se saca la placa de almacenamiento temporal de la incubadora y se trasladan 5 cúmulo-ovocitos a una gota de hyaluronidasa.
- Con la pipeta y la ayuda de un mouth piece se pipetea vigorosamente por 10 segundos logrando así desprender las células del cúmulo del ovocito, y se traslada los ovocitos a la primera gota de global total w/hepes.
- Se lavan en las dos siguientes gotas de global total w/hepes para desprender al ovocito de las células del cúmulo y de la hyaluronidasa, y se almacenan en la última gota de medio clasificando los maduros y los que no. Este procedimiento se repite para todos los cúmulo-ovocitos.

2.3.5.2 INYECCIÓN DE LOS OVOCITOS (Pella & Bartolo, 2013)

- Con la ayuda de una pipeta se coloca una gota de la muestra de semen capacitada en la placa de ICSI, luego se arrastra la gota hasta que toque el medio PVP.
- Luego se coloca la placa de inyección en la incubadora por un lapso de 15 minutos a 37 °C.
- Se retira la placa de la incubadora, y con otra pipeta se aspira los ovocitos que serán inyectados y se les deposita en una gota con medio global total w/hepes de la placa de inyección.
- Se baja la aguja de inyección hacia la gota de PVP y con la ayuda de su inyector formar gotas de dimetilpolixiloxano sobre el PVP para estabilizar el sistema de presiones, luego aspirar el PVP y levantar la aguja de inyección
- Luego llevar la pipeta de inyección hacia la gota donde se encuentra la suspensión de espermatozoides y aspirar un número adecuado de espermatozoides suficientes para inyectar los ovocitos recuperados, y depositarlos en la gota central del PVP de la misma placa.
- Con la ayuda de la aguja de inyección inmovilizar los espermatozoides ejerciendo presión sobre la cola de estos realizando un movimiento rápido de la aguja para quebrarles el flagelo.

- Luego aspirar un espermatozoide de morfología normal y llevarlo a la gota donde se encuentran los ovocitos
- Sujetar un ovocito con la pipeta Holding, orientando el cuerpo polar hacia las 6 o las 12
- Con el espermatozoide muy cerca de la punta de la pipeta de inyección introducirla en el ovocito en posición de las 3, aspirar un poco de citoplasma para ayudar a romper la membrana y luego inyectar el espermatozoide al ovocito, se retira la aguja de inyección y se libera al ovocito de la pipeta holding.
- Se procede de la misma manera con todos los ovocitos.
- Una vez terminada todas las inyecciones se suben los inyectores y se lleva la placa a la platina térmica de estereoscopio.
- Con la ayuda de una pipeta pasteur, se pasan los ovocitos microinyectados a un placa de cultivo con medio global total que fue gaseada un día antes.
- Se rotula la placa y se incuba para su posterior evaluación.

2.3.5.3 EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN (Pella & Bartolo, 2013)

- Luego de dejar incubando a los ovocitos microinyectados por un lapso de 17 a 20 horas se procede a la primera evaluación.
- Se saca la placa de la incubadora donde se trasladaron los ovocitos microinyectados
- Se evalúa la fecundación con la ayuda del estereoscopio primero la presencia de los dos Pronúcleo en el citoplasma del ovocito y dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino
- Luego con la ayuda del estereoscopio y una pipeta pasteur bordeada se saca aquellos ovocitos con fecundación anómala y se trasladan a una gota periférica de la placa.
- Se registran todos los datos o características importantes.

2.3.5.4 EVALUACIÓN EMBRIONARIA DE QUINTO DÍA:

De la misma manera se procede a evaluar la calidad y la cantidad de los blastocistos que llegaron hasta esta etapa, y se clasifican (Fig. 27) entre los que se transferirán a la paciente y los que se congelaran, para un posterior procedimiento.

La evaluación embrionaria se cataloga de la siguiente manera:

El grado de expansión, la calidad de la masa celular interna (MCI), la calidad del trofoectodermo. Por el grado de expansión se pueden observar:

- Blastocisto intermedio (Bim)
- Blastocisto expandido (Be)
- Blastocisto hatching (Bh)

De los cuales según la clasificación del CFGS se tiene tres blastocistos top o de mejor calidad los cuales son: BeAA, BhAA, BimAA (Elaborado por el director médico del CFGS y validado por (Pella & Bartolo, 2013).

Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo
Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Eclosionando"	A	A
		B
		C
		D
	B	A
		B
		C
		D
	C	A
		B
		C
		D
D	A,B,C o D	
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)		
Mórula		

FIGURA 28: Clasificación blastocitaria según ASEBIR (Cortés et al., 2008).

FLUJOGRAMA

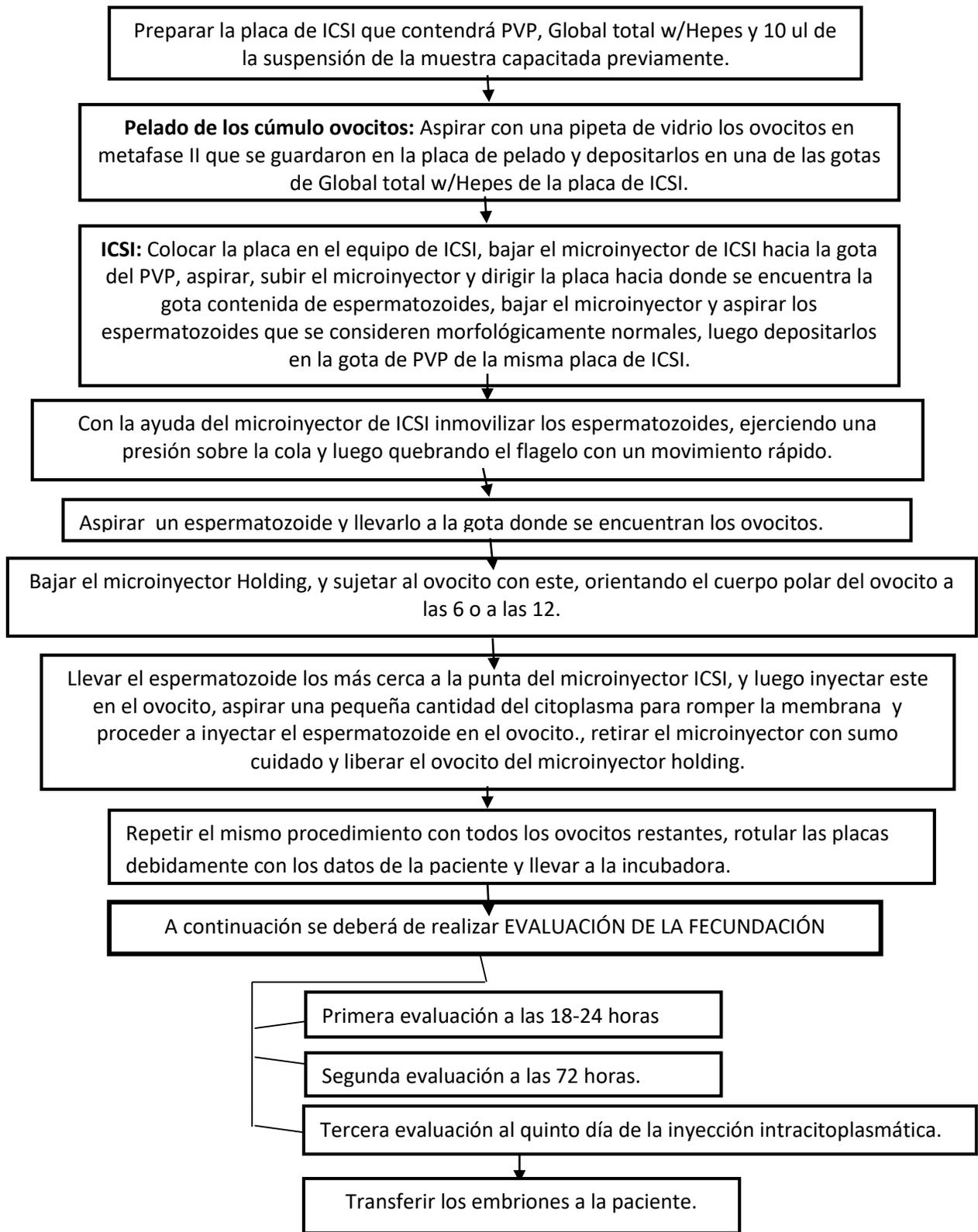


FIGURA 29: Secuencia del procedimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides humanos

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de varianza de la correlación se llevó a cabo utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

Los pacientes masculinos se categorizaron en tres grupos, según sus características espermáticas, teniendo como resultado la cantidad de muestras normales y alteradas.

Del mismo modo se confecciono una tabla que expresa las múltiples alteraciones categorizadas en cuatro grupos.

Todos los casos se categorizaron en cuatro grupos, que indican la cantidad de ovocitos desarrollados por cada caso quiere decir 100%, >50%, <50% y 0% de ovocitos desarrollados en cada caso, para el cual se confeccionaron tablas en las cuales figuran la cantidad de ovocitos desarrollados en porcentajes por cada tasa evaluada indicando las frecuencias o prevalencias de las cantidades de ovocitos inyectados con semen normal o alterado en las diferentes características seminales evaluadas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA MOTILIDAD, LA MORFOLOGÍA Y CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN SEMEN HUMANO.

En los estudios de evaluación y caracterización de las muestras de semen humano de 58 pacientes, se analizaron varias características, de las cuales se estimaron la motilidad, concentración espermática y morfología. A partir de los datos obtenidos se observó que la alteración frecuente es la morfología espermática, caracterizada con el nombre de teratozoospermia, siendo 42 los casos que representan el 72.41% (tabla 1), con una media de 2.83% (tabla 2) menor al valor considerado como referencia mínima para esta característica que es 4 % según los criterios del manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010).

En la tabla 1, se demuestra, así mismo; que en la alteración de la motilidad estudiada (astenozoospermia) para 58 pacientes evaluados se presentaron 13 casos, que evidencian el 22.41% con una media de 40.62% valor que se encuentra por encima de la referencia mínima que es 32% de acuerdo a WHO (2010).

Tabla 1: ANÁLISIS ESPERMATOBIOSCÓPICO EN SEMEN HUMANO DE 58 PACIENTES DEL CFGS.

Características	N° de casos	N° de casos normales	% de casos normales	N° de casos alterados	% de casos alterados
Motilidad espermática	58	45	77.59%	13	22.41%
Concentración espermática	58	54	93.10%	4	6.90%
Morfología espermática	58	16	27.59%	42	72.41%

Del mismo modo, se observó que los casos de alteración en la concentración espermática (oligozoospermia) para 58 pacientes evaluados, se registraron 4 casos, siendo el 6.90% del total, con una media de 46.16 millones de espermatozoides por mililitro de semen, que es mayor al valor mínimo referenciado por la WHO (2010) que representa 15 millones de espermatozoide por mililitro de semen.

De los resultados obtenidos a partir del estudio de evaluación y caracterización de la motilidad, la morfología y concentración de espermatozoides en semen humano en comparación con lo obtenido por Burga (2016), quien concluye, que la alteración de las características microscópicas es la disminución de la motilidad progresiva (astenozoospermia) con 28% de casos, mayor al porcentaje de casos en el presente estudio que representa el 22.41%. Del mismo modo, confirma que las alteraciones en el recuento espermático (oligozoospermia) están presentes en un 19.3% de los casos, difiriendo con el presente trabajo, que representa el 6.90% de todas las muestras evaluadas; además con respecto a la morfología alterada (teratozoospermia), corrobora la presencia de un 14% de casos, menor a los resultados obtenidos en la presente investigación, correspondiendo a un 72.41%.

Tabla 2: ANÁLISIS ESPERMATOBIOSCOPICO EN SEMEN HUMANO INCLUYENDO ELEMENTOS ESTADÍSTICOS

Características	Medía	Desviación	Mínimo	Máximo	Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite Superior
Motilidad	40.6207	13.4671	4.0	70.0	37.0797	44.1617
Concentración	46.1552	29.1101	3.0	147.0	38.5011	53.8093
Morfología	2.82759	1.85565	0.0	7.0	2.33967	3.31551

En base a los resultados obtenidos es preciso señalar que probablemente las diferencias observadas, son efecto de los distintos tipos de factores físicos, químicos y ambientales que pueden afectar a la funcionalidad espermática y, por ende, a las características morfológicas; por ello, el análisis de la morfología puede representar un indicador del estilo de vida, riesgos ocupacionales o factores medioambientales, referido por Martínez

et al., (2013). De la misma manera Cooper *et al.*, (2010) afirman que la calidad del semen se toma como una buena medición en fecundidad masculina, toxicología reproductiva, epidemiología y riesgo de embarazo.

TABLA 3: ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE MÚLTIPLES ALTERACIONES EN MUESTRAS ESPERMÁTICAS ESPECÍFICAS EN SEMEN HUMANO EN 58 CASOS EVALUADOS EN EL CFGS

Características espermáticas alteradas CASOS	N°	%
Sin alteraciones espermáticas	16	27.59%
Con 1 alteración espermática	28	42.28%
Con 2 alteraciones espermáticas	11	18.97%
Con 3 alteraciones espermáticas	3	5.17%
TOTAL	58	100%

En la tabla 3 se observó que 16 muestras (27.59%) no presentan alteraciones espermáticas (normozoospermicos), mientras que 28 pacientes (42.28%) presentaron al menos una alteración espermática respecto a la motilidad, concentración y morfología denominándose como astenozoospermia, oligozoospermia y teratozoospermia, respectivamente, de la misma forma se observó que 11 casos (18.97%) presentaron dos alteraciones a la vez, denominándose según sus características como oligoastenozoospermia, oligoteratozoospermia y astenoteratozoospermia; los pacientes que muestran tres alteraciones espermáticas son 3, representan el 5.17% del total de casos evaluados, identificándose como oligoastenoteratozoospermia, uno de los grupos con más riesgo de fallo de fecundación, mala calidad embrionaria o embarazo frustrado, a causa precisamente de la polialteración señalada, tal como indica Mercan *et al.* (2009) quienes realizaron un estudio con el objetivo de investigar el impacto de la oligoastenoteratozoospermia grave (OAT) en el resultado del embarazo en 279 ciclos consecutivos de inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI) en el cual se determinó que, las parejas que se someten a ICSI con infertilidad masculina severa

(oligoastenoteratozoospermia) tienen una tasa de fertilización ligeramente reducida, pero sus posibilidades de parto y pérdida del embarazo son similares a las de otros pacientes que se someten a ICSI clínico y FIV con infertilidad no masculina.

Asimismo Gill *et al.*, (2007), explicaron que, las diversas variaciones en las células espermáticas podrían conducir a fallas reproductivas en el hombre que abarcan una amplia gama que va desde la incapacidad para fecundar hasta malformaciones que pueda presentar el recién nacido atribuibles a factores paternos, por esta razón un daño en el gameto masculino puede tener un papel significativo en las pérdidas tempranas, y en calidad embrionaria. Un buen diagnóstico por parte del laboratorio es de suma importancia, por ser el primer paso para reconocer la gravedad de la alteración y evaluar el tratamiento correcto para el paciente.

3.2 RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE FECUNDACIÓN, TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS Y TASA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA.

3.2.1 RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE FECUNDACIÓN

Los resultados de la evaluación de la relación entre la motilidad espermática y fecundación del 100%, >50%, <50%, y 0% (tabla 4), de ovocitos inyectados con muestras de motilidad alterada se observa 1 solo caso (1.72%) en el que fecundaron el 100% de los ovocitos inyectados y 9 casos (20.69%) en los cuales fecundaron más del 50% de los ovocitos inyectados por caso.

Los resultados del análisis de varianza de la correlación estudiada, demuestra que la relación entre motilidad y óvulos fecundados muestra que no existe diferencia significativa 0.8913 ($P > 0.05$) entre los tratamientos evaluados, es decir que la motilidad espermática no afecta a la fecundación de los ovocitos inyectados en ICSI (Anexo 6).

Tabla 4: RELACIÓN ENTRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y LA FECUNDACIÓN DE LOS OVOCITOS INYECTADOS POR CASO

FECUNDACIÓN	MOTILIDAD				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA		N	%
	N	%	N	%		
100%	9	15.52	1	1.72	10	17.24
>50%	35	60.34	12	20.69	47	81.03
<50%	1	1.72	0	0	1	1.72
0%	0	0	0	0	0	0
TOTAL	45	77.59	13	22.41	58	100.00

Por lo expuesto no existe una relación significativa entre los tratamientos, de motilidad espermática y fecundación de ovocitos, coincidiendo de esta manera con lo mencionado por Mansour *et al.* (1995) quienes indicaron que el ICSI para el tratamiento de la infertilidad por factor masculino no tiene una correlación entre la motilidad y las tasas de fertilización y embarazo, siempre y cuando se pueda encontrar espermatozoides con buena forma morfológica para la microinyección.

Una causa probable para que no exista una diferencia significativa entre la motilidad espermática y la fecundación de ovocitos son las alteraciones nucleares de espermatozoides que generalmente no se detectan antes de la etapa de desarrollo de embriones de 8 células, cuando se ha iniciado una expresión importante de los genes derivados de los espermatozoides (Tesarik, 2005), aunque algunos autores como Chatzimeleteiou *et al.* (2007) discrepan e indican que la motilidad espermática se correlaciona directamente con la tasa de desarrollo de dos pronúcleos (2PN), los cuales se observan a las 17 o 20 horas luego de la inyección, las profundas deformidades del citoesqueleto sirve como un factor hipotético que podría explicar dicha correlación.

3.2.2 RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS

La relación entre la motilidad espermática y el desarrollo de blastocistos a partir de los ovocitos inyectados (Tabla 5) se observó que no existen casos con el 100% de

blastocistos desarrollados, mientras que la relación entre el desarrollo de blastocistos mayor al 50% de ovocitos inyectados por caso y espermatozoides con motilidad alterada se distinguen 9 casos (15.52%) y menor al 50% 3 casos (5.17%). Así mismo se diferenció también la presencia de 3 casos (5.17%) en los cuales los ovocitos donados inyectados con semen de característica motil normal no llegaron a desarrollar blastocistos. La relación entre motilidad y desarrollo de blastocistos muestra que no existe diferencia significativa 0.8680 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados; es decir, la motilidad espermática no afecta al desarrollo de blastocistos en ICSI (Anexo 7).

Tabla 5: RELACIÓN ENTRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y EL DESARROLLO DE BLASTOCISTOS DE LOS OVOCITOS INYECTADOS POR CASO.

	MOTILIDAD				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA		N	%
DESARROLLO DE BLASTOCISTOS	N	%	N	%		
100%	0	0	0	0	0	0
>50%	15	25.86	9	15.52	24	41.38
<50%	27	46.55	3	5.17	30	51.72
0%	3	5.17	1	1.72	4	6.90
TOTAL	45	34.48	13	22.41	58	100

De los valores considerados en la tabla 5 se distinguen 12 casos en los que se inyectaron espermatozoides con motilidad alterada que si llegaron a desarrollar blastocistos, para los cuales se debe de resaltar lo mencionado por (Collodel *et al.*, 2007), que la presencia de aneuploidias podría estar asociada con la reducción de la motilidad del esperma, por lo tanto comprometer los resultados, en el cual se engloba la calidad embrionaria, el fracaso de fertilización y de tasas de embarazo, indicado así por Van Rumste *et al.* (2000) y ESHRE, Capri Workshop Group (2007) quienes distinguieron la alteración de la motilidad como un predictor de fracaso.

3.2.3 RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y TASA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA

En la tabla 6, se observa la relación entre los tratamientos de motilidad espermática y buena calidad de blastocistos, en la cual existen 4 casos con el 100% de blastocistos de buena calidad embrionaria (o calidad top consideradas así por “el Centro” y que son, blastocisto hatching AA, blastocisto expandido AA y blastocisto intermedio AA) e inyectados con espermatozoides de motilidad alterada, luego se consideran la presencia de blastocistos que no presentaron buena calidad embrionaria, y se destacaron 2 casos (3.45%).

Tabla 6: RELACIÓN ENTRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y LA BUENA CALIDAD DE BLASTOCISTOS DE LOS OVOCITOS INYECTADOS POR CASO.

	MOTILIDAD				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA			
BLASTOCISTOS CON BUENA CALIDAD	N	%	N	%	N	%
100%	11	18.97	4	6.90	15	25.86
>50%	21	36.21	6	10.34	27	46.55
<50%	5	8.62	1	1.72	6	10.34
0%	8	13.79	2	3.45	10	17.24
TOTAL	45	77.59	13	22.41	58	100

La relación entre motilidad espermática y buena calidad embrionaria muestra que no existe diferencia significativa 0.8400 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados, es decir que la motilidad espermática no afecta a la buena calidad embrionaria en ICSI (Anexo 8), concordando con Mansour *et al.*, (1995), quienes indicaron que el ICSI para el tratamiento de la infertilidad por factor masculino no tiene una correlación entre la motilidad y las tasas de fertilización y embarazo, siempre y cuando se pueda encontrar espermatozoides con buena forma morfológica para la microinyección; este estudio discrepa; con los de Di Santo *et al.* (2011) y Bhavni *et al.*, (2014) quienes indican que la disminución de la motilidad de los espermatozoides se ha atribuido al daño en la

membrana mitocondrial, afectando a la capacidad de fecundación, ciertamente esta característica se debería de tomar en cuenta en el momento de la inyección intracitoplasmática.

3.3 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS, TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS, Y TASA BUENA CALIDAD DE BLASTOCISTOS.

3.3.1 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS

De la tabla 7 se desprende que al comparar la fecundación entre ovocitos inyectados con espermatozoides de muestras caracterizadas como oligozoospermia (concentración espermática alterada) se observa que, existen 2 casos (3.45%) con el 100% de ovocitos fecundados en cada caso, en comparación a los 8 casos (13.79%) en los que se inyectaron ovocitos con espermatozoides de concentración normal y que llegaron a fecundar el 100% de los ovocitos inyectados. En cuanto a aquellos que fecundaron en una proporción mayor al 50% de ovocitos inyectados por cada caso, se demostró 46 casos (79.31%) con semen de concentración espermática normal y 2 casos (3.45%) con semen oligozoospermico.

Tabla 7: RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA Y LA FECUNDACIÓN DE LOS OVOCITOS INYECTADOS POR CASO.

	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA		N	%
FECUNDACIÓN	N	%	N	%		
100%	8	13.79	2	3.45	10	17.24
>50%	46	79.31	2	3.45	48	82.76
<50%	0	0	0	0	0	0
0%	0	0	0	0	0	0
TOTAL	54	93.10	4	6.90	58	100

La relación entre la concentración espermática y fecundación de ovocitos inyectados muestra que no existe diferencia significativa 0.9582 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados, es decir que la concentración espermática no afecta a la fecundación de ovocitos en ICSI (Anexo 9).

Sin embargo, se puede deducir que, al no existir una cantidad adecuada de espermatozoides en el momento del procedimiento disminuiría las probabilidades de poder inyectar un espermatozoide con las características morfológicamente adecuadas que pueda ser predecesor de una óptima fertilización, ya que la reducción en la tasa de embarazo se atribuye principalmente a una baja tasa de fertilización debido a una disminución en el conteo como lo mencionaron Hirsch *et al.*, (1986) y Van Uem *et al.*, (1985), no obstante se debe de tomar en cuenta también lo mencionado por Tesarik (2005) quien señaló que las alteraciones nucleares en los espermatozoides generalmente no se detectan antes de la etapa de desarrollo de embriones de 8 células, cuando ha comenzado una expresión importante de los genes derivados de espermatozoides.

3.3.2 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS

La relación entre la concentración espermática y el desarrollo de blastocistos (Tabla 8), mostró que no existió el desarrollo al 100% de blastocistos del total de ovocitos inyectados con semen normal o con semen caracterizado como oligozoospermico y 50 casos (86.20%) con menos del 100 y más del 0% de blastocistos desarrollados por caso que fueron inyectados con semen sin alteración de concentración espermática.

La relación entre concentración espermática y desarrollo de blastocistos muestra que no existe diferencia significativa 0.700 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados, es decir que la concentración espermática no afecta al desarrollo de blastocistos en ICSI (Anexo 10).

Tabla 8: RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA Y EL DESARROLLO DE BLASTOCISTOS DEL TOTAL DE OVOCITOS INYECTADOS POR CASO.

	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA		N	%
DESARROLLO DE BLASTOCISTOS	N	%	N	%		
100%	0	0	0	0	0	0
>50%	15	25.86	1	1.72	17	29.31
<50%	35	60.34	3	5.17	37	63.79
0%	4	6.90	0	0.00	4	6.90
TOTAL	54	93.10	4	6.90	58	100

Sin embargo autores como Strassburger *et al.*, (2000) describieron que un predictor negativo para los resultados de ICSI es el recuento muy bajo de espermatozoides, que no solamente afectaría en la fecundación sino también podría ser, un antecedente de cáncer testicular en pacientes jóvenes con problemas tempranos en sus muestras espermáticas, también se podría sospechar acerca de una obstrucción en los conductos, una inflamación en el sistema urinario o netamente reproductor, una infección a nivel de vejiga o en alguna parte del conducto que traslada a los espermatozoides, o un problema a nivel hormonal por el que no se estarían generando la cantidad suficiente de espermatozoides.

3.3.3 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN Y LA TASA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA

En la tabla 9 se observa que los ovocitos inyectados con espermatozoides de concentración espermática normal, llegaron a desarrollarse en 44 casos (75.85%) hasta blastocistos de buena calidad, y aquellos ovocitos que llegaron a desarrollarse hasta blastocistos y que fueron inyectados con muestras de semen oligozoospermicas son 4 casos (6.89%).

La relación entre concentración espermática y blastocistos de buena calidad muestra que no existe diferencia significativa 0.213 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados, es

decir que la concentración espermática no afecta a la buena calidad embrionaria en ICSI (Anexo 11).

Tabla 9: RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA Y BLASTOCISTOS CON BUENA CALIDAD DEL TOTAL DE OVOCITOS INYECTADOS POR CASO.

	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA		N	%
BLASTOCISTOS CON BUENA CALIDAD	N	%	N	%		
100%	13	22.41	1	1.72	14	24.14
>50%	25	43.10	2	3.45	27	46.55
<50%	6	10.34	1	1.72	7	12.07
0%	10	17.24	0	0.00	10	17.24
TOTAL	54	93.10	4	6.90	58	100

Para la elección del blastocisto apto por el especialista para la transferencia debe tomar en cuenta características morfológicas indicadoras de buena calidad embrionaria, es decir un espermatozoide con las mínimas alteraciones, aunque el ICSI está diseñado precisamente para tratar la presencia de un factor masculino grave (Zulategui *et al.*, 2013). El éxito del embarazo no solo dependerá del estudio espermático externo ya que como lo mencionaron Sakkas *et al.*, (1999), quienes indicaron que los espermatozoides con fragmentación en las cadenas de ADN son normalmente eliminados durante la espermatogénesis, como un mecanismo de control, pero pueden persistir en el eyaculado debido a una falla en el proceso de apoptosis, lo que podría resultar en una fecundación con desarrollo embrionario anormal y posterior muerte del embrión.

3.4 RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS, TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS Y TASA DE BUENA CALIDAD DE BLASTOCISTOS.

3.4.1 RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA TASA DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS INYECTADOS

La evaluación de ovocitos inyectados que fecundaron en más del 50% por cada caso, en el cual se inyectaron espermatozoides de muestras teratozoospermicas son 41 los casos (70.69%), frente a los otros 16 casos (27.59%) fecundados en los que se inyectaron espermatozoides de muestras normales morfológicamente (Tabla 10).

Tabla 10: RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y FECUNDACIÓN DE LOS OVOCITOS INYECTADOS

	MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA			
FECUNDACIÓN	N	%	N	%	N	%
100%	5	8.62	5	8.62	10	17.24
>50%	11	18.97	36	62.07	47	81.03
<50%	0	0.00	1	1.72	1	1.72
0%	0	0.00	0	0.00	0	0.00
TOTAL	16	27.59	42	72.41	58	100

La relación entre la morfología espermática y fecundación de los ovocitos inyectados muestra que no existe diferencia significativa 0.2575 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados, es decir que la morfología espermática no afecta a la fecundación de los ovocitos inyectados en ICSI (Anexo 12).

Los resultados obtenidos (tabla 10) discrepan con Kruger *et al.*, (1988) quienes revelaron que la tasa de fertilización *In vitro* para muestras seminales con teratozoospermia fue del

7,6% y 63% cuando la morfología era mayor a 14% de formas normales, diferenciándose del presente estudio con ICSI en 72.41%.

En base a los resultados obtenidos se puede deducir que a partir del tercer día se puede observar con más claridad el efecto que tiene el ADN espermático en la formación de los embriones corroborándose con el trabajo de Tesarik (2005), quien manifiesta las deficiencias nucleares de los espermatozoides generalmente no se detectan antes de la etapa de desarrollo de embriones de 8 células, cuando ha comenzado una expresión importante de los genes derivados de espermatozoides.

3.4.2 RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA TASA DE DESARROLLO DE BLASTOCISTOS

De la tabla 11 se observa que los ovocitos inyectados por caso llegaron a desarrollarse hasta el estadio de blastocistos en más del 50% por caso evaluado, en 17 casos (29.31%) (7 casos normales y 10 casos alterados); en 37 casos (63.79%), (8 normales y 29 alterados), se logró menos del 50% del desarrollo de blastocistos por caso.

Tabla 11: RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y DESARROLLO A BLASTOCISTOS DE LOS OVOCITOS INYECTADOS POR CASO.

	MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA		N	%
DESARROLLO A BLASTOCISTOS	N	%	N	%		
100%	0	0.00	0	0.00	0	0.00
>50%	7	12.07	10	17.24	17	29.31
<50%	8	13.79	29	50.00	37	63.79
0%	1	1.72	3	5.17	4	6.90
TOTAL	16	27.59	42	72.41	58	100

La relación entre la morfología espermática y desarrollo a blastocistos muestra que no existe diferencia significativa 0.0833 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados, es decir que la morfología espermática no afecta al desarrollo de blastocistos en ICSI, sin

embargo, al 92% de significancia si se aceptó la hipótesis acerca de la relación entre los tratamientos antes mencionados 0.0833 ($P < 0.02$), lo que quiere decir que la morfología espermática si afecta al desarrollo de blastocistos en ICSI al 92% de significancia (Anexo 13).

Burga (2016) afirman en sus resultados que la morfología y motilidad son predictores importantes de la fertilidad concordando de esta manera con el presente estudio en el cual la morfología espermática afecta a la cantidad de blastocistos desarrollados a partir de los ovocitos inyectados, coincidiendo también con Martínez *et al.*, (2013) quienes indicaron que los espermatozoides con una forma ligeramente anormal pueden carecer de la capacidad fecundante, registrándose una disminución de las tasas de gestación en función de los porcentajes de espermatozoides anormales, mencionaron también que los distintos tipos de factores físicos, químicos y ambientales pueden afectar a la funcionalidad espermática y por ende, a las características morfológicas; por ello el análisis de la morfología podría ser un indicador del estilo de vida, riesgos ocupacionales o factores medioambientales.

En los procedimientos de ICSI una de las características más importantes es la morfología espermática, ya que según esta se selecciona al espermatozoide ideal que posteriormente se inyectará tal como lo consideran Ombelet *et al.*, (1995) quienes indican que la morfología estricta tiene una importante relevancia clínica, al punto tal que se le considero como un biomarcador de la capacidad fecundante *in vivo* e *In vitro*, independiente de la motilidad y la concentración, he ahí la incidencia por un diagnostico espermatobioscópico asertivo.

3.4.3 RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA DE BUENA CALIDAD EMBRIONARIA.

En la relación entre la morfología espermática y la buena calidad de blastocistos de los ovocitos inyectados por caso (Tabla 12), se observa que, los blastocistos que se desarrollaron hasta alcanzar una buena calidad, en un número mayor al 50% de los ovocitos inyectados con semen morfológicamente normal corresponden a 10 casos

(17.24%) frente a los 17 (29.31%) casos en los que se inyectaron espermatozoides con morfología alterada; y 1 caso (1.72%) en el que los blastocistos se desarrollaron en una buena calidad en menos del 50% de los ovocitos inyectados por caso frente a los 5 casos (8.62%), en los que se inyectaron con espermatozoides con diagnóstico de morfología espermática alterada.

Tabla 12: RELACIÓN ENTRE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA Y LA BUENA CALIDAD DE LOS BLASTOCISTOS DEL TOTAL DE OVOCITOS INYECTADOS POR CASO.

	MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA				TOTAL	
	NORMAL		ALTERADA			
BUENA CALIDAD DE BLASTOCISTOS	N	%	N	%	N	%
100%	2	3.45	13	22.41	15	25.86
>50%	10	17.24	17	29.31	27	46.55
<50%	1	1.72	5	8.62	6	10.34
0%	3	5.17	7	12.07	10	17.24
TOTAL	16	27.59	42	72.41	58	100

Los resultados del análisis de varianza de la correlación estudiada, demuestra que la relación entre la morfología espermática y desarrollo a blastocistos muestra que no existe diferencia significativa 0.6844 ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados, es decir que la morfología espermática no afecta al desarrollo de blastocistos en ICSI (Anexo 14)

En el presente trabajo se comprobó que no existe una diferencia significativa ($P>0.05$) entre los tratamientos estudiados, sin embargo al 92% de significancia, se observó que la alteración morfológica o teratozoospermia posiblemente influyan en la cantidad de blastocistos que se desarrollan, discrepando con Nagy *et al.*, (1995), quienes mostraron que, no hubo una influencia importante ni del tipo ni del alcance del deterioro del espermatozoide en el resultado de ICSI, donde incluso se diagnosticó astenozoospermia total o teratozoospermia total en la muestra de semen inicial, y se obtuvieron altas tasas de fertilización y embarazo. Empero concordando con Mansour *et al.*, (1995) quienes mencionaron que el resultado de la ICSI no se ve afectado por los diferentes parámetros

del esperma solo si se puede aislar e inyectar un espermatozoide móvil bien formado, ya que el número finalmente necesario para la inyección en la ICSI es muy pequeño.

Por lo expuesto se puede inferir en que la buena calidad embrionaria es uno de los factores más importantes tomados en cuenta para poder transferir un embrión o no a una paciente, pero también les sirve a los embriólogos como predecesor de la calidad del espermatozoide, aunque se sabe que los óvulos reparan hasta cierto punto los defectos que puedan tener los espermatozoides en la fertilización, pero no todos los defectos y más si estos óvulos no tiene una calidad idónea; en el caso del presente estudio se usaron óvulos donados de buena calidad, puede servir también como un predecesor de embriones con presencia de probables aneuploidias, la mala calidad embrionaria probablemente indique que el embrión no desarrollo una buena estructura a causa de algún problema a nivel del ADN esto en pacientes jóvenes de 35 años y con antecedentes de perdida recurrentes del embarazo se sugiere estudios más específicos como el diagnóstico genético preimplantacional (PGD) para poder determinar con exactitud los percances que tendría el futuro blastocisto a transferir, aunque el PGD y sus resultados son éticamente muy cuestionados, son estudios que permiten a las parejas tomar decisiones acerca de su descendencia, no solo elegirán un varón o una mujer (lo cual es importante en el caso de que la pareja tenga antecedentes de enfermedades ligadas a algún cromosoma), sino también porque hasta cierto punto este examen permite determinar algunas enfermedades.

Según los datos del anexo 15, se pudo evaluar en la tabla 13 los diferentes estadíos en diferentes porcentajes de desarrollo y se observó que de los ovocitos inyectados (58 casos), 10 que representan el 17.24%, fecundaron el 100% los ovocitos donados designados para la paciente receptora (Fig. 30), y hubo 0 casos en los que no se observó fecundación. En cuanto al desarrollo de blastocistos (Fig. 31), se observó que, hubo 0 casos en los que estos ovocitos llegaron a ser blastocistos al 100% de ovocitos inyectados por caso, y hubo 4 casos (6.90%), en los que los ovocitos inyectados no llegaron hasta estadio de quinto día y detuvieron su desarrollo.

En el caso de los blastocistos con buena calidad embrionaria (Fig. 32), también se denota que hubo 15 casos (25.86%) en los que llegaron a ser de buena calidad al 100% quiere decir que en este grupo se encuentran solo blastocistos de calidad: BHAA (Blastocisto hatching de calidad AA), BeAA (Blastocisto expandido de calidad AA), BimAA (Blastocisto intermedio de calidad AA), a los que el Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur considera como de calidad top o de alta calidad, ya que podría ser una característica predecesora de una transferencia exitosa y un embarazo clínico que es el objetivo principal de nuestros procedimientos.

Tabla 13: EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN, DESARROLLO DE BLASTOCISTOS Y BUENA CALIDAD EMBRIONARIA DE LOS OVOCITOS EVALUADOS POR CASO.

	OVOCITOS FECUNDADOS		DESARROLLO DE BLASTOCISTOS		BUENA CALIDAD EMBRIONARIA	
	N	%	N	%	N	%
DESARROLLADOS						
100%	10	17.24	0	0	15	25.86
>50%	47	81.03	20	34.48	27	46.55
<50%	1	1.72	34	58.62	6	10.34
0%	0	0	4	6.90	10	17.24
TOTAL	58	100.00	58	100.00	58	100.00

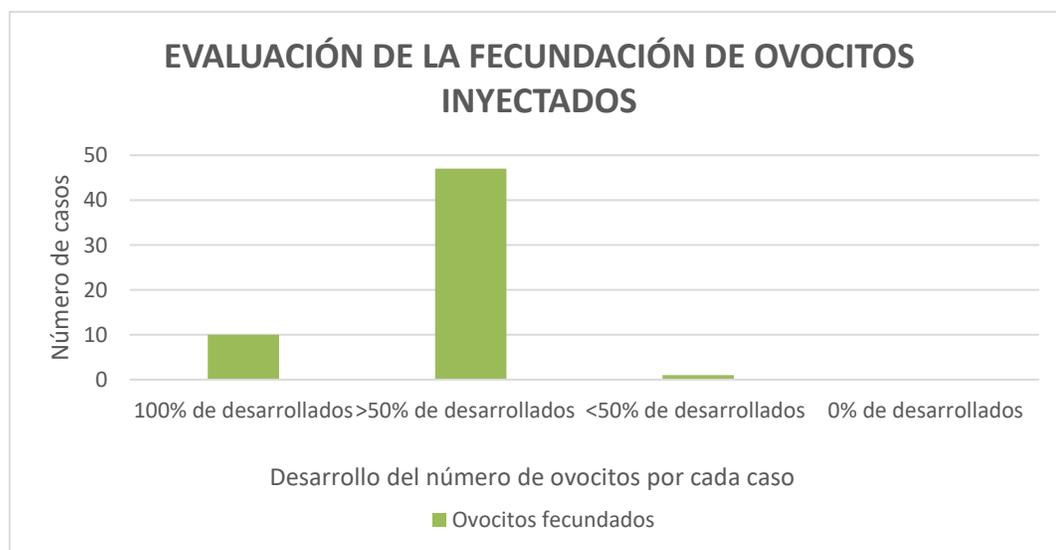


FIGURA 30: Evaluación de la fecundación de los ovocitos inyectados mediante ICSI.

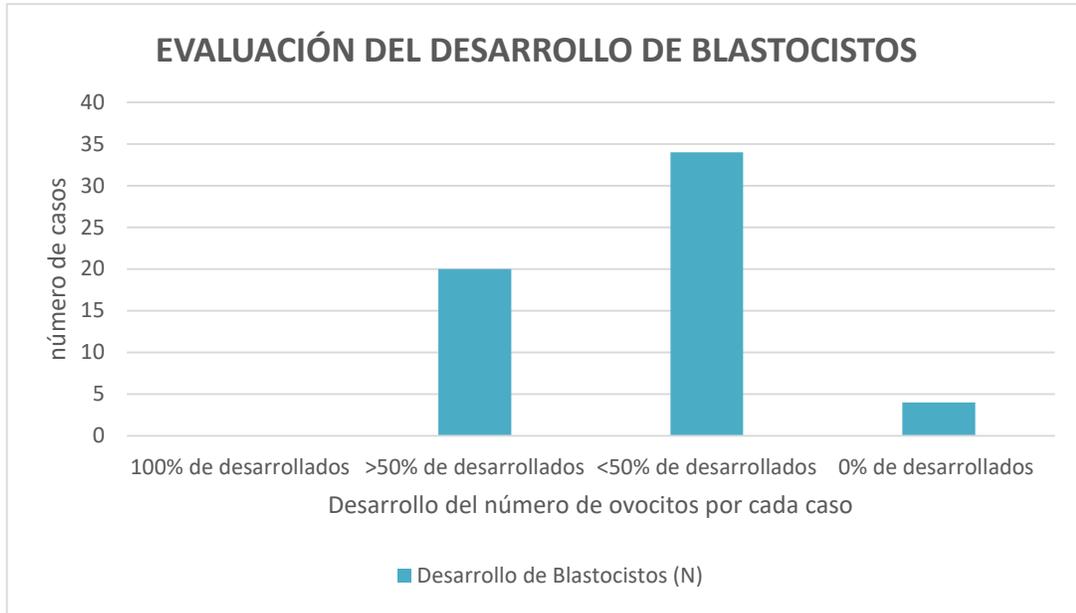


FIGURA 31: Evaluación del desarrollo de blastocistos según el porcentaje de desarrollados en cada caso (N).

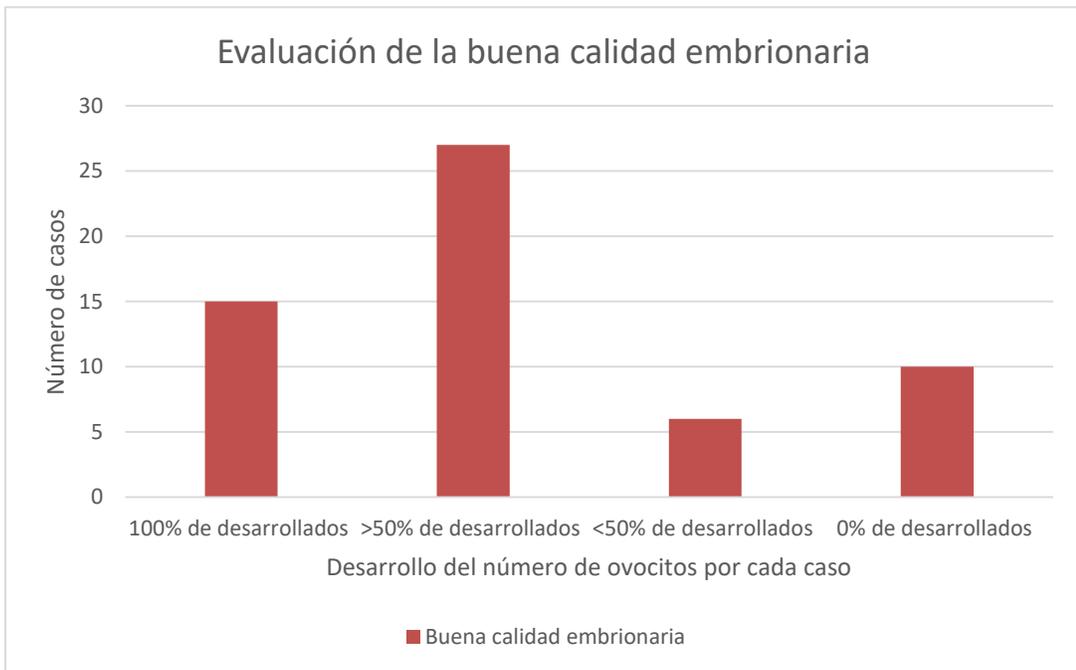


FIGURA 32: Evaluación de la buena calidad embrionaria.

CONCLUSIONES

Se evaluaron tres características espermáticas (morfología, motilidad y concentración) mediante espermatobioscopia, siendo prevalente la alteración morfológica (teratozoospermia), que representa el 72.41% del total de muestras evaluadas. Así también se observó que la alteración con menor prevalencia es la de la concentración espermática (oligozoospermia), representando el 6.9% del total de las muestras evaluadas.

Se comprobó que en la relación entre la motilidad espermática con las tasas de fecundación, desarrollo de blastocistos y buena calidad embrionaria, no existe diferencia significativa según el estudio de regresión lineal al 95% de significancia por el cual se deduce que la motilidad espermática no afecta a la fecundación, desarrollo de blastocistos y buena calidad embrionaria.

La relación entre la concentración espermática con la tasa de fecundación, desarrollo de blastocistos y buena calidad blastocitaria, se determinó que no existe diferencia significativa al 95% entre los tratamientos mencionados, mediante el análisis de regresión lineal, determinándose el valor de P que es 0.9582, 0.700 y 0.213 respectivamente.

Se determinó que en la relación entre los tratamientos morfología espermática y fecundación, desarrollo blastocistos y buena calidad embrionaria, no existe diferencia significativa al 95%. Sin embargo la relación entre los tratamientos morfología espermática y desarrollo de blastocistos, resultó que si existe diferencia significativa al 92% según el análisis de regresión lineal.

RECOMENDACIONES

- Considerar que las muestras espermáticas que serán usadas netamente en ICSI, sean tratadas en un máximo de 15 minutos, ya que las muestras podrían sufrir alteraciones físicas y químicas.
- Insistir en el aseo personal de los pacientes que ingresaran a emitir la muestra, pues una contaminación en la muestra sería muy perjudicial para el procedimiento.
- Complementar el estudio del espermatozoide con otros exámenes como el de fragmentación de ADN espermático y el estudio bacteriológico del semen, sobre todo en pacientes con exámenes espermatozoides alterados.
- Difundir mediante campañas médicas la importancia de exámenes, como la espermatozoides en varones y la exploración intravaginal realizado por un ginecólogo especialista, que promuevan la importancia de la salud sexual, sobre todo en pacientes jóvenes a partir de los 18 años.
- Complementar el presente estudio relacionando las características espermatozoides estudiadas con la implantación embrionaria, embarazo clínico y nacido vivo.
- Motivar la fluidez de comunicación entre el clínico y el biólogo, para complementar conocimientos y poder brindar el tratamiento adecuado a las parejas que acuden a realizarse tratamientos de fertilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahumada, A., Brugo, S., Liebermann, J., Mauri, A., Medina, R., Posada, N., . . . Staessen, C. (2006). Manual de Procedimientos. Laboratorio de reproducción asistida. *Red latinoamericana de reproducción asistida*.
- ASEBIR . (2015). *Cuaderno de Embriología clínica*. Madrid: Gobalo.
- Bajo, M., & Coroleu, B. (2009). *Fundamentos de reproducción*. España: Panamericana.
- Bernal, G. (2015). Evaluación de lateraciones por espermatobioscopia y factores macroscópicos de semen humano de pacientes que acuden al Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur . *Seminario de investigación. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco* .
- Bestard, J., Orobitg, G., Ribot, J., & Salazar, C. (2003). *Parentesco y Reproducción Asistida: cuerpo, persona y relaciones* . Barcelona : Publicacions de la universitat de Barcelona .
- Bhavni, S., Suchil, S., & Pankaj, C. (2014). Study of human sperm motility post criopreservation. *Medical journal armed forces India, 70(4)*, 349-353.
- Burga, L. (2016). Evaluación de la calidad seminal en pacientes con problemas de fertilidad del Centro de Reproducción Humana de Lima (NACER). *UNIVERSIDAD RICARDO PALMA .Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología* .
- Carballo, E., Campos, J., Heidy, O., & Kably, A. (2011). Comparación de tres métodos de capacitación espermática para ICSI en pacientes con morfología anormal. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción, 4(2)*, 68-71.
- Chatzimeletiou, K., & Rutherford, A. (2007). Is the sperm centrosome to blame for the complex polyploid chromosome patterns observed in cleavage stage embryos from an OAT patient? *Zygote, 15(1)*, 81-90.
- Collodel, G., Capitani, S., Baccetti, B., Pamolli, A., & Moretti, E. (2007). Sperm aneuploidies and low progressive motility. *Human reproduction, 22(7)*, 1893-1898.
- Cooper, T. N., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H., Haugen, T., Kruger, T., . . . Volgelson, K. (2010). World Health Organization reference values of human semen characteristics. *Human reproduction, 16(3)*, 231-245.

- Cortés, J. L., Ligeró, G., Sánchez, L., Nieto, A., Bueno, C., Montes, R., & Menéndez, P. (2008). CRITERIOS DE VALORACIÓN MORFOLÓGICOS DE OOCITOS, PREEMBRIONES TEMPRANOS Y BLASTOCISTOS HUMANOS PROPUESTOS POR ASEBIR. *ASEBIR*.
- Cortés, M., Carrera, B., Hauyón, R., & Aravena, C. (2014). *El moco cervical en la fisiología reproductiva*. Santiago de Chile: Publiimpacto.
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. . *Advances in Urology* , 1-12.
- ESHRE, Capri Workshop Group. (2007). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: evidence and evolution. *Human reproduction*, 13(6), 515-526.
- Gamiz, P., De los Santos, M., Romero, L., & Perez, S. (2013). Valoración de la fecundación . En J. Remohi, A. Cobo, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana: Laboratorio de reproducción asistida* (págs. 185-193). Madrid : Panamericana.
- Gilbert, S. (2005). *Biología del desarrollo*. Buenos Aires : Panamericana .
- Gill, A., Cardona, D., & Cadavid, A. (2007). Muerte embrionaria temprana ¿Tiene influencia el factor masculino? *Urología experimental e investigación*, 60(9).
- Hirsch, I., Gibbons, W., Lipshultz, L., Rossavik, K., Young, R., Poindexter, A., . . . Findley, W. (1986). *In vitro* fertilization in couples with male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 45(5), 659-664.
- Kruger, T., Acosta, A., Simmons, K., Swanson, R., & Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in IVF. *Fertility and Sterility*, 49(1).
- Linares, R. (2016). Crecimiento, maduración y fecundación del ovocito. *Valdecasas Universidad Rey Juan Carlos. Master en Reproducción Humana* .
- Mansour, R., Aboulghar, M., Serour, G., Amin, Y., & Ramzi, A. (1995). The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 64(5).
- Martinez, J., & Gil, M. (2012). Valoración del Semen . En A. Remohi, B. Jose, R. B. Matorras, & A. Pellicer, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos clínicos* (págs. 39-46). Madrid: Médica Panamericana.
- Martinez, J., Amarocho, B., & Marcos, J. G. (2013). Morfología espermática. En A. Ramohi, A. Cobo, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual práctico de*

- esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida* (págs. 13-17). Madrid: Panamericana.
- Mercader, A., Buendía, P., & Delgado, A. (2013). Valoración morfológica de blastocisto. En A. Remohi, A. Cobo, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida* (págs. 217-221). Madrid: Panamericana.
- Mercan, R., Lanzendorf, S., Mayer, J., Nassar, J., & Muasher, S. (2009). The outcome of clinical pregnancies following intracytoplasmic sperm injection is not affected by semen quality. *First international journal of Andrology*, 30(2).
- Mollá, M., Pabón, D., Ojeda, M., Martínez, E., Muñoz, E., & Pellicer, A. (2013). Examen del semen fresco. En A. Remohi, A. Cobo, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida* (págs. 1-10). Madrid: Panamericana.
- Nagy, Z., Verheyen, G., Tournaye, H., Camus, M., Derde, M., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (1995). The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Human reproduction*, 10(5), 1123-1129.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4).
- Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T., & Steeno, O. (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human reproduction*, 1(6), 543-557.
- Palma, C., & Vinay, J. (2014). Infertilidad masculina. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(1), 122-128.
- Pehlivan, T. (2013). Clasificación del complejo corona-cúmulo-ovocito. En A. Remohi, C. Cobo, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida* (págs. 115-119). Madrid : Médica Panamericana.
- Pella, R., & Bartolo, L. (2013). Manual de procedimientos del laboratorio de Embriología. *Laboratorio de Embriología. Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur* .
- Pollard, J., Plante, C., King, W., Hansen, P., Betteridge, K., & Suarez, S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells . *Biology reproductive* .

- Remohi J., Cobo A., Prados N., Romero J., Pellicer A. (2013). *Manual practico de esterilidad y reproduccion humana. Laboratorio de reproducción asistida*. Madrid: Panamericana.
- Romero, L., Gámiz, P., Florensa, M., Remohi, J., & De los Santos, M. (2013). Morfología ovocitaria y su distribución en pacientes sometidas a estimulación ovárica. En A. Remohi, A. Cristina, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana, Laboratorio de reproducción asistida* (págs. 122-128). Madrid: Panamericana.
- Ruiz, M., Vime, J., Garcia, J., Hernández, J., Crespo, M., & Prados, N. (2012). Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente . En M. p. asistida, *Remohi, Alejandro; Cobo, Cristina; Prados, Nicolas; Romero, Josep; Pellicer, Antonio* (págs. 175-176). Madrid : Panamericana .
- Sakkas, D., Mariethoz, E., & John, S. (1999). Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Experimental Cell Research, 251*(2).
- Sanchez, E., Olaez, J., Ávila, A., López, L., & Sanchez, S. (2014). Alteraciones en el semen de pacientes con problemas de infertilidad . *iMedPub Journals* .
- Sanchez, P., Pastor, L., & Sánchez, M. (1999). Situación actual de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): Principales dilemas éticos. *Cuadernos de bioética* .
- Selles, E., Salinas, N., Losa, B., Palomares, M., & Muñoz, M. (2012). Capacitación espermática . En A. Remohi, A. Cobo, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual Práctico de esterilidad y reproducción asistida, laboratorio de reproducción asistida* (págs. 21-22). Madrid: Panamericana.
- Shen, S., Khabani, N., & Battaglia, D. (2003). Statistical analysis of factors affecting fertilization rates and clinical outcome associated with intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Esterility, 79*(2), 355-360.
- Strassburger, D., Friedler, S., Raziel, A., Schachter, M., Kasterstein, E., & Ron-El, R. (2000). Very Low Sperm Count Affects the Result of Intracytoplasmic Sperm Injection. *Journal Assisted Reproduction genetic, 17*(8), 431-436.
- Suarez, S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal of Developmental Biology, 52*(5-6).

- Tesarik, J. (2005). Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproductive biomedicine online*, 10(3), 3.
- Urbina, M., & Lerner, J. (2008). *Fertilidad y Reproducción Asistida*. Caracas: Panamericana.
- Van Der Westerlaken, L., Naaktgeboren, N., Verburg, H., Dieben, S., & Helmerhorst, F. (2006). Conventional *In vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertility and Sterility*, 85(2), 395-400.
- Van Rumste, M., Evers, J., & Farcquha, C. (2000). Intracytoplasmic sperm injection versus partial zona dissection, subzonal insemination and conventional techniques for oocyte insemination during *In vitro* fertilisation . *Cochrane Database system*.
- Van Uem, J., Acosta, A., Swanson, J., Mayer, J., Ackerman, S., Burkman, L., . . . Jones, H. (1985). Male factor evaluation in *In vitro* fertilization: Norfolk experience. *Fertility and Sterility*, 44(3), 375-383.
- Vigil, P., Rubio, V., Prado, S., Socías, T., Salgado, A., & Morales, P. (1994). Migration of human sperm through the Fallopian tube *In vitro* . *Fertility and Sterility*, 19-30.
- Vigil, P., Salgado, A., & Cortés, M. (2012). Ultrastructural interaction between spermatozoon and human oviductal cells *In vitro*. *Journal of Electron Microscopy*, 61(2), 123.
- Vigil, P., Valdés-Undurraga, I., Del Rio, J., & Cortés, M. (2015). Sperm transport through the female reproductive tract. *International journal of medical and surgical sciences*, 2(4).
- WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*. Switzerland: Geneva 27.
- Zulategui, J., Cobo, A., & Remohí, J. (2013). Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides . En J. Remohi, A. Cobo, N. Prados, J. Romero, & A. Pellicer, *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de esterilidad y reproducción asistida*. (pág. 155). Madrid : Panamericana .

ANEXOS

ANEXO 1

LUGAR DE EVALUACIÓN: CENTRO DE FERTILIDAD Y GINECOLOGÍA DEL SUR



FIGURA 33: Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur

ANEXO 2
EXAMEN ESPERMATOBIOSCOPIA



FIGURA 34: Llevar la muestra de semen a la incubadora 37 °C.

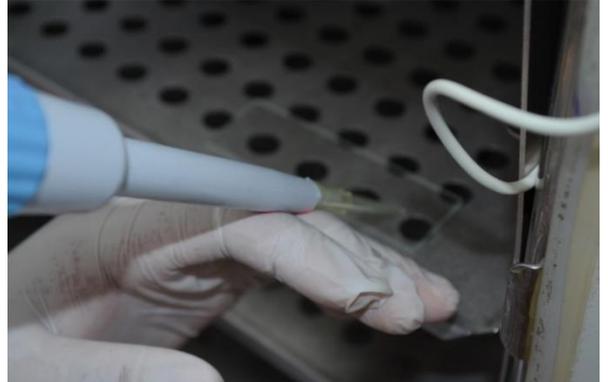


FIGURA 35: Preparación de la placa para analizar la motilidad.

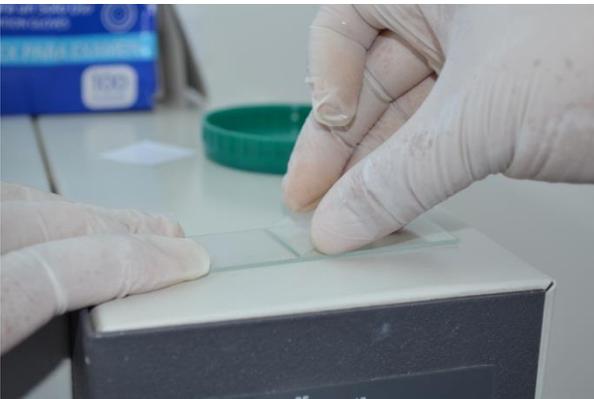


FIGURA 37: Se realiza un frotis a la muestra de semen para evaluar la morfología.



FIGURA 36: Preparación de la cámara Neubauer para evaluar la concentración espermática.



FIGURA 38: Tinción de la placa



FIGURA 39: Se llevan las placas al microscopio para su observación.

ANEXO 3

OBSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

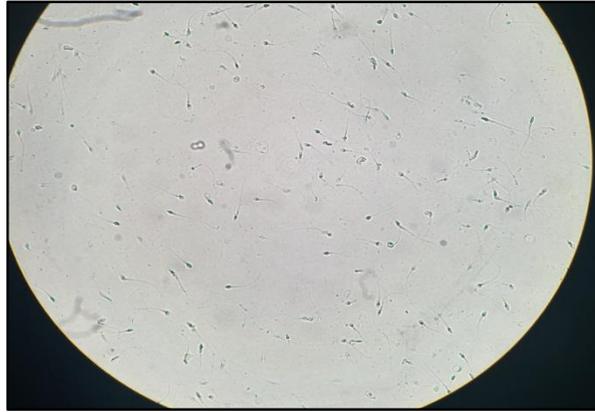


FIGURA 40: Evaluación de la motilidad espermática. (400X)

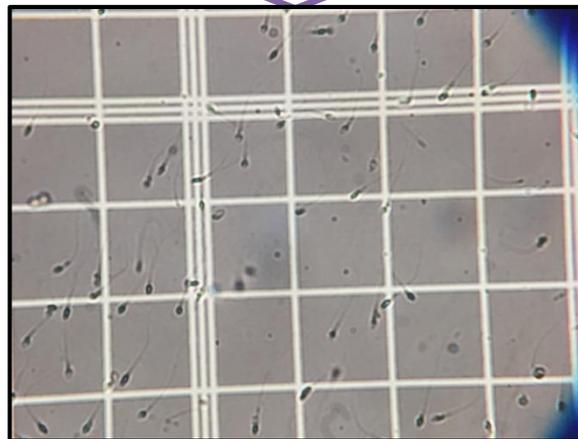


FIGURA 41: Evaluación de la concentración espermática. (400X)

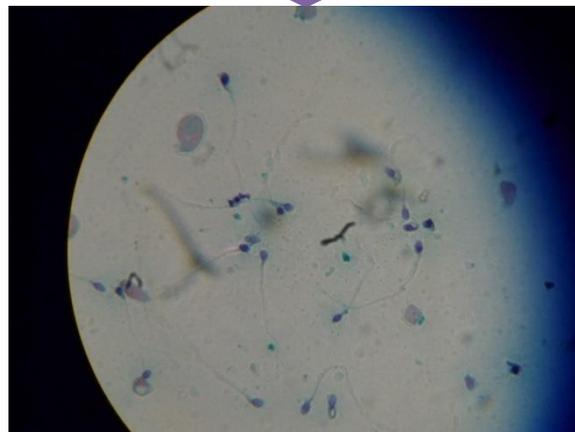


FIGURA 42: Evaluación de la morfología espermática. (1000X)

CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA



FIGURA 43: Se mantiene la muestra de semen en la incubadora a 37 °C.



FIGURA 44: Atemperar los tubos contenidos de los gradientes y el medio de lavado.



FIGURA 46: Se atemperan los materiales fungibles para realizar el procedimiento.



FIGURA 45: Se rotulan los tubos con el nombre de los pacientes.



FIGURA 47: Se prepara el tubo con los gradientes y el medio de cultivo.



FIGURA 48: Se llevan a la incubadora todos los tubos preparados.



FIGURA 49: Los tubos se mantienen en la incubadora a 37 °C.



FIGURA 50: El rango de tiempo en el que se encontraran en la incubadora será de 10 minutos



FIGURA 52: Se extraen 10 microlitros de la muestra



FIGURA 51: Se colocan 10 microlitros de la muestra en la cámara Makler



FIGURA 53: Colocar el cubre de la cámara



FIGURA 54: Llevar la cámara Makler al microscopio para la evaluación de la muestra

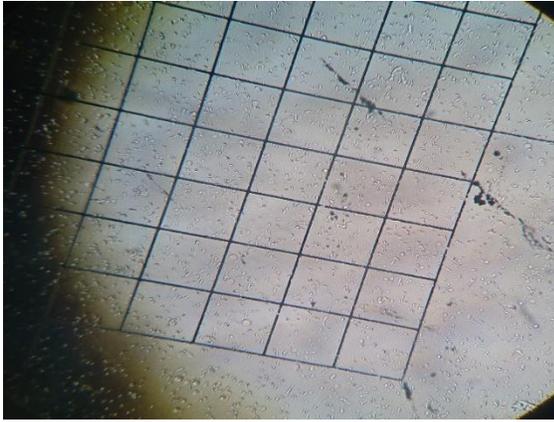


FIGURA 55: Contar la cantidad de espermatozoides motiles pre capacitación espermática (200 X).

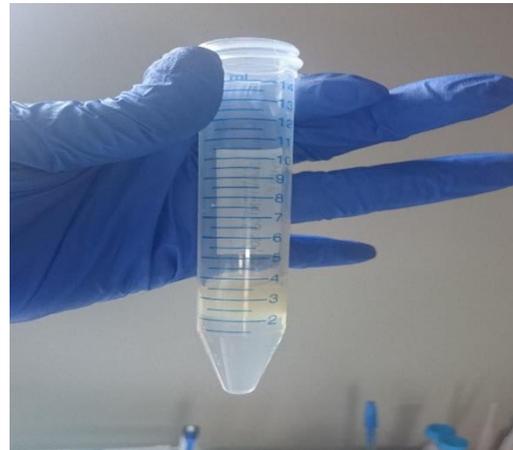


FIGURA 56: Verter la muestra seminal en el tubo con los gradientes de densidad y centrifugar.

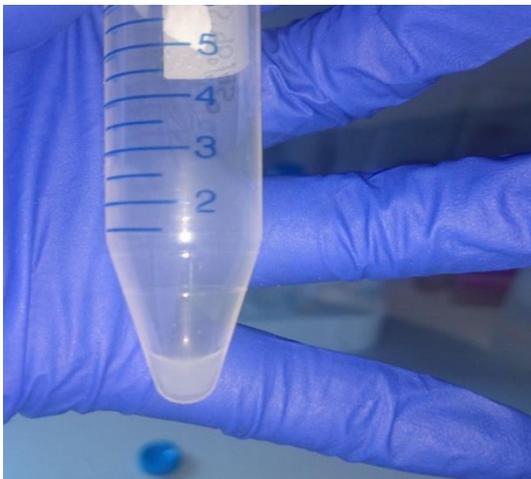


FIGURA 58: Descartar el sobrenadante y dejar solamente la muestra decantada.



FIGURA 57: Descartar el sobrenadante y dejar solamente la muestra decantada.

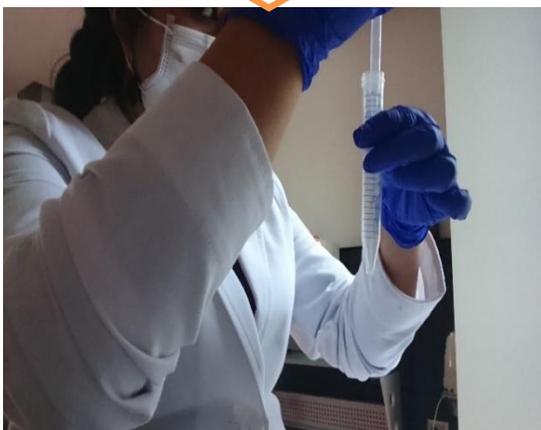


FIGURA 59: Sacar la muestra del fondo del tubo cónico con una pipeta de plástico estéril.

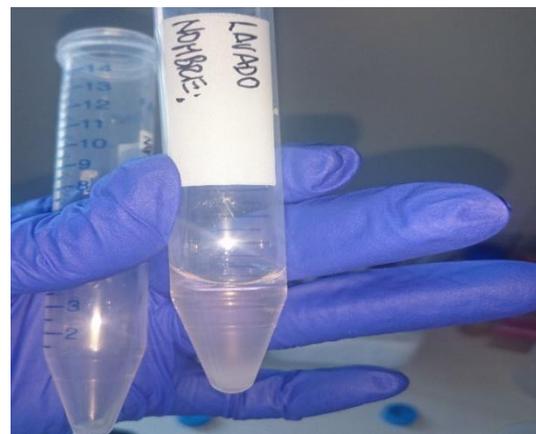


FIGURA 60: Trasladar la muestra al tubo contenido del medio de lavado.



FIGURA 61: Centrifugar, descartar el sobrenadante hasta dejar una pequeña cantidad en el tubo por encima de la, sacar 10 microlitros de la superficie y verterla en la cámara Makler.

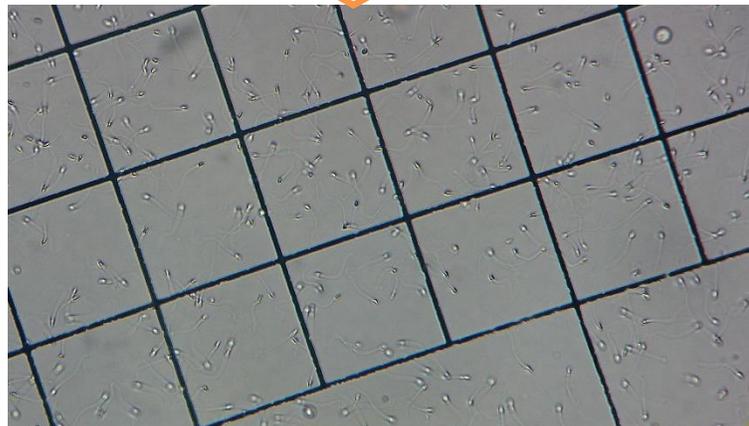


FIGURA 62: Evaluar la muestra en la cámara Makler post capacitación espermática (400X).

ANEXO 5

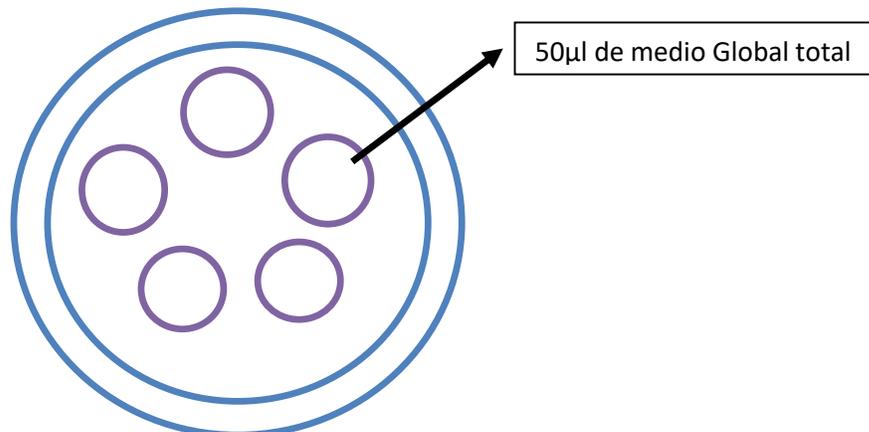
INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA



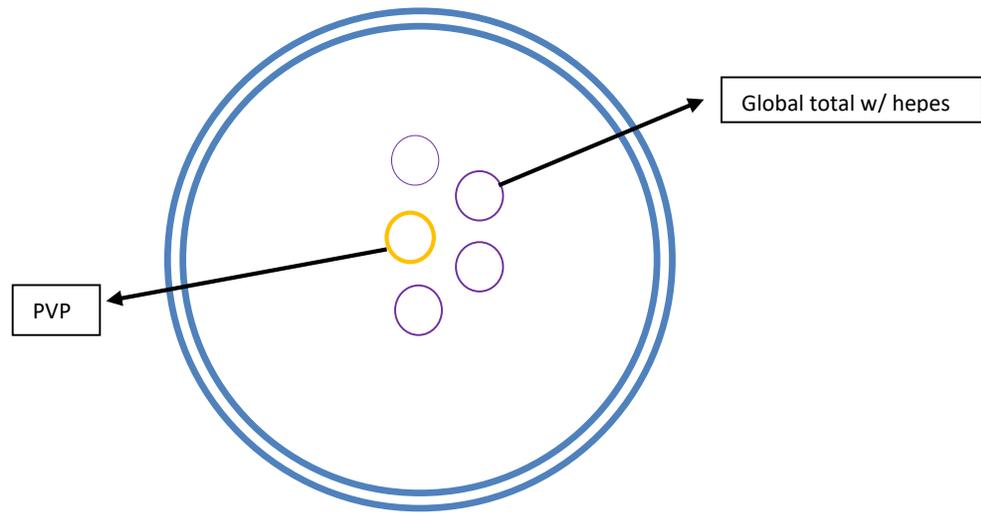
FIGURA 63: Preparar las placas de cultivo en la cámara



- Preparación de la placa de cultivo



- Preparación de la placa de inyección



- Placa para inyección intracitoplasmática de espermatozoides

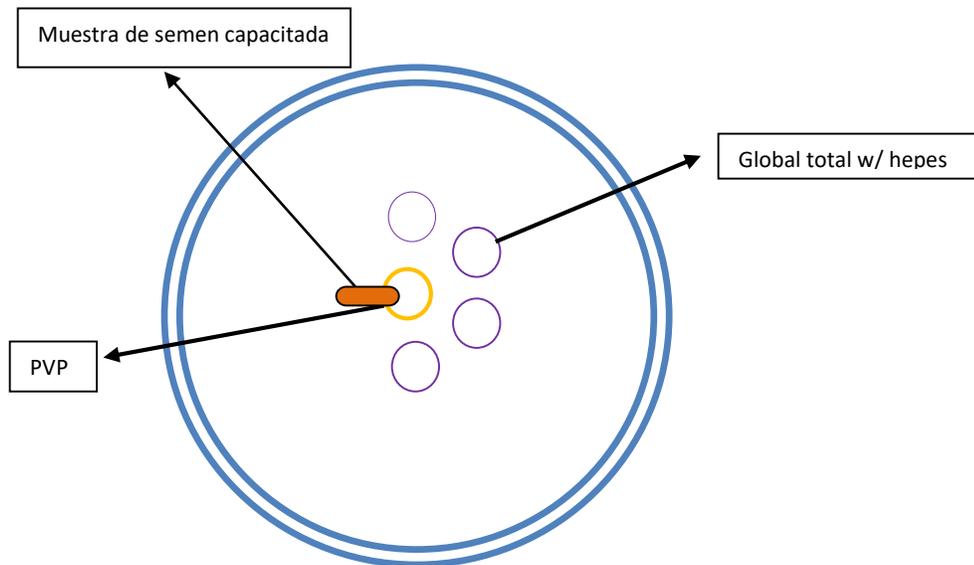




FIGURA 64: Observación de las agujas de microinyección.

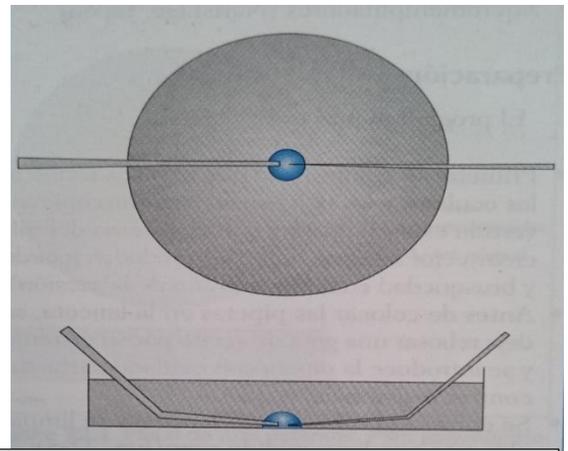


FIGURA 65: Preparación de las agujas de microinyección.



FIGURA 67: Traslado de los ovocitos inyectados a la placa de cultivo

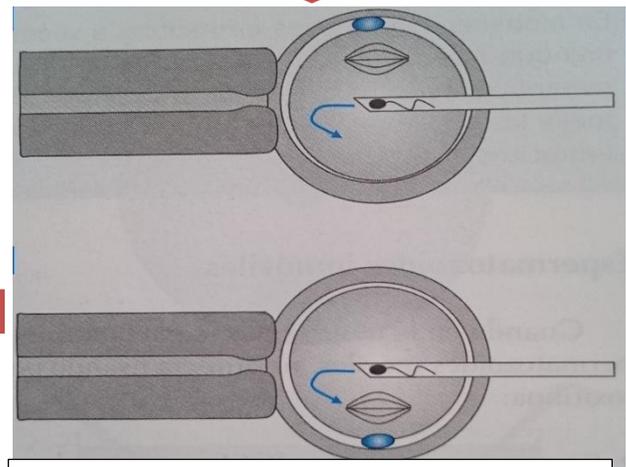


FIGURA 66: Se inyectaran los espermatozoides en los óvulos donados.

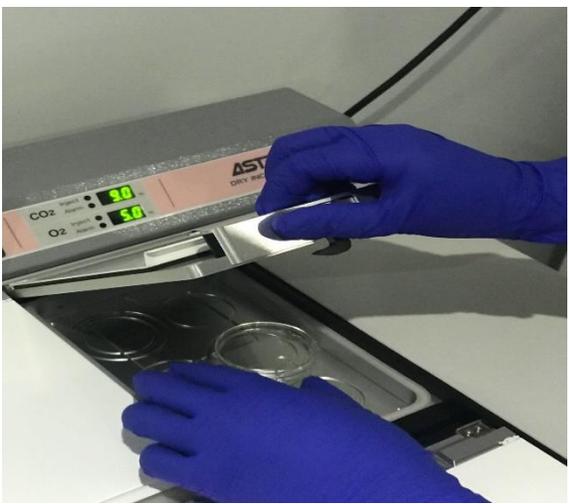


FIGURA 68: Traslado de las placas de cultivo a la incubadora

ANEXO 6

Regresión Simple - Motilidad espermática vs. Ovocitos fecundados

Variable dependiente: Motilidad espermática

Variable independiente: Ovocitos fecundados

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	39.1163	11.107	3.52177	0.0009
Pendiente	0.0182778	0.133191	0.137229	0.8913

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	3.47522	1	3.47522	0.02	0.8913
Residuo	10334.2	56	184.539		
Total (Corr.)	10337.7	57			

Coefficiente de Correlación = 0.018335

R-cuadrada = 0.0336171 %

Motilidad espermática = 39.1163 + 0.0182778 * Ovocitos fecundados

ANEXO 7

Regresión Simple - Motilidad espermática vs. Desarrollo de blastocistos

Variable dependiente: Motilidad espermática

Variable independiente: Desarrollo de blastocistos

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	40.0489	3.86255	10.3685	0.0000
Pendiente	0.0143633	0.0860573	0.166904	0.8680

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	5.13989	1	5.13989	0.03	0.8680
Residuo	10332.5	56	184.509		
Total (Corr.)	10337.7	57			

Coeficiente de Correlación = 0.022298

R-cuadrada = 0.0497201 %

Motilidad espermática = 40.0489 + 0.0143633*Desarrollo de blastocistos.

ANEXO 8

Regresión Simple - Movilidad espermática vs. Buena calidad embrionaria

Variable dependiente: Movilidad espermática

Variable independiente: Tasa de buena cal. embrionaria

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	41.2044	3.38582	12.1697	0.0000
Pendiente	-0.0102928	0.0507527	-0.202803	0.8400

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	7.58687	1	7.58687	0.04	0.8400
Residuo	10330.1	56	184.466		
Total (Corr.)	10337.7	57			

Coeficiente de Correlación = -0.0270907

R-cuadrada = 0.0733906 %

Movilidad espermática = 41.2044 - 0.0102928*Buena calidad embrionaria

ANEXO 9

Regresión Simple - Concentración espermática vs. Ovocitos fecundados

Variable dependiente: Concentración espermática

Variable independiente: Ovocitos fecundados

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	44.9067	24.012	1.87017	0.0667
Pendiente	0.0151686	0.287944	0.0526791	0.9582

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2.39347	1	2.39347	0.00	0.9582
Residuo	48299.2	56	862.486		
Total (Corr.)	48301.6	57			

Coeficiente de Correlación = 0.00703936

R-cuadrada = 0.00495527 %

Concentración espermática = 44.9067 + 0.0151686*Ovocitos fecundados

ANEXO 10

Regresión Simple - Concentración espermática vs. Desarrollo de blastocistos

Variable dependiente: Concentración espermática

Variable independiente: Desarrollo de blastocistos

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	49.0204	8.34009	5.87768	0.0000
Pendiente	-0.0719691	0.185817	-0.387313	0.7000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	129.043	1	129.043	0.15	0.7000
Residuo	48172.6	56	860.224		
Total (Corr.)	48301.6	57			

Coeficiente de Correlación = -0.0516876

R-cuadrada = 0.267161 %

Concentración espermática = 49.0204 - 0.0719691*Desarrollo de blastocistos.

ANEXO 11

Regresión Simple - Concentración espermática vs. Buena calidad embrionaria

Variable dependiente: Concentración espermática

Variable independiente: Buena calidad embrionaria

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	38.4265	7.21987	5.32232	0.0000
Pendiente	0.13629	0.108224	1.25933	0.2131

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1330.22	1	1330.22	1.59	0.2131
Residuo	46971.4	56	838.775		
Total (Corr.)	48301.6	57			

Coeficiente de Correlación = 0.165952

R-cuadrada = 2.75399 %

Concentración espermática = 38.4265 + 0.13629*Buena calidad embrionaria

ANEXO 12

Regresión Simple - Morfología espermática vs. Ovocitos fecundados

Variable dependiente: Morfología espermática

Variable independiente: Ovocitos fecundados

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	1.11891	1.51312	0.739469	0.4627
Pendiente	0.0207594	0.0181449	1.14409	0.2575

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	4.48294	1	4.48294	1.31	0.2575
Residuo	191.793	56	3.42487		
Total (Corr.)	196.276	57			

Coeficiente de Correlación = 0.151129

R-cuadrada = 2.284 %

Morfología espermática = 1.11891 + 0.0207594*Ovocitos fecundados

ANEXO 13

Regresión Simple - Morfología espermática vs. Desarrollo de blastocistos

Variable dependiente: Morfología espermática

Variable independiente: Desarrollo de blastocistos

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	2.01725	0.518172	3.89301	0.0003
Pendiente	0.0203543	0.0115448	1.76307	0.0833

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	10.3218	1	10.3218	3.11	0.0833
Residuo	185.954	56	3.32061		
Total (Corr.)	196.276	57			

Coeficiente de Correlación = 0.229322

R-cuadrada = 5.25884 %

Morfología espermática = 2.01725 + 0.0203543*Desarrollo de blastocistos

ANEXO 14

Regresión Simple - Morfología espermática vs. Buena calidad embrionaria

Variable dependiente: Morfología espermática

Variable independiente: Tasa de buena cal. embrionaria

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	2.66572	0.466015	5.72024	0.0000
Pendiente	0.00285447	0.00698545	0.40863	0.6844

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.583509	1	0.583509	0.17	0.6844
Residuo	195.692	56	3.49451		
Total (Corr.)	196.276	57			

Coeficiente de Correlación = 0.0545243

R-cuadrada = 0.29729 %

Morfología espermática = 2.66572 + 0.00285447*Buena calidad embrionaria

ANEXO 15

BASE DE DATOS DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS, OVOCITOS INYECTADOS POR PACIENTE, FECUNDACIÓN, DESARROLLO DE BLASTOCISTOS, BUENA Y MALA CALIDAD DE BLASTOCISTOS.

N°	Características espermáticas			Ovos inyectados	Ovos fecundados	Tasa de ovocitos fecundados	Desarrollo de blastocistos	Tasa de desarrollo de blastocistos	Buena calidad de blastocistos	Calidad embrionaria en %	Buena calidad de blastocistos	Mala calidad de blastocistos
	Motilidad	Concentración	Morfología									
1	47	83	6	10	8	80.00	4	40.00	2	50.00	BeAA,BeAA	BeAB,BimAB
2	52	67	5	10	8	80.00	6	60.00	3	50.00	BeAA,BeAA,BimAA	BimBB,BimAB,BinAA
3	24	22	2	10	9	90.00	5	50.00	5	100.00	BeAA,BeAA, BeAA,BeAA,BeAA	
4	35	63	5	10	9	90.00	4	40.00	3	75.00	BeAA,BeAA,BeAA	BimBB
5	37	64	1	11	7	63.64	4	36.36	4	100.00	BeAA,BeAA, BimAA,BimAA	
6	42	32	7	10	10	100.00	8	80.00	4	50.00	BeAA,BeAA,BeAA,BeAA	BhBA,BeBA,BimAB,BeAB
7	54	68	3	8	6	75.00	3	37.50	3	100.00	BeAA,BeAA, BeAA	
8	64	47	2	8	7	87.50	2	25.00	1	50.00	BimAA	BimBA
9	44	116	2	9	8	88.89	2	22.22	2	100.00	BeAA,BeAA	
10	45	80	0	10	9	90.00	4	40.00	2	50.00	BeAA,BeAA	BeAC,BeAB
11	34	29	3	10	7	70.00	3	30.00	2	66.67	BeAA.BimAA	BeBA
12	56	21	2	11	7	63.64	2	18.18	0	0.00		BeCC,BinCC
13	54	107	4	7	5	71.43	3	42.86	3	100.00	BeAA,BeAA,BimAA	
14	70	66	2	9	6	66.67	3	33.33	2	66.67	BeAA,BeAA	BeBA
15	62	83	5	9	7	77.78	5	55.56	4	80.00	BeAA,BeAA,BeAA,BeAA	BeBB
16	53	48	7	9	9	100.00	5	55.56	4	80.00	BeAA,BeAA,BeAA,BeAA	BeAB
17	34	28	2	10	7	70.00	7	70.00	5	71.43	BeAA,BeAA,BeAA,BeAA,BeAA,	BeBA,BinAA

18	4	3	1	11	7	63.64	2	18.18	1	50.00	BeAA	BeBB
19	36	21	3	11	10	90.91	4	36.36	4	100.00	BeAA, BeAA, BeAA, BeAA	
20	45	68	5	11	10	90.91	10	90.91	8	80.00	BeAA, BHAA, BeAA,BeAA,BeAA,BeAA,BimAA,BeAA	BeAB,BeBA
21	40	28	4	11	11	100.00	9	81.82	6	66.67	BeAA,BeAA,BimAA,,BimAA,,BimAA,BeAA	BimBA,BeBA,BeAB
22	48	147	7	14	12	85.71	8	57.14	8	100.00	BeAA, BeAA,BeAA,BeAA,BeAA,BeAA,BeAA,BeAA	
23	43	54	1	14	13	92.86	4	28.57	2	50.00	BeAA, BeAA	BeBA,BeBA
24	55	53	7	11	9	81.82	6	54.55	5	83.33	BimAA,BeAA,BHAA,BimAA,BeAA	BinAA
25	24	28	2	10	6	60.00	5	50.00	4	80.00	BeAA,BeAA,BeeAA,BeAA	BeBB
26	37	55	3	11	10	90.91	5	45.45	0	0.00		BeAB,BeAB,BeBC,BimAC,BeAC
27	41	61	1	11	10	90.91	6	54.55	3	50.00	BeAA,BeAA,BeAA	BinAB,BinAC,BeCC
28	41	21	3	8	7	87.50	2	25.00	0	0.00		BeAB,BeAC
29	39	58	5	10	10	100.00	6	60.00	2	33.33	BeAA,BeAA	BeAB,BeBB,BeAB,BeBB
30	19	15	2	10	9	90.00	4	40.00	4	100.00	BeAA,BeAA,BeAA,BeAA	
31	54	29	3	10	10	100.00	6	60.00	2	33.33	BeAA,BeAA	BeAB, BimAB,BeBA, BimBB
32	29	16	1	9	8	88.89	4	44.44	0	0.00		BeAB,BimAB,BeAB,BeBC
33	24	4	0	9	9	100.00	7	77.78	1	14.29	BeAA	BimAB,BeAA,BeAB,BeAB,BeAB,BeAB,BeBC
34	21	30	4	10	7	70.00	4	40.00	3	75.00	BeAA,BeAA,BimAA	BimAC
35	35	22	2	10	9	90.00	6	60.00	1	16.67	BeAA	BeAB,BeAB,BeAB,BinBB,,BeAB
36	36	39	0	10	10	100.00	4	40.00	1	25.00	BeAA	BeAB,BeBC,BeAB
37	51	51	5	12	9	75.00	2	16.67	0	0.00		BeAB,BinAA
38	45	66	2	14	12	85.71	2	14.29	1	50.00	BeAA	BeAC
39	56	64	3	17	16	94.12	6	35.29	6	100.00	BHAA,BeAA,BeAA,BeAA,BeAA,BimAA	
40	41	4	2	14	14	100.00	4	28.57	4	100.00	BHAA,BeAA,BimAA,BimAA	
41	47	20	2	7	5	71.43	4	57.14	1	25.00	BHAA	BHBA,BeBA,BHBA
42	41	91	6	6	6	100.00	0	0.00	0	0.00	No llegaron a blastocisto	
43	53	35	2	6	2	33.33	0	0.00	0	0.00	Solo embriones de tercer dia	
44	47	26	3	5	4	80.00	0	0.00	0	0.00	No llegaron a blastocisto	
45	25	87	3	6	4	66.67	0	0.00	0	0.00	Solo embriones de tercer dia	

46	46	17	3	6	4	66.67	4	66.67	2	50.00	BeAA,BeAA	BeBB,BHAB
47	67	11	2	10	8	80.00	4	40.00	2	50.00	BeAA,BeAA	BeBB,BHAB
48	51	30	2	8	8	100.00	2	25.00	2	100.00	BHAA,BHAA	
49	18	28	2	10	9	90.00	3	30.00	3	100.00	BHAA,BeAA,BHAA	
50	19	29	1	15	11	73.33	4	26.67	2	50.00	BHAA,BHAA	BHAB,BeAC
51	37	30	1	12	10	83.33	2	16.67	2	100.00	BeAA,BeAA	
52	38	23	2	7	6	85.71	2	28.57	1	50.00	BeAA	BinAb
53	15	67	0	8	6	75.00	2	25.00	1	50.00	BeAA	BinAb
54	44	45	2	8	6	75.00	2	25.00	2	100.00	BHAA,BHAA	
55	45	43	4	9	6	66.67	2	22.22	0	0.00		BeBB,BeAB
56	29	46	2	12	8	66.67	6	50.00	4	66.67	BhAA,BhAA,BhAA,BhAA	BimBA,BimBB
57	34	59	1	12	10	83.33	8	66.67	4	50.00	BhAA,BhAA,BimAA,BimAA	BeAB,BimBA,BimBB,BimAB
58	29	29	2	12	10	83.33	4	33.33	4	100.00	BHAA,BeAA,BeAA,BeAA	

ANEXO 16

**AUTORIZACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE DATOS DEL TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN OTORGADO POR EL DIRECTOR MÉDICO DEL CENTRO DE
FERTILIDAD Y GINECOLOGÍA DEL SUR**



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

AUTORIZACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE DATOS DEL TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN TITULADO:

**PARÁMETROS SEMINALES Y SU EFECTO EN LA VIABILIDAD DE EMBRIONES
OBTENIDOS POR REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EL CENTRO DE FERTILIDAD Y
GINECOLOGÍA DEL SUR – CUSCO.**

Yo **LUIS ALBERTO VARGAS TOMINAGA** con DNI: 10307221 Director
médico del Centro de Fertilidad y Ginecología del Sur **AUTORIZO** el uso de la base
datos a la señorita **GABY JAQUELINE BERNAL TORRES** sobre los procedimientos
de reproducción asistida que aquí realizamos a pacientes que de manera voluntaria y
con su consentimiento llegan a nuestro Centro, proporcionándole éstos datos a partir
del año 2015 hasta la fecha, para el trabajo de investigación de la que ella es autora
titulado: **PARÁMETROS SEMINALES Y SU EFECTO EN LA VIABILIDAD DE
EMBRIONES OBTENIDOS POR REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EL CENTRO DE
FERTILIDAD Y GINECOLOGÍA DEL SUR – CUSCO.**

Adjunto el consentimiento informado que se les presenta a los pacientes previo
procedimiento de reproducción asistida.



Luis Vargas Tominaga
Director Médico



ANEXO 17

**CERTIFICACIÓN OTORGADA POR EL DIRECTOR MÉDICO DEL CENTRO DE
FERTILIDAD Y GINECOLOGÍA DEL SUR, DANDO FÉ DE LA REALIZACIÓN DEL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

CERTIFICADO

Yo **LUIS ALBERTO VARGAS TOMINAGA**, identificado con DNI N° 10307221 director médico del **CENTRO DE FERTILIDAD Y GINECOLOGÍA DEL SUR**, con RUC: 20527072183

CERTIFICO:

Que la señorita **GABY JAQUELINE BERNAL TORRES**, identificada con DNI N° 70878269, ha laborado en nuestro centro realizando análisis de muestras seminales en los laboratorios de Andrología y Embriología de nuestro Centro, en el periodo comprendido a partir del año 2015 hasta la fecha.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y dando Fé de lo antes estipulado, pudiendo la interesada hacer uso del presente documento en lo que estimase por conveniente.

Atentamente



CENTRO DE FERTILIDAD Y GINECOLOGIA
DEL SUR E.I.R.L.
LUIS VARGAS TOMINAGA
GINECOLOGO OBSTETRA
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

Luis Vargas Tominaga
Director Médico



ANEXO 18

**MODELO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO OTORGADO POR EL CENTRO DE
FERTILIDAD Y GINECOLOGÍA DEL SUR, A LOS PACIENTES QUE REALIZAN
PROCEDIMIENTO DE ICSI CON ÓVULOS DONADO**



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

CONSENTIMIENTO PARA ICSI Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CON OVULOS DONADOS (ICSI-OD)

Nombre de la paciente :
DNI/C. de extranjería :
Edad :
Estado Civil :

Nombre de su pareja :
DNI/C. de extranjería :
Edad :

Dirección actual :
Teléfono :
Correo electrónico :

Nombre del médico tratante :
Fecha :

DECLARAMOS EXPRESAMENTE que nos has sido explicado que, por nuestro proceso de esterilidad o infertilidad conyugal o de pareja, es conveniente se nos realice un procedimiento de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), con la finalidad de formar embriones para ser transferidos a la cavidad uterina. En la consulta médica hemos declarado que no padecemos enfermedades congénitas, hereditarias o infecciosas transmisibles que puedan dar lugar a riesgos graves para la posible descendencia.

Según OPINION de mi médico tratante, en nuestro caso la dificultad viene determinada por.....; y las alternativas de tratamiento que nos ha sido expuesta, hemos comprendido que la técnica más adecuada es la que aquí consentimos, denominada Inyección Intra- citoplasmática de Espermatozoides (ICSI) con óvulos donados.

Objetivo

La INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE (ICSI) es una técnica compleja de reproducción asistida que aplicada a óvulos obtenidos de donante, busca incrementar el número de óvulos fecundados y así lograr un mayor número de embriones de los cuales seleccionar los óptimos para la transferencias embrionaria en parejas cuya causa de infertilidad es que la mujer no tenga ovarios, o bien que los tenga y hayan perdido su función no pudiendo producir o madurar óvulos. esto puede ser por causas genéticas, cirugías, o por haber recibido tratamientos por cáncer. Otra causa es que la mujer padezca enfermedades genéticas que pudiera transmitir a sus hijos.



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

Explicación

La ICSI consiste en la inyección de un espermatozoide dentro de cada óvulo obtenido de donante, mediante el uso de un potente microscopio e instrumentos de micromanipulación de gametos (óvulo y espermatozoide). La fecundación ocurre en el laboratorio en condiciones controladas (temperatura, humedad, concentración de oxígeno, etc.). La transferencia embrionaria es la colocación en el útero de los mejores embriones para su implantación en el endometrio (capa interna del útero) de la mujer receptora y el desarrollo del embarazo.

Las etapas de la ICSI-OD son:

1.- Preparación endometrial de la receptora.

Para que los embriones se implanten en la mujer receptora, es necesario preparar su endometrio. Esta preparación debe ser al mismo tiempo que el ciclo de aspiración folicular de la donante.

La preparación del endometrio consta de dos partes. En primer lugar se requiere utilizar estradiol (estrógeno, una hormona producida por el ovario). Esta hormona puede administrarse por vía oral o cutánea. Se realizan algunas ecografías para evaluar el engrosamiento endometrial y cuando se estima que es adecuado, se agrega otra hormona, la progesterona (que produce el ovario después de la ovulación). Esta hormona debe ser administrada diariamente y se utiliza la vía vaginal (a través de tabletas, jaleas o anillos vaginales liberadores de la hormona). Ocasionalmente se puede administrar por vía oral. Si se logra un embarazo, el tratamiento hormonal debe mantenerse hasta que su médico le indique (generalmente hasta la semana siete y diez de gestación).

2.- Aspiración folicular.

Es el procedimiento mediante el cual se consiguen los óvulos de donante.

3.- Obtención de espermatozoides.

La pareja debe traer la muestra de semen en el momento de la aspiración folicular directamente de su casa o tomarla en el centro de fertilidad. Debe tener al menos tres días de abstinencia sexual y no más de siete.

Si la muestra de semen es traída de la casa, ésta debe ser entregada en el laboratorio idealmente dentro de 30 minutos de producida y mantenida a temperatura corporal. El semen es procesado en el laboratorio para seleccionar los espermatozoides de más alta movilidad.

En casos de Azoospermia (ausencia de espermatozoides en el semen), los gametos pueden obtenerse a través de punción directa del epididimo o mediante biopsia testicular. La decisión de recuperar espermatozoides del epididimo o del testículo, depende de la causa de la Azoospermia. Cuando la producción de espermatozoides está afectada, la alternativa es la obtención directa del testículo. En casos



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

de obstrucción epididimaria o de agenesia del conducto deferente (ausencia congénita), la alternativa más usada es la punción epididimaria.

4.- Fecundación.

Para realizar ICSI se requiere de un equipo de micromanipulación y con la ayuda de una delgada aguja de vidrio se inyecta un espermatozoide en un óvulo. Los óvulos óptimos para inyección son los que se encuentran en el estado de maduración adecuado.

La fecundación se confirma con la ayuda del microscopio, 16 a 20 horas después de ICSI. Si los gametos (óvulos y espermatozoides) son normales, la tasa de fecundación es de aproximadamente un 70%. Esta tasa varía de acuerdo a las características de los gametos, la edad de la mujer, la causa de infertilidad y variables ambientales.

Aproximadamente una cuarta parte de los óvulos de las mujeres jóvenes y sanas tienen anomalías cromosómicas, al igual que la cuarta parte de los espermatozoides en hombres jóvenes y sanos. Por ello no todos los óvulos fecundan. De los que fecundan, no todos son normales y detienen su desarrollo. De los embriones que siguen creciendo, no todos alcanzan a llegar a blastocisto. La técnica de ICSI y la de cultivo de blastocistos permiten identificar aquellos embriones que tienen mayor probabilidad de dar lugar a un embarazo.

5.- Transferencia embrionaria.

La transferencia de embriones al útero es un procedimiento que se realiza sin necesidad de analgesia o anestesia. Dura alrededor de 15 minutos. Consiste en depositar los embriones en el interior de la cavidad uterina. Para ello se utiliza un delgado tubo de plástico y muy suave llamado catéter. Este se introduce a través del cuello uterino y una vez en el interior de la cavidad, los embriones son depositados.

Después de la transferencia la paciente permanecerá en reposo el tiempo recomendado por su médico. Se recomienda reposo relativo por los siguientes tres días.

Algunas mujeres presentan después de la transferencia un ligero flujo sanguinolento, esto es normal y no debe preocupar.

Once días después de la transferencia puede medirse en la sangre de la mujer, una hormona (β hCG), que permite documentar la presencia de embarazo. Esta hormona duplica su valor cada 1.5 a 2 días.

De esta manera, mediciones cada dos días pueden aportar información útil relativa a calidad de la gestación antes de ser visible con ecografía. La ecografía transvaginal permite visualizar un saco gestacional dentro del útero, 21 días después de la transferencia embrionaria.



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

Beneficios

La eficiencia de la ICSI-OD se mide de la siguiente forma:

- Número de mujeres embarazadas / Número de mujeres que llegaron a tener transferencia de embriones.

Sin embargo, considerando que la tasa de abortos espontáneos es de aproximadamente 15% la medida más real de evaluar eficiencia es midiéndolo de la siguiente forma:

- Número de nacidos vivos / 100 ciclos de transferencia de embriones

La eficiencia de los procedimientos de reproducción asistida está en gran parte determinada por la calidad de los profesionales y el equipamiento del centro. Sin embargo, existen condiciones que afectan las probabilidades de embarazo independientemente de la calidad del centro. Estas son: el número de embriones que se transfieren al útero y la calidad de la muestra de semen.

La probabilidad de embarazo es mayor con dos embriones transferidos que con uno, pero con tres o más no aumenta esa probabilidad significativamente pero sí aumenta los riesgos asociados (embarazo múltiple, parto prematuro, parálisis cerebral infantil, etc.).

En este centro, de acuerdo con vuestros diagnósticos la probabilidad de conseguir un embarazo es de hasta _____ por transferencia embrionaria con óvulos de donante.

Riesgos, molestias y efectos secundarios

1.- Embarazo múltiple.

El porcentaje de embarazo múltiple está relacionado con el número de embriones transferidos.

El bienestar de la madre y los hijos en casos de embarazo múltiple dependerá de una atención con profesionales especializados y un hospital equipado adecuadamente. La posibilidad de complicaciones para la madre y los hijos aumenta a mayor número de fetos.

La incidencia de enfermedades y complicaciones maternas aumenta a mayor número de fetos: enfermedad hipertensiva del embarazo, diabetes gestacional; complicaciones durante el parto (desprendimiento prematuro de placenta, ruptura prematura de membranas, hemorragia post-parto, cesárea), etc.

La incidencia de enfermedades y complicaciones para los bebés también aumenta a mayor número de fetos, ya que hay mayor número de malformaciones fetales y complicaciones tardías como parálisis cerebral, retardo de desarrollo intelectual, etc. Estudios indican en 1995 que hay secuelas neurológicas en el 1.4% de recién nacidos vivos, 3.7% de recién nacidos gemelares, 8.7% para los trillizos, y 11.1% para



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

cuatrillizos. Estudios en 1996 indican que la parálisis cerebral infantil se presenta en cada 1000 recién nacidos vivos en 2.3 cuando son únicos, 12.6 cuando son gemelares, y 44.8 cuando son trillizos.

Los resultados latinoamericanos muestran que la probabilidad de tener un embarazo múltiple es de hasta un 30% (dependiendo del número de embriones transferidos y de la edad de la madre) para ciclos en fresco, y de casi un 22% cuando se trata de embriones descongelados.

2.- Embarazo ectópico (tubárico).

Es la implantación del embrión fuera del útero (en la trompa). Este diagnóstico se puede hacer alrededor de 21 días después de la transferencia embrionaria, cuando por ecografía se puede ver el saco gestacional. Esta complicación ocurre en la población general en alrededor del 1 - 2% de los casos y en los ciclos de ICSI esta incidencia aumenta a 4%. Esto se debe en gran parte a que las personas que necesitan ICSI tienen patología tubárica previa. El embarazo ectópico debe ser resuelto de inmediato, ya sea a través de un medicamento llamado metotrexato (inhibe la multiplicación celular, con lo que disminuye el riesgo de ruptura tubárica) o bien cirugía por laparoscopia.

3.- Defectos de nacimiento.

El porcentaje de malformaciones de los recién nacidos producto de ICSI no es mayor que el de la de la población general. En la información publicada a nivel mundial y latinoamericana, las tasas de malformaciones no superan 2 a 2.4% de los nacidos examinados.

4.- Riesgo de cancelación.

El primer riesgo de cancelación es que la donante no responda al tratamiento de estimulación ovárica controlada, produciendo muy pocos óvulos o no produciendo ninguno.

Otro riesgo de cancelación es que al preparar el endometrio no haya habido una respuesta adecuada de la paciente. Una alternativa en este caso es que los embriones se pueden criopreservar (congelar o vitrificar) para transferir en un ciclo siguiente de preparación endometrial.

Si ninguno de los óvulos es fecundado, o los embriones detienen su desarrollo, el médico no realizará la transferencia embrionaria y el tratamiento se cancela. Esto es muy poco probable que ocurra.

5.- Embarazos bioquímicos.

En ocasiones se puede detectar un embarazo como positivo en la primera determinación de la hormona β hCG, pero no logra progresar normalmente y detiene su crecimiento, por lo que no se detecta ecográficamente a los 21 días.



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

6.- Riesgo psicológico.

Pueden surgir dificultades en la relación de pareja (sexual y emocional), por síntomas de ansiedad y depresión tanto en el hombre como en la mujer, sobre todo en el periodo de espera de los resultados, así como ante las fallas repetidas. Por esto se recomienda buscar soporte emocional.

7.- Riesgos personalizados.

Debido a las características médicas, psicológicas y sociales de este caso particular, se podría asociar algún riesgo específico agregado, como puede ser: _____

Alternativas a este tratamiento

Existen algunas alternativas que no han mostrado una eficacia clínica superior a la ICSI, tales como GIFT, ZIFT, TOMMI, etc.

Alternativas ante el fracaso de este tratamiento

- Realizar otros intentos (de 3 a 6) con o sin variaciones del tratamiento.
- Profundizar el estudio con exámenes específicos para el caso particular.

Explicación breve del motivo

Debido a las características médicas, psicológicas y sociales de este caso particular, el plan de tratamiento fijado con el equipo médico hasta este momento es: _____

Posibilidad de retirar el consentimiento

La firma de este documento no le compromete a usted de forma definitiva. Es usted totalmente libre de retirar o modificar su consentimiento antes del procedimiento, por cualquier motivo. Sin embargo, si llega a cambiar de opinión respecto a su tratamiento, debe hacerse responsable de informar al centro y firmar el consentimiento donde se indiquen sus nuevas decisiones.



Dr. Luis Vargas Tominaga
C.M.P. 25034/R.N.E. 11535

Disponibilidad de volver a preguntar

Si desea mayor información de la que está en este formulario, puede solicitarla en cualquier momento.
Siempre será un placer servirle.
Este consentimiento es válido sólo para este ciclo de tratamiento.
Hemos recibido copia de este formulario.

..... Firma	<input type="text"/> Firma	<input type="text"/>
Sra:		Sr:	
DNI:		DNI:	

Certifico que antes del inicio del tratamiento y previo a que el paciente firme este documento:

1. Alguno de los miembros del equipo ha entregado información necesaria y suficiente para que el paciente tome su decisión.
2. Me he reunido con la paciente para discutir la información, le he dado la oportunidad de preguntar y pienso que he respondido satisfactoriamente a todas sus dudas.

Creo que la paciente ha entendido suficientemente lo que se le ha explicado y ha consentido en realizar el tratamiento propuesto.

.....
Firma del médico
Nombre :
CMP :