

*Pesce, Romina Ileana*

# **La remoción temprana de las células del cúmulus previo al ICSI modifican el desarrollo embrionario temprano: ensayo clínico aleatorizado y controlado**

Maestría en Investigación Clínica

*Tesis 2020*

*Cita sugerida:* *Pesce RI. La remoción temprana de las células del cúmulus previo al ICSI modifican el desarrollo embrionario temprano: ensayo clínico aleatorizado y controlado [tesis de maestría] [Internet]. [Buenos Aires]: Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires; 2020 [citado AAAA MM DD]. 36 p. Disponible en: <http://trovare.hospitalitaliano.org.ar/descargas/tesisytr/20210521160026/tesis-pesce-romina.pdf>*

Este documento integra la colección Tesis y trabajos finales de Trovare Repositorio Institucional del Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires y del Hospital Italiano de Buenos Aires. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

Para más información visite el sitio <http://trovare.hospitalitaliano.org.ar/>



**MIC**

## Maestría en investigación Clínica

Título:

“La remoción temprana de las células del cúmulus previo al ICSI modifican el desarrollo embrionario temprano. Ensayo clínico aleatorizado y controlado.”

Presentación Tesis

Maestranda: Dra. Romina I. Pesce.

*Sección Reproducción.  
Servicio Ginecología Hospital Italiano de Buenos Aires*

*Cohorte 2015*

Directora de Tesis: Dra. Cristina Elizondo

*Departamento de Investigación Clínica.  
Servicio de Clínica Médica. Hospital Italiano de Buenos Aires*

*Fecha de entrega: 20 octubre 2020*

## Contenido

Resumen: .....	2
1.Introducción.....	3
1.2 Objetivos .....	6
2.Materiales y métodos.....	6
Diseño del estudio .....	6
Participantes .....	8
Descripción de las ramas del ensayo clínico .....	10
Variables de resultado .....	12
Tamaño de la muestra.....	13
Aleatorización.....	13
Generación de la secuencia de asignación .....	13
Mecanismo de ocultamiento de la asignación.....	13
Implementación .....	14
Ciego.....	14
Métodos estadísticos .....	14
Resultados.....	15
4. Discusión .....	19
Resumen de los resultados .....	19
Posibles explicaciones: .....	19
Comparación con otros estudios internacionales .....	20
5.Conclusión .....	24
Referencias .....	26
Anexos.....	29

## **Resumen:**

### **Introducción:**

El tiempo de contacto entre las células del cúmulo y el ovocito es clave en la adquisición de su competencia núcleo citoplasmática. El cultivo de ovocitos con sus células del cúmulo (CC) circundantes previo al ICSI contribuye a una maduración nuclear y citoplasmática in vitro equilibrada, fertilización normal y desarrollo de un embrionario temprano activo. Existe una controversia en la literatura científica internacional sobre el tiempo de incubación de los ovocitos, con resultados heterogéneos y metodologías diversas. Los intervalos óptimos de cultivo antes de la denudación y/o inyección de ovocitos aún no se han establecido y puede resultar relevante para la mejora de los resultados reproductivos de la ICSI y en las prácticas de laboratorio. El mejor momento de incubación antes de la ICSI aún se está por determinar.

### **Materiales y métodos**

Ensayo clínico prospectivo controlado aleatorizado, entre enero de 2016 y diciembre de 2018, en programa de donación de ovocitos en un hospital universitario. Participantes: Ovocitos aleatorios procedentes de mujeres sanas (donantes).

Métodos: rama de tratamiento: Denudación temprana: treinta minutos después de la recogida de ovocitos (OPU), los ovocitos fueron desnudados de su cúmulo. Denudación tardía: cuatro horas más tarde que la OPU. Todos los ovocitos fueron sometidos a ICSI inmediatamente después de la denudación.

Todos los participantes, profesionales e investigadores fueron cegados a la asignación del tratamiento, excepto el biólogo que realizó el proceso (que no participó en otras actividades).

### **Resultados:**

De un total de 375 ovocitos incluidos, 191 fueron asignados aleatoriamente al brazo de la denudación temprana (ED) y 184 a la denudación tardía (LD). El tiempo medio hasta la denudación fue: ED, 0.5 horas (IC95% 0.42 - 0.58); LD, 4 horas (4 - 4.5);  $p < 0.001$ .

Resultados crudos para cada rama del ensayo (ED) vs. (LD) respectivamente: Maduración ovocitaria MII (%): 175 (91,62); 155 (84,24);  $p 0.028$ ; Fertilización normal (%) 152 (79,58); 122 (66,30) ;  $p 0,003$ ; Embriones evolutivos (%) 132 (69,11) 99 (53,80),  $p 0,003$

El odds ratio (OR) ajustado para los ovocitos de MII (comparando la denudación temprana vs. tardía) fue de 2,085 (IC95% 1,08 - 4,04);  $p 0,029$ . El OR ajustado para la fertilización fue 1,99 (IC95% 1,24 - 3,19);  $p 0,004$ . El OR ajustado para embrión evolutivo fue 1.99 (IC95% 1,28 – 3,10);  $p 0.02$ .

### **Conclusión**

El menor tiempo de incubación (30 minutos) y denudación con ICSI inmediatamente después, mostro en una mayor tasa de madurez ovocitaria, una mayor tasa de fertilización y una mayor tasa de clivaje embrionario temprano.

**Palabras clave:** ICSI / denudación / inyección / tiempo / células del cúmulo / envejecimiento de los ovocitos / madurez ovocitaria / fertilización / clivaje embrionario temprano.

## 1.Introducción

Uno de los mayores objetivos en la reproducción medicamente asistida es lograr la transferencia de un embrión capaz de lograr un embarazo y nacimiento de niño sano. Esto está directamente relacionado con el número de ovocitos recuperados durante el estímulo, particularmente aquellos maduros, o MII<sup>1</sup>. (1–3)

El óvulo u ovocito es una célula compleja, única y altamente especializada. Su competencia está definida por su capacidad intrínseca de lograr la madurez meiótica, una fertilización normal, y desarrollo embrionario temprano, activando su genoma, su metabolismo y homeostasis y su progresión en las divisiones celulares efectivas. (4)

El complejo ovocito - células foliculares mantienen una estrecha relación a lo largo de toda la ovogénesis (5,6) con un intercambio bidireccional metabólico, y génico muy activo a través de uniones estrechas o “GAP” . (7) Esto permite en forma paulatina, durante su desarrollo, que el ovocito adquiera la madurez núcleo citoplasmática balanceada. (8) El contacto sostenido de las células foliculares con el ovocito durante las fases tempranas de la madurez ovocitaria tiene una influencia duradera y fuerte en el desarrollo de la competencia del ovocito. (9,10)

El complejo proceso de maduración de los ovocitos se desarrolla coordinadamente e incluye un núcleo maduro que cumple con la segregación cromosómica y una madurez citoplasmática que implica la reorganización de la actividad de sus organelas, que almacenan ARNm, proteínas y factores de transcripción necesarios para el proceso de fertilización y embriogénesis temprana. (11)

En los ciclos estimulados de ART (técnicas de reproducción asistida), la madurez nuclear y citoplasmática puede presentarse en asincrónica. (12,13)

Es posible que el núcleo ovocitario reduzca su carga genética (madurez nuclear) más temprano que el citoplasma. La reducción de su carga genética (MII) habilita la fertilización del ovulo, aun cuando el citoplasma presente cierta inmadurez. Posiblemente, esta asincronía limitaría los procesos posteriores de su activación ovocitaria y procesos propios de la fertilización.

La experiencia obtenida en los primeros trabajos de FIV (fertilización in vitro), postulan que un periodo de incubación entre 2-6 hs del complejo ovocito-cúmulo previo a la inseminación, mejora las tasas de fertilización y embarazo(14,15). En estos casos, la inseminación de los ovocitos se realiza desconociendo si el ovocito alcanzó el estado MII o de madurez necesaria para ser fertilizado.

En el año 1992 se incorpora el ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) como estrategia en reproducción asistida y mucha de la experiencia atesorada del FIV se extrapola al ICSI, incluyendo el concepto de preincubación. El ICSI es un método de micro inseminación y tradicionalmente, el tratamiento de elección en causas de infertilidad debida a factor masculino

---

<sup>1</sup> Se lee “eme dos”.

severo (16) o en muchos casos, adoptado como método elegido de rutina dentro los procedimientos de técnica de reproducción asistida. (17)

En este procedimiento, el ovocito recuperado de la punción se incuba junto a su corona radiata de células foliculares que lo rodean y contienen, para luego ser removidas con procesos mecánicos y enzimáticos, seguido de la inyección del espermatozoide. En ese momento, donde el óvulo está desnudo, se constata su madurez nuclear, ante la presencia de su primer cuerpo polar en su periferia.

En el ICSI, el periodo de incubación del ovocito junto a sus células foliculares hasta su denudación puede variar desde los 30 minutos hasta las 8-9 hs. En nuestra actividad diaria, el horario de la inyección intracitoplasmática, ni bien se recuperan los ovocitos, se realiza indistintamente dentro de este rango horario, dependiendo de cuánto trabajo exista en el laboratorio ese día en particular. Sin embargo, parecería ser que , el ovocito, presenta una ventana temporal relativamente estrecha para ser inseminado, fuera de la cual, puede deteriorarse, envejecer y perder su capacidad intrínseca, comprometiendo el normal desarrollo embrionario, proceso conocido como “envejecimiento ovocitario” (*ovarian aging*, en inglés). (18)

Este efecto del “ovarian aging” se observó, asimismo, en pacientes estériles de edad avanzada, donde el complejo de células foliculares que rodea al ovocito mostraba un déficit metabólico y funcional con procesos de luteinización tempranos, y sub-expresión de mediadores génicos, medidos por PCR en tiempo real. (19) Este efecto no fue observado en mujeres donantes.

Aún hoy no está claro en la literatura el tiempo ideal en el cual el ovocito debe mantenerse junto a sus células foliculares previo al ICSI, a pesar de ser un periodo clave en el proceso de funcionalidad ovular, y desarrollo embrionario. (20) Los supuestos en común que han movilitado a la gran mayoría de los estudios, inclusive este, fundamentan que el contacto estrecho entre los ovocitos y sus células foliculares previo al FIV o ICSI, mantiene el intercambio activo metabólico y contribuye a la capacitación núcleo-citoplasmática que se evidencia en mejora de resultados clínicos.

Aun cuando diversos estudios intentaron definir el tiempo óptimo para la remoción de las células foliculares previo al ICSI, todavía no hay consenso: la literatura es contradictoria y los resultados de los estudios heterogéneos y no concluyentes.

Los primeros trabajos, basados en cohortes retrospectivas, puntualizaron que un periodo de al menos 3 horas antes de la denudación e ICSI, mejoraría la calidad del desarrollo embrionario (21), sugiriendo que prolongar la incubación, colaboraría en adquirir la madurez citoplasmática necesaria, y mejoraría la tasa de fertilización y embarazo clínico, mientras que la denudación e ICSI inmediatamente posterior, reduciría la tasa de implantación. (22)

Contrariamente, en trabajos con modelos animales se observó el efecto exactamente opuesto, donde el contacto persistente con las células del cúmulo aceleraría el fenómeno de deterioro sobre el óvulo tanto in vivo como in vitro. (23,24) Mientras que otros grupos de estudio dejaron de considerar este tema relevante al no encontrar en la duración del tiempo de incubación y denudación, efecto alguno sobre los resultados del ICSI. (20,25–28)

En otras investigaciones, además de tener presente el tiempo de incubación previo a la quita de las células del cúmulo, se toma en consideración un tiempo extra: el tiempo entre la desnudación y el ICSI (20,27,28), que tampoco demostró cambios en los resultados iniciales.

Los trabajos mencionados, de cohortes que abordaron esta temática, fueron realizados en pacientes con dificultades reproductivas, un subgrupo particular donde es posible que otros factores propios a su condición de esterilidad hayan podido intervenir en los resultados evaluados. Pero queda el interrogante si lo que sucede en pacientes estériles es lo que fisiológicamente sucedería en personas jóvenes no estériles. Y, además, si se pudiesen controlar en el modelo de estudio, factores azarosos que inciden en los resultados.

Las mujeres que participan como donantes en procedimientos de fertilización asistida, son preferentemente menores a 30 años, con fertilidad probada, sin antecedentes de jerarquía; o sea, sanas. Actualmente brindan los mejores resultados reproductivos clínicos dentro de las estrategias de Alta Complejidad, y sus ovocitos pueden utilizarse para asistir a una sola paciente (mujer receptora de un procedimiento de ovodonación, o donación de ovocitos) o compartirse al distribuir los ovocitos recuperados entre dos o más pacientes. Los modelos de ovodonación permiten homologar los resultados a lo que sucedería en mujeres sin problemas reproductivos, sanas, y asemejarlos a los eventos reproductivos fisiológicos normales.

Es así que, en este trabajo, la unidad de análisis fueron los ovocitos donados de mujeres sanas, evaluando si cambios en periodos de pre-incubación previo al ICSI fueron relevantes y si se modificaron los resultados de laboratorio posteriores.

El análisis en la población de pacientes donantes sin trastornos reproductivos proporcionaría información sobre procesos que se dan, probablemente, en forma natural sin sesgos de factores presentes en población infértil.

Justificación. Relevancia:

Identificar si el tiempo y la duración del periodo de incubación del ovocito junto a sus células foliculares previo al ICSI, en un modelo homologado a la paciente sana -como el que ofrece ovodonación-, modifica el número de ovocitos maduros (MII) recuperados, su fertilización normal y el desarrollo embrionario inicial es clave. Y si además se basa en estudio de alta calidad y bien diseñado, mejor. No solo modificaría la conducta en el laboratorio, interviniendo a un tiempo definido, sino que dicha intervención podría tener un alto impacto clínico en los resultados.

En otro nivel de análisis, las intervenciones que mejoren las tasas de fertilización, desarrollo de embrión competente para un embarazo clínico, seguido de un recién nacido vivo, son los objetivos deseados en las investigaciones en reproducción asistida humana. Contribuyen a la satisfacción de las parejas estériles, mejorando su calidad de vida y representarían a largo plazo, un ahorro significativo en recursos al sistema de salud.

## **1.2 Objetivos**

### *1.2.1 Objetivo general:*

El objetivo de este trabajo fue determinar si existen diferencias entre la denudación del cúmulus del ovocito previo al ICSI en forma temprana (a los 30 minutos post recuperación) versus tardía (4 horas) en la evolución embrionaria.

### *1.2.2 Objetivos específicos*

Evaluar si existen diferencias entre denudación ovocitaria temprana versus tardía en:

-Madurez ovocitaria (ovocitos MII).

-Fertilización normal.

-Clivaje embrionario. Embriones evolutivos normales de buena, muy buena y excelente calidad en día 3 (72 horas).

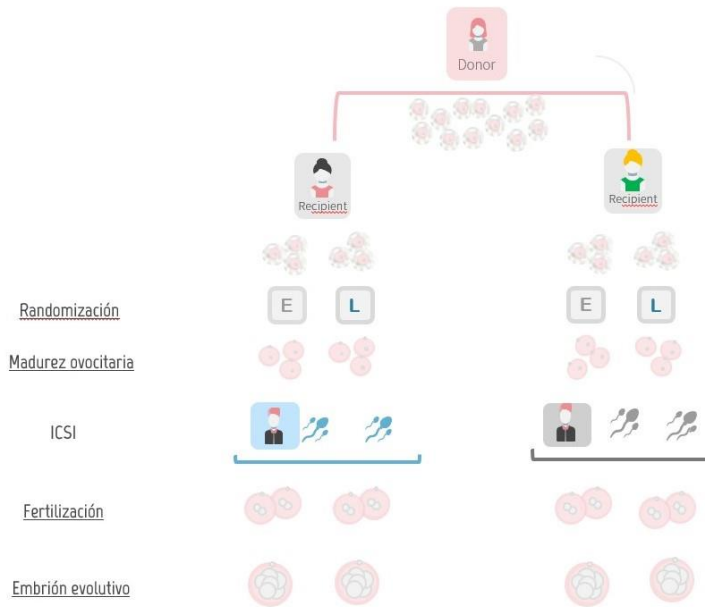
## **2. Materiales y métodos**

### **Diseño del estudio**

El estudio fue un ensayo clínico aleatorizado y controlado con aleatorización automatizada y oculta. La intervención fue abierta para el biólogo que realizaba la denudación temprano o tardío según rama de asignación, mientras que se mantuvieron ciegos para los investigadores que realizaran la evaluación de los resultados, maduración, fertilización y embrión evolutivo y para el análisis estadístico.

Las unidades de aleatorización y análisis fueron los ovocitos donados por mujeres sanas donantes (en adelante, referidas solo como donantes). En la figura 1 se pueden ver los detalles de la relación entre donantes, la distribución y aleatorización de ovocitos, la asignación a las ramas del estudio y la evaluación de las variables de resultado.





**Figura 1.** Relación entre las donantes, la distribución y aleatorización de ovocitos, la asignación a las ramas del estudio y la evaluación de las variables de resultado. Los ovocitos obtenidos de una donante (Donor) podían ir a una o más de una paciente receptora (Recipient), según si la cantidad de ovocitos recuperados era menor a 10 o no. Los ovocitos distribuidos a cada receptora eran aleatorizados a una de dos ramas: denudación ovocitaria temprana (E) o tardía (L). El primer resultado evaluado eran los ovocitos con maduración MII. Luego de la inyección intracitoplasmática realizado con la misma muestra de semen para las dos ramas de intervención en cada mujer receptora, se evaluaba la calidad de fertilización de cada ovocito. Por último, se evaluaba la calidad de los embriones evolutivos.

En los casos donde la recuperación de ovocitos de la donante fuera menor a 10 ovocitos, los mismos eran otorgados a una única receptora. En los casos donde los óvulos recuperados fueron numerosos, a dos receptoras, en cantidades equivalentes a cada una de manera aleatoria y consecutiva. La asignación de los ovocitos a la receptora se realizaba ni bien eran recuperados a través de la punción de la donante.

El trabajo de investigación se desarrolló en un Hospital Universitario de tercer nivel de complejidad, dentro del Programa de Ovodonación de la Sección Reproducción del Servicio de ginecología. El período en que se desarrolló fue entre diciembre 2015 y diciembre 2018.

El presente estudio se encuentra registrado en ClinicalTrials.gov con el numero NCT03121924 y aprobado por el comité de ética de protocolos de investigación del Hospital Italiano con número 2500.

Los investigadores no presentan conflicto de interés para el desarrollo del presente estudio.

El presente estudio fue enteramente financiado por los investigadores sin generar un costo ni para las donantes ni para las receptoras ni sus coberturas de salud.

## Participantes

### *Sobre las donantes*

La unidad de análisis fue los ovocitos provenientes de mujeres donantes de ovocitos, recuperados por punción aspiración folicular 36.5 hs  $\pm$  1 h. Se utilizó esquema de antagonista variable y “*doble descarga*” con acetato de triptorelina como descarga a las 36 horas y 24 horas previas a la punción.

Las mujeres que se incluyeron como donantes de ovocitos, ingresaron en forma consecutiva y cumplieron con la condición de donar una sola vez y solamente en nuestra institución. Todas cumplieron los siguientes criterios de inclusión: edad entre 21 y 32 años, haber donado solamente en nuestra institución, en forma altruista, y que no participara de otro estudio de investigación.

Los criterios de exclusión fueron que sean donantes con perfil de ovario poliquístico (29,30), baja respuesta ovocitaria inesperada (representada por pobre desarrollo folicular en el estímulo o recuperación menor a 6 ovocitos en la punción); o sospecha o signos de endometriosis durante el estímulo o en el líquido folicular en la punción. No se incluyeron en el protocolo ovocitos desvitrificados, ovocitos de donantes que hubieran donado previamente en un período menor a tres meses o en otra institución.

El comportamiento de los ovocitos donados ya sea en forma directa a una única receptora, o bien, dividiendo una cohorte de ovocitos donados en dos o más receptoras, se asumieron con la posibilidad que se manifiesten en forma semejante luego de la intervención, en resultados como la fertilización y clivaje embrionario temprano, aun cuando la muestra seminal sea diferente y exclusiva para cada receptora. Por este motivo, las pacientes donantes se asumieron como “Cluster” y el análisis se realizó considerando este natural agrupamiento, ya que se esperaba que el comportamiento de los ovocitos se manifieste de manera semejante (“ovocitos hermanos”).

### *Sobre el proceso de ovodonación*

Las pacientes donantes recibieron el mismo esquema de estimulación. Se realizó un esquema con antagonistas de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), y el uso de agonistas de GnRH como fármaco capaz de lograr una descarga de LH (hormona luteinizante) endógena y desencadenar el proceso ovulatorio.

Todas las mujeres con un esquema de antagonista de inicio variable. El estímulo comenzó en todos los casos en fase folicular temprana, en el día 2 del inicio del ciclo menstrual. La dosis de

rFSH (hormona folículo-estimulante recombinante) se adecuaron en cada caso en particular, con dosis entre 200 y 275 UI por día.

Cuando los folículos alcanzaron un tamaño superior o igual a 14 mm, con dosaje de estradiol (E2) acorde, se indicó una dosis diaria de antagonista de GnRH para evitar el pico endógeno de LH. Se adicionaba una dosis de HMG (gonadotropina menopáusica humana) de acuerdo con la respuesta ovárica, determinada por los controles ecográficos seriados y las determinaciones de E2 séricos.

Una vez que al menos tres folículos alcanzaron un tamaño superior a 17 mm, o niveles superiores a 3000 mUI/ml de estradiol sérico, se programaba la descarga ovulatoria. La descarga ovulatoria se realizó con tres dosis de agonistas de GnRH: se aplicaron dos dosis juntas de 0,5 mg/ ml de agonista de GnRH (acetato de leuprolide) 36 horas antes de la recolección de ovocitos. Doce horas después y 24 horas antes de la programación de la recolección ovocitaria, la paciente realizaba un refuerzo, aplicándose una dosis única más de acetato de leuprolide.

Se programó la recuperación de ovocitos en el quirófano, bajo anestesia general en todos los casos, entre las 34 y 36 horas de la aplicación de la primera descarga con acetato de leuprolide (dos dosis de 0,5 mUI /ml -Gonapeptyl dayly-, y a 24 horas antes de la segunda aplicación de una sola dosis de la misma medicación, a modo de refuerzo.(ver anexo 1)

#### *Sobre el factor masculino*

Cada muestra seminal de la pareja de cada receptora fue procesada en fresco, con parámetros espermáticos dentro de la normalidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS). (31)

No se incluyeron muestras de banco, muestras crío preservadas previamente, muestras con alto índice de fragmentación y necesidad de procesamiento especial como columnas de anexina. Se excluyeron casos de factor masculino severo y muestras seminales con altos índices de fragmentación de ADN espermático (Tunnel superior a 23%) ó espermatozoides recuperados de biopsias quirúrgicas testiculares o de epidídimo.

#### *Proceso de consentimiento informado*

Todos los pacientes participantes brindaron su consentimiento firmado habilitante para participar en el protocolo.

Las características del estudio fueron explicadas desde las primeras entrevistas que se mantuvieron tanto con donantes como receptoras con el médico especialista perteneciente al equipo de ovodonación.

El momento de ingreso o no al protocolo fue en las entrevistas médicas de programación de las donantes y receptoras dando a conocer a las participantes los fines del estudio y se aclararon

las dudas que puedan surgir luego de la información otorgada. Las participantes tanto donantes como la dadora receptora-muestra seminal, participaron del proceso de consentimiento informado al programa de ovodonación junto el consentimiento informado para participar del presente protocolo de investigación.

#### *Criterio de laboratorio*

Otro criterio de exclusión, de tipo operativo, en el laboratorio se debió garantizar la disponibilidad de dos biólogos independientes solo afectados al protocolo dentro de la tarea cotidiana, para garantizar el enmascaramiento de la intervención, la independencia de las observaciones y evaluaciones en los días subsiguientes. En los casos en los que no se pudo contar con dicha disponibilidad en un laboratorio de alta complejidad, donde la carga de trabajo es variable, los procedimientos realizados ese día no fueron incluidos en el presente estudio.

### **Descripción de las ramas del ensayo clínico**

Luego de recuperados los ovocitos de las pacientes donantes, se asignaron en general un promedio de 7 ovocitos a cada receptora-muestra seminal con un mínimo de 6 y un máximo de 10 ovocitos por unidad receptora-muestra seminal. Una vez asignados a las receptoras, los ovocitos fueron aleatorizados a la intervención.

Lo que variaba entre ambas ramas del estudio era el tiempo hasta la denudación ovocitaria, el resto tenía idéntico proceso. Ni bien se recibían en el laboratorio los ovocitos desde el quirófano, se cronometraba con reloj y alarma el tiempo que corría. Se programaban dos alertas: a los 30 minutos y a las 4 horas. A partir de este tiempo asignado de manera aleatoria los tiempos se mantuvieron tempranos o tardíos durante todo el proceso de ICSI ya que el resto de los tiempos no fueron modificados de los tiempos habituales del procedimiento (evaluación de madurez e inyección intracitoplasmática inmediata a la denudación (30 minutos o 4 hs), evaluación de fertilización a las 24 hs y evaluación de clivaje embrionario a las 72 hs.

El complejo ovocito-células foliculares asignado a la rama temprana fue incubado en medio de fertilización (G-IVF, VITROLIFE) solo 30 minutos desde la punción, momento en que fue desprovisto de su corona radiada y células foliculares.

En la rama denudación ovocitaria tardío, el complejo ovocito-células foliculares fue incubado durante 4 horas, momento en que se realizó el mismo procedimiento de despojar corona radiada y células foliculares. En el anexo se detalla la técnica de denudación.

En ambas ramas se realizó el ICSI inmediatamente después de la remoción de las células foliculares.

Dos biólogos independientes y ciegos a la asignación de la intervención durante todo el estudio participaron en el protocolo con distintas funciones: uno realizó la denudación y la evaluación de madurez ovocitaria e ICSI. El otro biólogo fue el encargado de evaluar las variables de fertilización, el clivaje inicial y calidad embrionaria.

#### *Descripción del procedimiento y del ICSI*

Luego de la obtención de los ovocitos y de un período de incubación variable temprano o tardío según rama de aleatorización, los ovocitos eran despojados de sus células foliculares por un proceso enzimático de hialuronidasa y luego completado con un proceso mecánico de extracción de células foliculares con pipeta de vidrio en reiteradas ocasiones, hasta que la zona pelúcida quedaba liberada de células del cúmulus. Una vez finalizado la denudación de los ovocitos, se evaluaba la madurez ovocitaria. Si se encontraba el óvulo maduro (estadio MII) se realizaba inmediatamente la inyección intracitoplasmática de los espermatozoides (ver descripción detallada en anexo).

La inyección Intracitoplasmática de espermatozoides en los ovocitos donados fue hecha por un único operador que participo en la intervención. Un biólogo formado y con experiencia en el laboratorio de alta complejidad fue el encargado de realizar el procesamiento de la muestra seminal, la capacitación de esta, la preparación ovocitaria previa al ICSI según el período de preincubación asignado y la inyección del espermatozoide seleccionado.

Las muestras seminales de cada pareja fueron preparadas para el ICSI según la técnica habitual (ver anexo). Los ovocitos asignados a la pareja receptora fueron inseminados con el semen capacitado de la pareja (unidad receptora-muestra seminal) ya sea en forma temprana o tardía según correspondiera, manteniendo la rama de asignación en cada caso.

De esta forma, cada receptora tuvo ovocitos donados, inyectados a los 30-40 minutos o luego de las 4 horas según correspondiera a la rama asignada, con la misma muestra seminal y de una misma cohorte ovocitaria. La inyección de los ovocitos realizada por un biólogo ciego a la asignación, previamente consigno el estado de madurez de los ovocitos a inyectar (MII).

Una vez completado el ICSI, los ovocitos inyectados permanecieron en cultivo en Human Tubal Fluid médium hasta evaluar fertilización a las 24 horas siguientes.

#### *Evaluación y selección embrionaria pre-transferencia,*

Los mejores embriones generados del procedimiento, independientemente de la rama en la que fueron generados, fueron los elegidos y transferidos a las pacientes receptoras. De esta manera, se le ofrecía a la receptora las mejores condiciones conocidas para lograr un embarazo viable. La selección de los embriones a transferir estuvo a cargo de un biólogo diferente y ciego a la intervención.

## **Variables de resultado**

*El estudio tenía tres variables de resultado, correspondientes a los tres momentos más importantes del proceso de laboratorio pre-transferencia.*

### *1. Madurez ovocitaria*

La primera variable de resultado fue el número de ovocitos de ovocitos maduros MII post denudación, con respecto al total de ovocitos evaluados (tasa de madurez ovocitaria).

### *2. Fertilización normal*

Un biólogo diferente al que realizó la inyección y ciego a la asignación de cada rama, evaluó a las 24 horas la fertilización. Esta fue considerada normal con la visualización de dos claros pronúcleos en el citoplasma, definidos entre las 18 y 26 horas post inyección de espermatozoide. La ausencia de pronúcleos (ovocitos no fertilizados), o bien, la presencia de uno, tres o más pronúcleos fueron considerados como fertilización anormal. Asimismo, se consideró folículo lisado (fertilización anormal) a la ausencia de una correcta visualización de las estructuras celulares o signos de desintegración de estas.

La tasa de fertilización se estableció como la razón entre los ovocitos fertilizados adecuadamente sobre el total de los ovocitos inyectados.

### *3. Evolución embrionaria normal. Clivaje embrionario temprano.*

Luego de constatar fertilización, el mismo biólogo ciego a la asignación evaluó el clivaje embrionario temprano, a las  $24 \pm 2$  h siguientes. Se describen las primeras blastómeras, producto de la división celular del cigoto. A las  $44 \pm 2$  hs posterior al ICSI, nuevamente se evaluó el desarrollo del embrión clivado, ya en medio de cultivo.

Al tercer día los embriones fueron categorizados según sus características morfológicas, según clasificación de Gardner, D y cols.(32), en embriones de regular, buena, muy buena y excelente calidad. Cuando analizamos el clivaje embrionario, aquellos embriones que no presentaron ningún signo de actividad o con divisiones celulares activas, se definieron como embriones no evolutivos. Aquellos embriones que lograron comenzar con divisiones celulares activas., se consideraron embriones evolutivos. Dentro de los mismos se clasificaron morfológicamente (según porcentaje de compromiso de la estructura con fragmentos, pobre identificación de blastómeros o presencia de multinucleación). Los embriones muy comprometidos en alguna de estas variables se clasificaron en embriones de mala calidad o regular calidad (E1), de buena calidad (E2), muy buena calidad (E3) y excelente calidad (E4). En el análisis en particular de las categorías, se agruparon dicotómicamente los embriones según si clínicamente tuvieran chances de transferirse (de buena, muy buena y excelente calidad).

La tasa de clivaje o desarrollo embrionario se definió como la razón entre el número de embriones de buena/ muy buen y excelente calidad generados y el número de ovocitos maduros inyectados.

La tasa de embriones evolutivos se definió como el número de embriones que continúan activos en su división celular, con respecto a la totalidad de los embriones evaluados.

## Tamaño de la muestra

### Muestreo y cálculo del tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral se calculó esperando una diferencia de un 20% en la tasa de maduración MII, en la tasa de fertilización y tasa de embriones evolutivos (cleaving embryo) entre los ovocitos que fueron denudados en forma temprana versus la tardía. Considerando un error alfa de 5% y un poder de 80% para un test a dos colas, se requería incluir 47 ovocitos por rama. Dado que cada mujer donante se comporta como un efecto racimo o cluster (dado que los ovocitos que aporte se parecerán más entre sí que los ovocitos de otras donantes), se ajustó el cálculo por el efecto de diseño según la siguiente fórmula.

Efecto de Diseño =  $1 + (m - 1) * CCI$

Donde m es el promedio de ovocitos por donante (cluster) y CCI es el coeficiente de correlación intraclase. En este caso, el CCI fue calculado por registros previos del comportamiento de los ovocitos en nuestro programa de ovodonación, teniendo un valor de 0,216 (error estándar 0,23). Por lo que el efecto de diseño estimado fue 3,80.

Entonces, ajustando el cálculo anterior al efecto de diseño eran necesarios 178 ovocitos por rama ( $47 * 3,80$ ). Se agregaron un 5 % de ovocitos por la pérdida eventual al someterse al procedimiento (pérdida habitual del método), resultando en 187 ovocitos por rama.

## Aleatorización

### Generación de la secuencia de asignación

Se utilizó un sistema de aleatorización por computadora on-line y centralizado mediante una generación de números aleatoria en bloques variables (<http://protocolos.hospitalitaliano.org.ar>). Lo operaba una persona que no formaba parte del equipo investigador y no tenía conocimiento de la procedencia o destino de los ovocitos, ni participaba de la evaluación posterior de los resultados del estudio.

### Mecanismo de ocultamiento de la asignación

El biólogo encargado de realizar la denudación folicular inicial, debía cotejar en cada momento la procedencia de cada muestra según código, tal como lo exige las normas de bioseguridad y procesamiento de muestras. Aun cuando la asignación fue enmascarada y la asignación no

revelada, el biólogo podía entender que cuando se realizaba la intervención temprana y la tardía (difícil ocultamiento de asignación). El equipo investigador no participó del proceso de aleatorización y la asignación fue enmascarada y automatizada. No había forma de predecir la rama a la que el software asignaría cada ovocito.

## **Implementación**

Una vez que los ovocitos correspondientes a cada receptora eran asignados a cada rama (temprana o tardía), un primer biólogo cronometraba el tiempo para realizar la denudación ovocitaria según estipulaba el protocolo. Este biólogo rotulaba con un código identificador a cada ovocito en su medio correspondiente al procedimiento habitual específico para el estudio y completaba una planilla de codificación donde constaba la información de código identificador y rama asignada. Esta planilla no fue accesible para ningún miembro del equipo de investigación hasta que no se terminó todo el estudio, incluyendo el análisis de datos en forma ciega. Posteriormente, ese biólogo no tenía más contacto con los ovocitos ni tenía ninguna otra participación en la investigación y continuaba el proceso de denudación un biólogo miembro del equipo de investigación que, cotejaba las muestras para realizar la denudación y el ICSI según exige las buenas practicas de laboratorio de alta complejidad. Conocía que debía ser denudado y realizar el procedimiento de ICSI en el momento que el biólogo encargado de la asignación se lo dijera. Este último fue el encargado de realizar las evaluaciones sobre maduración, fertilización y clivaje embrionario.

## **Ciego**

Ninguno de los investigadores, ya sean médicos o biólogos, que participaron en la atención de las pacientes o en la evaluación de los resultados del estudio tenía conocimiento de la rama asignada a cada ovocito, así como tampoco lo tenían las pacientes enroladas (estudio doble ciego). Todos los medios de incubación y fertilización eran idénticos para todos los ovocitos independientemente de la rama asignada. La identificación de todos los ovocitos fue realizada por el biólogo encargado de la asignación, llevando un registro codificado al que no tenía acceso ninguno de los investigadores ni pacientes. Este código no permitía conocer la rama de asignación ni aun en el momento del análisis.

## **Métodos estadísticos**

En el análisis descriptivo se expresan las variables cuantitativas como media y desvío estándar o mediana e intervalo inter-cuartil, según la distribución observada. Las variables categóricas se expresan como proporción, con su intervalo de confianza



El análisis principal fue un análisis según rama de asignación (llamado análisis global). En el mismo se incluyeron la totalidad de ovocitos aleatorizados y los resultados independientemente de la pérdida de ovocitos al avanzar en el procedimiento de ICSI.

Se realizó un análisis teniéndose en cuenta la dependencia posible entre el ovocito donado (unidad de análisis) con la mujer donante, en el desarrollo y comportamiento post denudación e ICSI. Se estimó el efecto de la intervención (denudación temprana/tardía) sobre la maduración, fertilización y clivaje embrionario con un modelo de regresión logística de efectos aleatorios por cluster considerando la variabilidad y el natural grupo de ovocitos de una misma donante (clúster). Se expresaron las razones de odds (odds ratios u OR) con sus intervalos de confianza 95% (IC95%). Se consideró estadísticamente significativa la probabilidad menor al 5%.

Se estimó la tasa de fertilización con su intervalo de confianza 95% para ambos grupos.

Se realizó también un análisis secundario post hoc, donde se individualizó el numerador según la biología presente en el protocolo habitual del procedimiento de ICSI (llamado análisis por biología). Para el resultado de maduración todos los ovocitos tuvieron el mismo denominador que el análisis global por asignación de tratamiento. Para los resultados de fertilización los denominadores fueron todos aquellos ovocitos que resultaron maduros en el paso anterior y que fueran inyectados según protocolo habitual de ICSI. Para los resultados de clivaje embrionario los denominadores fueron aquellos ovocitos que resultaron fertilizados de manera normal en el paso anterior según protocolo habitual de ICSI. Esto es, según los procedimientos habituales en un laboratorio de fertilidad, ya que sólo se inyectan los ovocitos maduros (siendo éstos el denominador para evaluar fertilización). Y sólo se evalúa calidad embrionaria en aquellos ovocitos correctamente fertilizados.

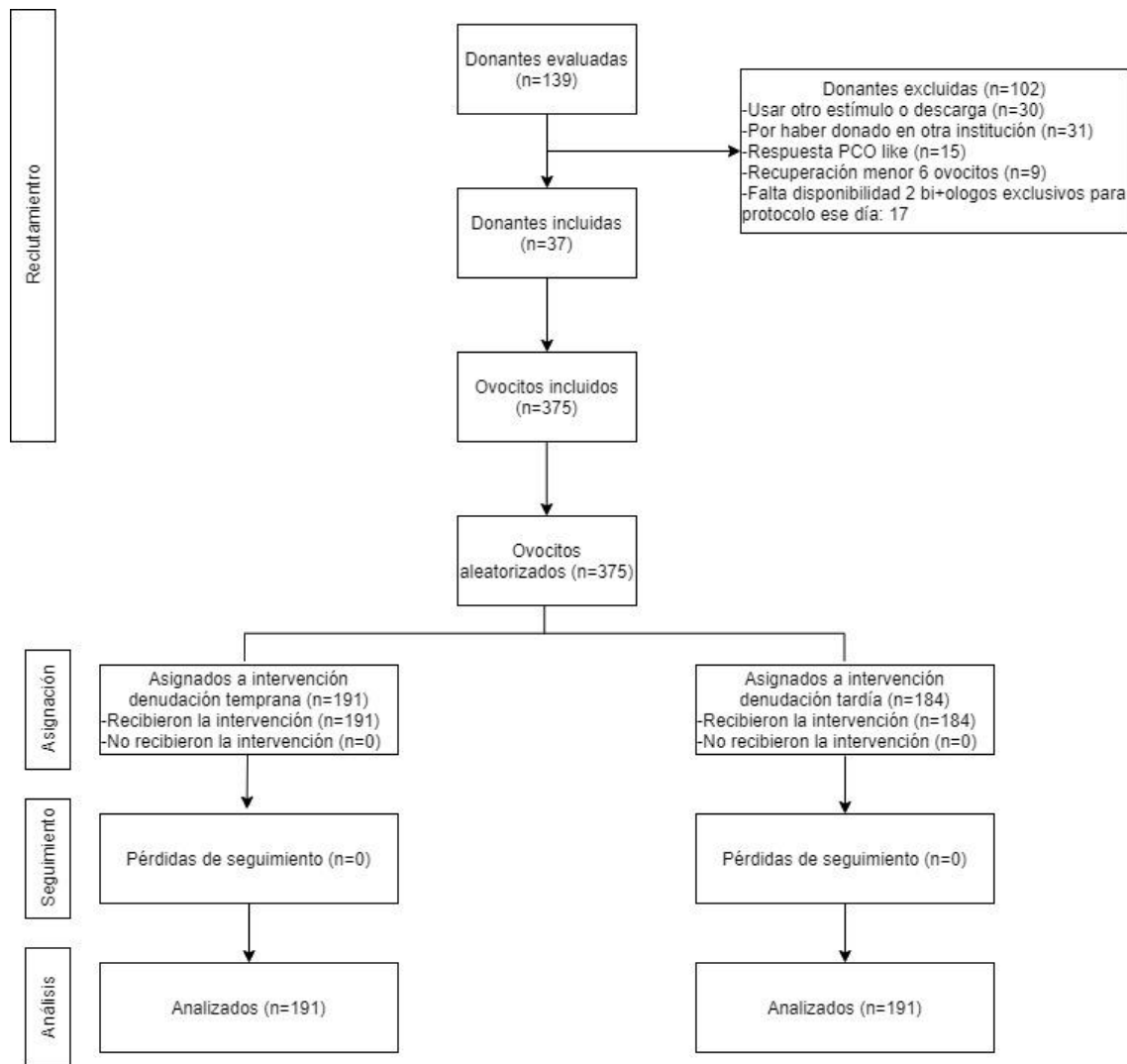
Entendiendo que luego de la evaluación de la maduración según rama de asignación, en los pasos posteriores de evaluación de resultado tanto para fertilización como para clivaje embrionario el efecto de la aleatorización pudiera no estar asegurado, se realizó un tercer análisis (llamado análisis variable instrumental) donde se incluyó a la aleatorización como una variable instrumental que nos permitió evaluar el efecto causal promedio de cumplidores (CACE) de la intervención sobre fertilización y clivaje embrionario.

El análisis se realizó con el paquete de software estadístico STATA 13.

## Resultados

Entre diciembre de 2015 y diciembre de 2018, según el tamaño muestral necesario, se reunieron un total de 375 ovocitos, de treinta y siete donantes ingresadas al estudio según criterios de inclusión. El detalle del flujo de donantes y ovocitos se puede ver en la figura 2.

La mediana de edad de las donantes fue de 25 años (intervalo intercuartílico 23 a 28). La mediana de ovocitos recuperados por donante fue 12 (intervalo intercuartílico 8 a 15) y la cantidad total de ovocitos aleatorizados a rama temprana (n=191) y tardía (n=184).



**Figura 2:** Diagrama tipo Consort del flujo de donantes y ovocitos a lo largo del estudio.

La tabla 1 muestra la diferencia entre las ramas del estudio para el tiempo entre descarga de la ovulación y la aleatorización, el tiempo a la denudación ovocitaria, y la cantidad de ovocitos asignados por paciente receptora. La diferencia horaria entre ambas ramas respecto del tiempo a la denudación fue de 3,5 horas (rango de 3,42 a 4,08) evidenciando la calidad de la intervención sobre el tiempo a la denudación. No encontramos diferencias ni en los otros tiempos del proceso de ICSI ni en la cantidad de ovocitos de las donantes ni los asignados a las receptoras.

**Tabla 1.** Diferencias entre las ramas del estudio en tiempos distribución ovocitaria donante-receptora

<b>Variable</b>	<b>Denudación temprana (n=191)</b>	<b>Denudación tardía (n=184)</b>	<b>p</b>
Horas entre descarga y aleatorización	36 (35,5-36,5)	36 (35,5-36,5)	0,847
Horas entre recuperación ovocitaria y denudación	0,5 (0,42 a 0,58)	4 (4 a 4,5)	<0,001
Número de ovocitos aleatorizados por donante	13 (10-24)	10 (7-14)	0,196
Número de ovocitos aleatorizados por receptora	7 (7-9)	8 (7-10)	0,282
Mediana (Intervalos 25% -75%)			

Las tasas de maduración, fertilización normal y embrión evolutivo en el grupo de denudación temprana fueron 91,62% (IC95% 87,65- 95,58), 79,58 % (IC95% 73,81- 85,34) y 69,10% (IC95% 62,49- 75,72) respectivamente, mientras que las tasas en la rama de denudación tardía fueron 84,23% (IC95% 78,29- 89,55), 66,30% (IC95% 59,41- 73,19) y 53,80% (IC95% 46,53- 61,07) respectivamente. En el análisis principal por el análisis global, se observó que, en todas las variables de resultado, a la denudación temprana mostró una diferencia significativa con respecto a la tardía. La tabla 2 muestra el análisis univariado. los resultados crudos por rama

**Tabla 2.** Resultados crudos para cada rama del estudio

<b>Variable</b>	<b>Denudación temprana (n=191)</b>	<b>Denudación tardía (n=184)</b>	<b>p</b>
Maduración ovocitaria MII (%)	175 (91,62)	155 (84,24)	0,028
Fertilización normal (%)	152 (79,58)	122 (66,30)	0,003
Embriones evolutivos (%)	132 (69,11)	99 (53,80)	0,003

En el análisis principal por el análisis global vemos que la rama de denudación temprana tenía el doble de chances que la rama tardía de cumplir cada uno de los tres resultados principales (ovocitos maduros, fertilización normal y embriones evolutivos). Los resultados principales,

teniendo en cuenta el agrupamiento del cluster por donante de los ovocitos, se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Resultado principal por el análisis global (cluster donante de ovocitos) Se compara la denudación ovocitaria precoz versus la tardía.

<b>Variable</b>	<b>Razón de Odds</b>	<b>IC95%</b>	<b>p</b>
Ovocitos maduros (MII)	2,085	1,076 a 4,039	0,029
Fertilización normal	1,992	1,240 a 3,199	0,004
Embriones evolutivos	1,995	1,282 a 3,104	0,002

En un análisis secundario para evaluar la robustez de los resultados, estimamos los mismos resultados según una interpretación biológica reproductiva, observando que los resultados a favor de la denudación ovocitaria temprana se mantienen con respecto a la maduración y existe una tendencia en fertilización y embrión evolutivo. El OR de denudación temprana sobre la maduración fue 2,184 (IC95% 1,127- 4,233), p 0,021, sobre fertilización 1,746 (IC95% 0,967- 3,153) p 0,064, sobre embrión evolutivo OR 1,818 (IC95% 0,889- 3,716) p 0,101. Las tablas 4 y 5 muestran el detalle de los resultados para fertilización y evolución embrionaria, respectivamente.

**Tabla 4.** Resultados para fertilización según interpretación biológica reproductiva (procedimiento efectivamente realizado).

<b>Fertilización (cantidad de pronúcleos)</b>	<b>Denudación temprana (n=175)</b>	<b>Denudación tardía (n=155)</b>	<b>p</b>
0 (no fertilizado)	15 (8,57%)	12 (7,74%)	0,015 *
1	1 (0,57%)	4 (2,58%)	
2 (fertilización normal)	152 (86,86%)	123 (79,35%)	
3	3(1,71%)	1 (0,65%)	
4	4 (2,29%)	15 9,68%)	

\*Test de Chi<sup>2</sup> global, Fisher's exact test. Cantidad de pronúcleos 0 no fertilizado, 1, 3 y 4 fertilización anormal, 2 fertilización normal

**Tabla 5.** Resultados para evolución embrionaria según interpretación biológica reproductiva (procedimiento efectivamente realizado).

<b>Evolución embrionaria</b>	<b>Denudación temprana (n=152)</b>	<b>Denudación tardía (n=124)</b>	<b>p</b>
0 No evolutivo	0 (0,00%)	2 (1,61%)	0.006*
1 mala calidad	20 (13,16%)	23 (18,55%)	
2 buena calidad	41 (26,97%)	20 (16,13%)	
3 muy buena calidad	55(36,18%)	62 (50,00%)	
4 excelente calidad	36 (23,68%)	17 (13,71%)	

\*Test de Chi<sup>2</sup> global, Fisher´s exact test

En el análisis considerando la variable instrumental, se mantiene el beneficio de la denudación temprana sobre fertilización y embrión evolutivo, considerando la rama de asignación como variable instrumental y la maduración como variable instrumentada. La razón de odds de denudación temprana para la fertilización normal fue de 5,861 (IC95% 1,643 a 20,906), p 0,006. Para embrión evolutivo, la razón de odds fue de 4,283 (IC95% 1,482 a 12,375), p 0,007.

#### 4. **Discusión**

Resumen de los resultados

En el presente estudio, los resultados de madurez, fertilización y evolución embrionaria inicial fueron superiores con la denudación temprana de los óvulos previo al ICSI en forma significativa. Esto fue así no solo en el análisis global, sino también en el biológico y el instrumental de variables intermedias, controlando posibles desvíos en la interpretación de los efectos.

Posibles explicaciones:

El trabajo presenta resultados categóricos y disímiles a gran parte de la bibliografía que aborda el tema. Es posible que estos resultados distintos se pongan en relieve por las características propias del ensayo, el enfoque metodológico, el hecho de haber analizado el comportamiento de e óvulos “hermanos “con comportamiento similar, y en mujeres sin dificultades reproductivas, tratando de homologar lo que sucedería en la fisiología. Todos estos puntos conforman la fortaleza del protocolo.

Desde la interpretación fisiológica, durante la ovogénesis y la foliculogénesis, existe una conexión dinámica intrínseca que permite el desarrollo de los gametos dentro de la gónada. Tanto en el mantenimiento de los folículos en estado quiescente, como en su activación y desarrollo a estructuras foliculares activas preovulatorias, actúa un complejo sistema de señales biomecánicas, donde participan hormonas en forma intrácina y parácina, factores de crecimiento, fuerzas mecánicas y cambios osmolares, necesarios en el desarrollo de la tensión cortico-medular en la disposición de los folículos.(4)

El pico de LH que precede al evento ovulatorio induce a las células foliculares a la síntesis de plasmina y metaloproteinasas para degradar la matriz extracelular y facilita el reposicionamiento en la superficie cortical del folículo para su expulsión, donde colaboran la Endotelina 2 y PGF 2 alfa. Una vez expulsado el óvulo, se desarrolla el cuerpo lúteo con la invasión de micro capilares desde las células de la teca, adentrándose en las células foliculares, acercando precursores para la biosíntesis hormonal. Paralelamente, se reanuda la meiosis con la expulsión del primer cuerpo polar, reduce su carga genética, completando luego la segunda meiosis con la fertilización y salida del segundo cuerpo polar.

El proceso sincrónico de madurez núcleo citoplasmática determina la competencia del ovocito y es un proceso dependiente del pico de LH de mitad de ciclo. (33) Estos procesos complejos se desarrollan con una interacción permanente, sincronizada y activa de señales entre ovocito y sus células foliculares a través de uniones estrechas, como proyecciones trans-zonales (10), que permiten el contacto físico permanente entre estas estructuras. En los ciclos estimulados, la madurez nuclear se presenta en forma asincrónica con respecto a la citoplasmática (12) y esto podría limitar los procesos de activación ovocitaria y fertilización.

Los supuestos en común que han movilizado a la gran mayoría de los estudios, inclusive este, fundamentan que el contacto estrecho entre los ovocitos y sus células foliculares previo al FIV o ICSI, mantiene el intercambio activo metabólico y contribuye a la capacitación nucleocitoplasmática que se evidencia en mejora de resultados clínicos. Pero ¿por cuánto tiempo?

#### Comparación con otros estudios internacionales

Distintos estudios han intentado definir el tiempo óptimo para la remoción de las células foliculares previo al ICSI, sin lograr consenso ya que los resultados son contradictorios.

En unos de los primeros trabajos, Rienzi y col. (21) examinaron en forma retrospectiva los resultados en fertilización, desarrollo embrionario inicial y tasa de implantación posterior al ICSI en 95 pacientes, segmentando el período de incubación cada tres horas (3, 3-6 horas, 6-9 horas, 9-12 horas y mayor a 12 horas). Concluyeron que al menos debería preincubarse el ovocito durante 3 horas, y que el período óptimo se encuentra entre las 3 y las 12 horas, donde particularmente la maduración citoplasmática terminaría de tener lugar. No encontraron diferencias entre los subgrupos de horarios analizados en implantación ni en tasas de embarazo.

En el 2001, el trabajo de Hassan y col (34) con un ensayo clínico aleatorizado y controlado, explica que mantener el contacto de las células del cummulus con el ovocito en un lapso mayor o igual a 4 horas, en comparación con la inmediata denudación e ICSI, proporciona una mayor tasa de madurez, de fertilización, clivaje embrionario y llegada a blastocisto. En este trabajo, el grupo analizado fueron pacientes estériles, y con factor masculino severo, aunque no describen claramente los criterios de inclusión/exclusión. Si bien los ovocitos fueron randomizados para la denudación en tres tiempos distintos, no lograron determinar si las diferencias a favor de preincubar el ovocito en forma prolongada, se relacionaba con el estímulo implementado o asociado con el horario de descarga de HCG.

Los resultados en nuestro trabajo fueron opuestos. Manteniendo la línea de interpretación, consideramos que el tiempo de la descarga hasta la recolección de óvulos, sufrió mínimas variaciones, en minutos y además se utilizó agonistas de GnRH, con vida media corta, y acción a través de la LH endógena<sup>2</sup>.

En el diseño de este protocolo, la aleatorización de los ovocitos se realizó una vez asignados los mismos a ser fertilizados con una misma muestra seminal. Es decir, el diseño contempló la forma de controlar los efectos posibles desvíos introducidos al usar distintas muestras seminales.

En el ensayo clínico de Mizuno (18), al momento de aplicación de HCG, 53 pacientes fueron aleatorizadas en dos ramas. En las pacientes de la primera rama, sus ovocitos recuperados de la punción, previo al ICSI, se desnudaron a los 30 minutos mientras las pacientes aleatorizadas a la segunda rama, a las 2 horas. No encuentra diferencias en madurez ovocitaria, y en fertilización. Encuentra diferencias en desarrollo de blastocistos de buena calidad para el grupo de denudación tardía, pero sin diferencias en la tasa de embarazo entre ambos grupos.

La intervención en nuestro trabajo fue directamente sobre óvulos, pertenecientes a una misma cohorte, de un mismo ciclo, de una misma paciente. Esto destaca el comportamiento ovocitario según la intervención propuesta, reduciendo al mínimo los sesgos que pueden desviar la interpretación de los resultados: por ejemplo, distintas muestras seminales.

Por otro lado, el trabajo fue más allá y buscó marcar un horario a las 4 horas para recalcar el impacto posible de un periodo de tiempo prolongado.

Las variantes en los diseños metodológicos y la unidad de análisis es otro de los factores que aportan confusión a la hora de arribar a conclusiones.

En el trabajo retrospectivo de Isiklar y cols (22), analiza ciclos de primeros ICSI de parejas, segmentados por horario de inyección. Su estudio encontró una asociación positiva entre la tasa de madurez ovocitaria, fertilización y calidad embrionaria con un periodo de preincubación mayor.

---

<sup>2</sup> En nuestro trabajo se administraron en las pacientes, agonistas de GNRH como fármaco de elección para descarga endógena de LH, para desencadenar el proceso ovulatorio fisiológico.

Otro estudio retrospectivo como el de Ping-Ho y col. (35) describió que un periodo de incubación mayor a 2,5 hs previo al ICSI o FIV, aumenta la tasa de MII disponibles para el procedimiento de alta complejidad y la tasa de fertilización en la fertilización in vitro (FIV) pero, sin cambios significativos para el ICSI.

Por otro lado, otros trabajos retrospectivos, como ofrecido por Van de Velde (25)(36) expresa que las células foliculares no tienen influencia sobre los resultados posteriores al ICSI, que el tiempo de preincubación de los ovocitos junto a sus células foliculares es innecesario; y que, la madurez nuclear es solo suficiente para la fertilización.

A similares conclusiones arriba Yaganida (26) y Jacobs (27) quienes no evidenciaron diferencias significativas en un grupo similar de pacientes, al analizar retrospectivamente la fertilización, desarrollo embrionario, implantación y en resultados clínicos como la tasa de embarazo, entre diferentes periodos de incubación.

En un análisis detallado, con interpretación desde la ciencia básica, Wu y colaboradores (19) profundizaron sobre el efecto de la edad en mujeres estériles y donantes, sobre las células de la granulosa.

Estos autores, examinaron el microambiente de las células foliculares a través de la expresión de genes relacionados con la actividad gonadotrófica, la esterodogénesis, la apoptosis y la luteinización a través de PCR de tiempo real. Estos procesos se evaluaron en tres grupos: donantes (jóvenes no estériles), pacientes infértiles de mediana edad, y pacientes infértiles mayores de 43 años.

A través de sus resultados, los autores concluyeron que la expresión génica, la proliferación, la apoptosis y la capacidad de responder a la estimulación con gonadotrofinas en células de la granulosa humanas, se encontraban afectadas conforme la edad avanza de un modo significativo, acompañado de una luteinización temprana, desadaptada del ciclo.

La interpretación y análisis del trabajo de Wu muestra una posible respuesta desde lo molecular y biológico, a la diferencia de nuestros resultados al compararlos con los de otros estudios. Si el microambiente folicular estuviese modificado a medida que aumenta la edad, particularmente en mujeres estériles, sería plausible que este efecto no se observe en nuestro estudio, donde fueron los ovocitos de mujeres jóvenes no estériles (donantes), a diferencia de intervenciones en poblaciones infértiles de otros trabajos clínicos.

En esta línea, otros autores extrapolaron sus observaciones de modelos animales (ratones) donde el contacto extendido con las células foliculares, inducen cambios apoptóticos a la diada cumulus – ovocito, y envejecimiento acelerado del óvulo tanto in vitro como in vivo. Estos autores justifican la denudación temprana y el ICSI inmediatamente posterior, tan pronto como sea posible para evitar este efecto deletéreo.(23,24)

Parcialmente Patrat y cols (37) destaca también la inmediatez del ICSI ni bien es desnudado el ovocito, pero jerarquiza el tiempo de incubación previa como factor relevante. En este análisis



retrospectivo, discriminaron el tiempo HCG-recolección, tiempo de incubación de ovocitos y tiempo hasta el ICSI.

Los datos de la investigación realizada , en distintos modos de análisis, por rama de aleatorización, por sentido biológico e incluyendo el posible efecto de variable instrumental, destaca que el tiempo acortado de persistencia y contacto ovulo-las células foliculares, y la remoción rápida de las mismas presentaron mejores resultados.

Los resultados aportados por este estudio, una vez más, contribuyen al conflicto con lo reportado en la literatura. Las discrepancias con otros estudios, refleja la heterogeneidad metodológica, con análisis en cohortes retrospectivas, poblaciones no comparables, uso disimiles de calidades seminales, y particularmente el análisis de los tiempos de incubación, no fue comparable en la mayoría de los casos. Los periodos de incubación variaron entre una hora, dos horas y media hasta observaciones realizadas a las 12 horas. (21)

El contraste entre los resultados de este estudio y los publicados en la literatura, pueden ser también los mismos factores que son considerados una fortaleza de este estudio. Por un lado, el comportamiento de los óvulos analizados proviene de donantes jóvenes, sin patología previa y con fertilidad probada. La elección de este grupo modelo creemos que representa con mayor fidelidad lo que sucede en parejas sin dificultades reproductivas.

Si el efecto de la edad de la mujer (“ovarian aging”), compromete el metabolismo y microambiente folicular, y es plausible que no lo encontremos disfunción en los ovocitos de nuestra población analizada y sí, en los otros estudios clínicos. (19,23)

Por otro lado, el estudio se llevo adelante como prospectivo aleatorizado, con la particularidad, que la randomización se efectuó luego de la asignación de un numero de ovocitos a una pareja, los cuales todos han sido inseminados por la misma muestra seminal por caso. Esto es un punto clave, donde se asume el control de variables como la muestra seminal que podrían haber influenciado en el resultado.

Dentro del diseño metodológico, se ha jerarquizado haber considerado el posible comportamiento entre “ovocitos hermanos “o provenientes de una misma cohorte, donde la intervención sobre los mismos es temporal. El ajuste por paciente donante por efecto” clúster”, es fundamental a la hora de analizar resultados, por su posible efecto en la interpretación de los resultados.

La intervención supuso una diferencia horaria de 4 horas entre los dos momentos de análisis. Esta diferencia es significativa y podría cambiar el orden y los tiempos de trabajo en el laboratorio.

Otro punto de fortaleza del estudio consistió en el análisis doble ciego de los biólogos intervinientes y en el medico.

Finalmente, la selección de los embriones para su posterior trasferencia fue hecha según los criterios habituales morfológicos y de dinámica embrionaria acorde en el desarrollo hasta el día 3.

## Limitaciones

En este estudio la observación en la evolución embrionaria se limitó hasta el día 3. Son reconocidas las ventajas en términos de tasa de implantación, de embarazo y recién nacido vivo que ofrecería la transferencia en día 5 versus la transferencia en día 3 (38), así como la posibilidad de análisis genético de screening pre-implantatorio en día 5.

Sin embargo, la transferencia en día 3 hoy continúa siendo un procedimiento estándar en gran parte de las clínicas de reproducción asistida. No todos los laboratorios de alta complejidad tienen un buen programa de llegada a blastocisto (día 5). Y, además, desde el punto de vista clínico, forzar la transferencia solo en día 5, aumenta la tasa de cancelación de los ciclos y el número de los ciclos sin transferencia efectiva.

La cancelación de la transferencia y ciclos se asocia a frustración, efectos psicológicos en la pareja, y aumento de la tasa de abandono de los tratamientos; además de un alto costo para particulares, financiadores y sistemas de salud.

El número de ovocitos totales recuperados y particularmente los MII, se asocia en forma directa con la tasa acumulativa de recién nacido vivo por ciclo iniciado. Este indicador de eficiencia clínica suma la probabilidad de recién nacido vivo con embriotransferencia en fresco y la probabilidad con embriotransferencia de embriones congelados. (1–3)

Los ovocitos maduros habilitan la fertilización y desarrollo embrionario y pueden congelarse para su uso diferido en programas de crío preservación. Los ovocitos son vitrificados una vez desnudos de sus células foliculares.

Nuestros resultados demuestran que la intervención en la denudación de los ovocitos a los 30 minutos se asocia significativamente a una tasa mayor de ovocitos maduros, con todo el enorme potencial clínico que implica.

Para el laboratorio y para la investigación, los resultados de nuestro trabajo contribuyen a pensar una nueva planificación en el tiempo de intervención de las prácticas habituales.

Nuestra evidencia, basada en fortalezas del diseño y modo de nuestro estudio, propone en las mejores condiciones controladas, a la denudación temprana como una intervención clave que impacta en los resultados clínicos.

## 5. Conclusión

El menor tiempo de incubación (30 minutos) y denudación con ICSI inmediatamente después, mostro en una mayor tasa de madurez ovocitaria, una mayor tasa de fertilización y una mayor tasa de clivaje embrionario temprano.

Estar provisto de un mayor número de embriones competentes, se asociaría a mejor resultados clínicos en término de embarazo evolutivo y recién nacido.

Desde el punto de gestión de actividades y funciones de un laboratorio de alta complejidad, los resultados proveen argumentos para modificar el tiempo dedicado a las practicas, priorizando el desnudamiento temprano de los a fin de tener mejores resultados biológicos.

## Referencias

1. Polyzos NP, Drakopoulos P, Parra J, Pellicer A, Santos-Ribeiro S, Tournaye H, et al. Cumulative live birth rates according to the number of oocytes retrieved after the first ovarian stimulation for in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a multicenter multinational analysis including ~15,000 women. *Fertil Steril*. 2018;110(4):661-670.
2. Venetis CA, Tilia L, Panlilio E, Kan A. Is more better? A higher oocyte yield is independently associated with more day-3 euploid embryos after ICSI. *Hum Reprod*. 2019;34(1):79–83.
3. Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, De Vos M, Tournaye H, et al. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Hum Reprod*. 2016;31(2):370–6.
4. Shah JS, Sabouni R, Cayton Vaught KC, Owen CM, Albertini DF, Segars JH. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(7):1135–48.
5. Bosco L, Chiarelli R, Roccheri MC, Matranga D, Ruvolo G. Relationship between apoptosis and survival molecules in human cumulus cells as markers of oocyte competence. *Zygote*. 2017;25(5):583–91.
6. Borup R, Thuesen LL, Andersen CY, Nyboe-Andersen A, Ziebe S, Winther O, et al. Competence classification of cumulus and granulosa cell transcriptome in embryos matched by morphology and female age. *PLoS One*. 2016;11(4):1–19.
7. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, De Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*. 2002;61(3):414–24.
8. Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril*. 2013;99(4):979–97.
9. Barrett SL, Albertini DF. Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(1):29–39.
10. Albertini DF BS. Oocyte-somatic cell communication. *Reprod Suppl*. 2003;61:49-54.
11. Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(3):284–99
12. Sundstrom S and B.O.Nilsson. "Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycles is asynchronous,." *Hum Reprod*. 1988;3(5):613–619.
13. Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update*. 2018;24(1):1–14.
14. Trounson a O, Mohr LR, Wood C, Leeton JF. Culture and Transfer of Human Embryos. *J*

- Reprod Fertil. 1982;64:258–94.
15. Harrison KL, Wilson LM, Breen TM, Pope AK, Cummins JM, Hennessey JF. Fertilization of human oocytes in relation to varying delay before insemination. *Fertil Steril* 1988;50(2):294–7.
  16. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340(8810):17–8.
  17. de Mouzon J, Chambers GM, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Banker M, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology 2012†. *Hum Reprod*. 2020;35(8):1900–13.
  18. Mizuno S, Ishikawa Y, Matsumoto H, Sato M, Ida M, Fukuda A, et al. The timing of cumulus cell removal for intracytoplasmic sperm injection influences the capability of embryonic development. *Reprod Med Biol*. 2019;18(1):111–7.
  19. Wu YG, Barad DH, Kushnir VA, Lazzaroni E, Wang Q, Albertini DF, et al. Aging-related premature luteinization of granulosa cells is avoided by early oocyte retrieval. *J Endocrinol*. 2015;226(3):167–80.
  20. Bárcena P, Rodríguez M, Obradors A, Vernaev V, Vassena R. Should we worry about the clock? Relationship between time to ICSI and reproductive outcomes in cycles with fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod*. 2016;31(6):1182–91.
  21. Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R, Cerulo G, Greco E. Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13(4):1014–9.
  22. Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Impact of oocyte preincubation time on fertilization, embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(6):682–6.
  23. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: Cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update*. 2009;15(5):573–85.
  24. Qiao TW, Liu N, Miao DQ et al. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor. *Mol Reprod Dev*. 2008;75:521–528.
  25. Van de Velde H, Joris H, Nagy ZP VSA. Effect of timing of oocyte denudation and microinjection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13:3160–3164.
  26. Yanagida K, Yazawa H, Katayose H, Suzuki K, Hoshi K, Sato A. Influence of oocyte preincubation time on fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2223–6.
  27. Jacobs M, Stolwijk AM, Wetzels AMM. The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI. *Hum Reprod*. 2001;16(8):1708–13.
  28. Garor R, Shufaro Y, Kotler N, Shefer D, Krasilnikov N, Ben-Haroush A, et al. Prolonging oocyte in vitro culture and handling time does not compensate for a shorter interval from

- human chorionic gonadotropin administration to oocyte pickup. *Fertil Steril*. 2015;103(1):72–5.
29. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4565–92.
  30. Costello MF, Misso ML, Balen A, Boyle J, Devoto L, Garad RM, et al. Evidence summaries and recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome: assessment and treatment of infertility. *Hum Reprod Open*. 2019;2019(1):1–24.
  31. WHO. World Health Organization Laboratory Manual for Examination of Human Semen, 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
  32. David. K Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles ZS. Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives. Third Edit. Informa Health care, editor. London , UK: Informa UK Ltd.; 2008. 207–255
  33. J. Eppig, R. M. Schultz MO and F. “Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes,.”. *Dev Biol*. 1994;164((1))::pp. 1–9,.
  34. Hassan HA. Cumulus cell contribution to cytoplasmic maturation and oocyte developmental competence in vitro. *J Assist Reprod Genet*. 2001;18(10):539–43.
  35. Ho JYP, Chen MJ, Yi YC, Guu HF, Ho ESC. The effect of preincubation period of oocytes on nuclear maturity, fertilization rate, embryo quality, and pregnancy outcome in IVF and ICSI 1. *J Assist Reprod Genet*. 2003;20(9):358–64.
  36. Dozortsev D, Nagy P, Abdelmassih S, Oliveira F, Brasil A, Abdelmassih V, et al. The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*. 2004;82(6):1492–6.
  37. Patrat C, Kaffel A, Delaroche L, Guibert J, Jouannet P, Epelboin S, et al. Optimal Timing for Oocyte Denudation and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Obstet Gynecol Int*. 2012;2012:1–7.
  38. Glujovsky D, Farquhar C, Am QR, Cr AS, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology ( Review ) 2016;(6).

## Anexos

### Anexo I

#### Definiciones y descripciones de las técnicas:

##### *Definición de ovocitos donados:*

Se definen como ovocitos donados a aquellos que son obtenidos de pacientes que participan en programa de donación de gametos en carácter de donantes. Las pacientes donantes, son pacientes menores de 32 años, sanas, con fertilidad preferentemente probada, que donan sus gametos con fin reproductivo a pacientes que no pueden disponer de sus propios óvulos (receptoras), en forma altruista y voluntaria.

##### *Definición de ovocitos maduros y de ovocitos inmaduros.*

Se definen como ovocitos maduros a aquellos ovocitos que logran finalizar su primera división meiótica y entrar en la segunda división meiótica, como producto de respuesta fisiológica a pico de LH endógeno. Se logran identificar al microscopio, ya que la gameta presenta en la periferia su cuerpo polar extrudado (ovocitos MII).

Se considera ovocitos inmaduros a aquellos ovocitos que no muestran cambios morfológicos de haber ni iniciado (vesícula germinal, VG) ni completado (ovocito MI) la primer división meiótica.

##### *Definición de preincubación del ovocito con células foliculares:*

Se define período de incubación del ovocito con sus respectivas células foliculares o cuumulus folicular, como el tiempo comprendido entre la recuperación del ovocito de la punción y el momento en el que este óvulo es desnudado de las células foliculares que lo rodean

##### *Definición de protocolo de estimulación utilizado en pacientes donantes:*

Todas las pacientes donantes fueron estimuladas con esquema de antagonistas móvil. Recibieron en fase folicular temprana, desde su segundo día del ciclo FSHr (hormona folículo estimulante recombinante, Puregon, laboratorio Organon) en dosis ajustadas en cada caso, entre 175 y 275 UI por día. Se realiza el seguimiento ecográfico y determinación de estradiol correspondiente en el día sexto de estímulo, y ante la presencia de folículos mayores a 14 mm por ecografía y valores próximos de niveles ovulatorios de estradiol, se programa el inicio de los antagonistas de GnRH (cetrorrelix, 0,25 mg/ml, orgalutran , organon) en forma diaria , junto con gonadotrofina menopáusica humana

75 UI /día (HMG, menopur, Ferring).

#### Proceso de descarga y programación temporal de aspiración folicular

El proceso de descarga se refiere al momento final donde se administra una medicación que cumpla con las funciones del pico de LH endógena, pero en los ciclos estimulados.

En todos los casos, los estímulos finalizaron con el uso de agonistas de GNRH como fármaco que desencadene el pico de LH propio de la paciente.

El modo de administración fue 36 horas antes del momento planificado de extracción de óvulos. Esta administración fue con dos aplicaciones juntas de dos jeringas prellenadas de 0,5mg/ml de acetato de leuprolide en forma subcutánea, en el mismo horario.

A modo de refuerzo, 24 horas antes del horario estipulado para la extracción (aspiración) de los ovocitos) se aplica una jeringa prellenada más.

Habitualmente, se programa la descarga ovulatoria, según resultado de monitoreo ecográfico y hormonal, con folículos mayores a 17 mm, con agonistas de GnRH (triptorrelina acetato, Ferring), para evitar posibles complicaciones vinculadas a SHEO, con el fin de lograr la descarga ovulatoria, y madurez ovocitaria.

La punción aspiración folicular, se planificó entre 34 y 36 hs posteriores a la aplicación del agonista de GnRH, que libera gonadotrofinas endógenas y genera el pico de LH en forma fisiológica.

#### Práctica habitual en procedimiento de Alta complejidad:

##### *Descripción de procedimiento de punción aspiración folicular.*

Se realiza la extracción ovocitaria por punción transvaginal bajo ecografía guiada, con anestesia general.

##### *Descripción de preparación seminal previo al ICSI*

Las muestras seminales de la pareja receptora son obtenidas el mismo día de la recuperación ovocitaria de la donante por masturbación, con 2 a 5 días de abstinencia sexual. Luego de la licuefacción, se procesa en un sistema de gradiente decreciente (Puresperm) y se centrifuga. La muestra es evaluada según los criterios últimos de la WHO (World Health Organization , 2010) según movilidad, concentración y morfología.

Se seleccionan del pellet post centrifugado, los espermatozoides de mejor motilidad y morfología para el ICSI.

En casos donde las muestras presentaron en estudios basales altos índices de fragmentación de ADN, se realizará un ultrafiltrado de los espermatozoides a través de procedimiento de



columnas de anexinas (Ver Anexo I. Descripción de técnica de procesamiento de muestra seminal.por columnas de anexina)

*Descripción de procedimiento de ICSI:*

Luego de la obtención de los ovocitos y de un período de incubación variable, los ovocitos son despojados de sus células foliculares por un proceso enzimático de hialuronidasa y luego es completado con un proceso mecánico de extracción de células foliculares con pipeta de vidrio en reiteradas ocasiones, hasta que la zona pelúcida queda liberada de células del cuumulus.

Una vez que se finaliza el período de desnudación de los ovocitos, se realiza inmediatamente la inyección intracitoplasmática de los espermatozoides.

Para el ICSI, se preparan placas de Petri, con 3 o 4 microlitros de medio buffer HEPES y otro con PVP (polyvinylpyrrolidona). Se selecciona el zoide de mejor movilidad y morfología y se carga en la micropipeta de inyección desde su cola hacia su extremo cefálico. Previo a la inyección, se presenta el ovocito metafase II, con su corpúsculo polar en hora 12 ó 6 , se aspira parte de su citoplasma y se reinyecta nuevamente todo junto hacia el interior del óvulo.

La Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides en los ovocitos donados será hecha por un único operador. Un biólogo formado y con experiencia en el laboratorio de alta complejidad, será el encargado de realizar el procesamiento de la muestra seminal, la preparación ovocitaria previa al ICSI según el período de preincubación asignado y la inyección misma del zoide.

*Definición de tasa de fertilización:*

La fertilización de los óvulos por el espermatozoide es evaluada entre las 17 y 18 horas posterior al ICSI, chequeando el número de cuerpos polares y pronúcleos.

Se considera fertilización normal a la presencia de dos cuerpos polares en su zona pelúcida y la presencia de dos pronúcleos en su interior, en aquel huevo donde se realizó el ICSI. La tasa de fertilización es definida como la razón entre el número de cigotos diploides y el número de ovocitos maduros inyectados.

La evaluación de fertilización, clivaje y desarrollo temprano del embrión como así también la valoración de la calidad embrionaria según aspectos morfológicos será realizada por un biólogo diferente al que realizó la preparación de las gametas y el ICSI. Este biólogo con experiencia en laboratorio de alta complejidad y manejo de gametas, se encontrará cegado y sin conocimiento acerca de los distintos períodos de preincubación de los ovocitos previo al ICSI, y sólo evaluará las características del embrión.

*Definición de tasa de clivaje o desarrollo embrionario (cleaving embryo)*

Luego de constatar fertilización, se evaluará el clivaje embrionario temprano a las 25-+ 1 h, luego del ICSI y consiste en la presencia de blastómeras iniciales, producto de la división celular del cigoto. A las 44+\_ 2 hs posterior al ICSI, se continúa evaluando el desarrollo del embrión que fertilizó y clivó posteriormente ya en medio de cultivo.

La tasa de clivaje o desarrollo embrionario se definirá como la razón entre el número de embriones generados y el número de ovocitos maduros inyectados.

#### *Definición de embriones de buena y muy buena calidad.*

La calidad embrionaria se determinará por características morfológicas del embrión, esto es, según el número y el tamaño de las blastómeras (clivaje o división celular irregular, o regular), presencia de multinucleación y cantidad de fragmentos anucleados de las blastómeras.

Según el porcentaje de fragmentación, se dividen en 4 categorías en orden creciente: embriones con alta proporción de fragmentación: aquellos que se encuentran fragmentados en más del 50%, de moderada proporción de fragmentación, entre el 20 y el 50%, poca fragmentación, entre el 1 -20% de fragmentación y los de mejor performance que no contienen fragmentación en su interior.

Se definen como embriones de excelente o muy buena calidad a aquellos que han fertilizado correctamente en el día 1 posterior al ICSI, cuyas divisiones celulares iniciales fueron simétricas y en el día 2 se observan entre 4 y 6 blastómeras regulares de igual tamaño, sin multinucleación y sin fragmentos celulares.

Se define embriones de buena calidad a aquellos que han fertilizado correctamente en el día 1 posterior al ICSI, cuyas divisiones celulares iniciales fueron simétricas y en el día 2 se observan entre 4 y 6 blastómeras, algunas de ellas con cierta irregularidad, de tamaño similar, sin multinucleación y con menos del 20% de fragmentación.

Los embriones elegibles en todos los casos, para ser transferidos a la receptora, serán aquellos que morfológicamente presenten características de embriones de excelente o muy buena calidad y de buena calidad. Los embriones de regular o mala calidad no fueron elegibles y no se realizó su transferencia.

La proporción de embriones elegibles será el número de embriones de excelente, muy buena y de buena calidad, sobre el total de embriones generados.

La transferencia embrionaria se realizó en todos los casos en el día 3 luego de la recolección ovocitaria.

### *Definición de Tasa de implantación, y Tasa de embarazo clínico*

Se define como implantación, a la presencia de hormona Beta HCG circulante en sangre, luego de 12 días de haber sido realizada la transferencia embrionaria.

Tasa de implantación, se define como la razón entre el número de sacos gestacionales visto por ecografía y el número de embriones transferidos.

Se define embarazo clínico, a la presencia de saco gestacional evidenciable por ecografía, con embrión y actividad cardíaca en su interior, como signo de progresión de embarazo inicial. La tasa de embarazo clínico se define como la razón entre el número de embarazos clínicos y el número de embrio-transferencias realizadas.

### *Descripción de procesamiento de muestra seminal por columnas de anexina:*

La muestra una vez procesada por medio de gradiente de densidad se lava con buffer binding y se incuba junto con microperlas de acero con anexina V adherida; esto permite que cuando la muestra se someta al paso por una columna magnética, los espermatozoides que hayan externalizado Fosfatidilserina (fenómeno que se observa en espermatozoides con ADN dañado y en vía de apoptosis) se acoplen por afinidad al complejo anexina y por magnetismo queden atrapadas en la columna. Por lo tanto el fluido de la columna es una muestra enriquecida en espermatozoides con ADN espermático íntegro. .

## **Anexo II**

### Aleatorización y asignación oculta

Luego de que las personas participantes de este estudio dieron su consentimiento informado y se recuperaron los ovocitos, estos fueron aleatorizados mediante un software online y centralizado (<http://protocolos.hospitalitaliano.org.ar>) por el biólogo encargado de denudar los ovocitos y realizar la técnica de ICSI. Esta persona no formaba parte del equipo investigador y no tenía conocimiento de la procedencia o destino de los ovocitos, ni participó de la evaluación posterior de los resultados del estudio. El equipo investigador no participó del proceso de aleatorización y la asignación fue enmascarada. No había forma de predecir la rama a la que el software asignaría cada ovocito.

Ninguno de los investigadores, ya sean médicos o biólogos, que participaron en la atención de las pacientes o en la evaluación de los resultados del estudio tenía conocimiento de la rama asignada a cada ovocito, así como tampoco lo tenían las pacientes enroladas (estudio doble ciego). La única persona que conocía la asignación fue el biólogo que realizó la aleatorización, denudación e ICSI de los ovocitos. Llevaba un registro codificado al que no tenía acceso ninguno de los investigadores ni pacientes.

### Manejo clínico y retiro del estudio

El paciente podía retirarse del estudio en cualquier momento con sólo comunicarlo a los investigadores previo a la inyección de espermatozoides, momento posterior al cual se generaría el cigoto.

Si uno de los pacientes presentara alguna situación puntual que ponga en riesgo la transferencia embrionaria, se procedió a criopreservar el embrión y se programara la transferencia en un momento más adecuado, según el caso.

En caso de generar embriones excedentes, que no son los seleccionados para ser transferidos, ya sean de una rama u otra, se propuso según el caso, dejarlos evolucionar a estadios embrionarios más avanzados de blastocistos (día 5) y congelarlos luego, ó congelarlos directamente en día 3 (mismo día en que se realiza la transferencia). Todos estos procedimientos fueron realizados como se realiza nuestra práctica habitual.

### Daños y complicaciones:

No están registrados daños o complicación producto exclusivamente de la intervención. Es de práctica habitual realizar en forma indistinta ICSI ni bien se recuperan los ovocitos ó más tardíamente, previo a la denudación del ovocito. Este tiempo hoy día es errático y está sujeto a la carga de trabajo del laboratorio.

### Consideraciones éticas:

La participación del estudio fue en todos los casos voluntaria y certificada por el proceso de consentimiento informado.

El estudio se llevó a cabo de en total acuerdo con la normativa nacional e internacional vigente: Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, Disposición 6677/10 de ANMAT, y las Normas de Buenas Prácticas Clínicas ICH E6.

Se respetó en todo momento el derecho a la no participación en el estudio sin que esto implique en ningún caso algún tipo de discriminación, trato diferencial o maltrato.

Todos los datos del estudio fueron tratados con máxima confidencialidad de manera anónima, con acceso restringido sólo para el personal autorizado a los fines del estudio de acuerdo con la normativa legal vigente Ley Nacional de Protección de Datos Personales 25.326 (Ley de Habeas data) [47]