



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

AFINAMIENTO DE LA ZONA PELÚCIDA MEDIANTE  
LÁSER (AZPL) EN CICLOS DE FIV/ICSI  
EN 2 GRUPOS DE EDAD Y SU RELACIÓN  
CON EL GROSOR DE LA ZONA PELÚCIDA

**D<sup>a</sup> BEATRIZ AMOROCHO LLANOS**  
**2015**

“La vida no es lo que uno vivió, sino lo que recuerda y cómo la recuerda, para contarla.”

Gabriel García Márquez



Dra. M<sup>a</sup> Desamparados Mercader Bayarri

Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia. Coordinadora del Departamento de Diagnóstico Genético Preimplantacional, laboratorio de fecundación in vitro, del Institut Universitari - IVI Valencia.

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado "AFINAMIENTO DE LA ZONA PELÚCIDA MEDIANTE LÁSER (AZPL) EN CICLOS DE FIV/ICSI EN 2 GRUPOS DE EDAD Y SU RELACIÓN CON EL GROSOR DE LA ZONA PELÚCIDA", ha sido realizado íntegramente por Beatriz Amorocho Llanos, bajo mi dirección. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al título de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, a 15 de septiembre de 2015

Fdo. Dra M<sup>a</sup> Desamparados Mercader Bayarri

# INDICE





<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>SUMMARY</b> .....	12
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	15
1.1 LA ZONA PELÚCIDA.....	16
1.1.1 Origen y Formación.....	16
1.1.2 Estructura y composición de la zona pelúcida.....	17
1.1.3 Función de la zona pelúcida.....	21
1.1.4 Endurecimiento de la zona pelúcida.....	23
1.1.5 Grosor de la zona pelúcida.....	25
1.1.6 Efecto de la criopreservación en la zona pelúcida.....	27
1.2 FECUNDACIÓN.....	27
1.2.1 Unión óvulo-espermatozoide y su relación con la zona pelúcida.....	27
1.2.2 Reacción cortical Unión óvulo-espermatozoide y su relación con la zona pelúcida.....	28
1.3 DESARROLLO PRE-EMBRIONARIO Y SU RELACIÓN CON LA ZONA PELÚCIDA.....	31
1.3.1 Día 2 y Día 3 y su relación con la zona pelúcida.....	31
1.3.2 Mórula y estadios del blastocisto relacionados con la zona pelúcida.....	35
1.4 ECLOSIÓN PRE-EMBRIONARIA.....	40
1.5 IMPLANTACIÓN PRE-EMBRIONARIA.....	41
1.6 ESTRATEGIAS PARA POTENCIAR LA ECLOSIÓN PRE-EMBRIONARIA IN VITRO: ECLOSIÓN ASISTIDA.....	42
1.6.1 Técnica no invasiva: tratamiento enzimático.....	44
1.6.2 Técnicas invasivas: química y mecánica.....	45
1.6.2.1 Digestión química con solución ácida de tyrode.....	45
1.6.2.2 Disección mecánica parcial de la ZP (PZD).....	46
1.6.2.3 Disección parcial alargada de la ZP (LZD).....	47
1.6.2.4 Piezomanipulación.....	48
1.6.2.5 Disección de la ZP con láser.....	49
1.6.2.6 Eclosión asistida total mediante láser (EATL).....	49
1.6.2.7 Afinamiento de la zona pelúcida mediante láser (AZPL).....	51

1.6.2.8 Expansión mecánica.....	53
1.7 ECLOSIÓN ASISTIDA (EA) RELACIONADO CON MUJERES DE EDAD MATERNA AVANZADA.....	54
1.8 RIESGO DE GEMELARIDAD.....	55
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	58
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	59
3.1 ÁMBITO DE ESTUDIO.....	60
3.2 GRUPOS DE ESTUDIO.....	60
3.2.1 Criterios de inclusión.....	61
3.2.2 Criterios de exclusión.....	63
3.2.3 Base de datos.....	63
3.3 METODOLOGÍA.....	63
3.3.1 Estimulación.....	63
3.3.2 Punción folicular.....	63
3.3.3 Fecundación.....	64
3.3.4 Desarrollo pre-embriionario hasta día 3.....	65
3.3.5 Selección pre-embriionaria para la transferencia.....	65
3.3.6 Técnica de afinamiento de la zona pelúcida mediante láser (AZPL).....	66
3.3.7 Transferencia pre-embriionaria.....	69
3.3.8 Análisis de las imágenes capturadas .....	69
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO GRUPO NO- AZPL/AZPL RESPECTO A EDADES Y GROSOR DE ZONAS PELÚCIDAS PRE-EMBRIONARIAS.....	71
3.4.1 Tamaño muestral y variables.....	71
3.4.2 Análisis descriptivo de la correlación de los resultados de los distintos grupos según se haya realizado o no el AZPL.....	72
<b>4 RESULTADOS</b>	
4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR EN TRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR LA APLICACIÓN O NO DE LA TÉCNICA DE ESTUDIO .....	74
4.2.1 Grupo 38-39 años.....	75

4.2.2	Grupo $\geq 40$ años.....	75
4.2	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADOS POR EDADES.....	75
4.3	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR LAS EDADES Y EL ORIGEN DE LOS OVOCITOS (FRESCOS, VITRIFICADOS O MIXTOS).....	77
4.3.1	Ovocitos frescos.....	77
4.3.2	Ovocitos vitrificados.....	80
4.3.3	Ovocitos mixtos.....	82
4.4	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR LAS EDADES Y EL TRATAMIENTO (FIV, ICSI).....	84
4.4.1	FIV.....	85
4.4.2	ICSI.....	88
4.4.3	FIV-ICSI.....	90
4.5	RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES DE 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON EL ORIGEN DE LOS OVOCITOS...	91
4.6	RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES DE 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON TRATAMIENTO DE FECUNDACIÓN IN VITRO UTILIZADO.....	92
4.7	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR GROSOR DE ZONAS PELÚCIDAS Y EDADES.....	93
4.7.1	ZP $\geq 15 \mu\text{m}$ .....	93
4.7.2	ZP $< 15 \mu\text{m}$ .....	96
4.8	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR GROSOR DE LAS ZONAS PELÚCIDAS Y ORIGEN DE OVOCITOS (FRESCOS, VITRIFICADOS O MIXTOS).....	99

4.8.1 Ovocitos frescos $\geq 15\mu\text{m}$ .....	99
4.8.2 Ovocitos frescos $< 15\mu\text{m}$ .....	102
4.8.3 Ovocitos vitrificados $\geq 15\mu\text{m}$ .....	105
4.8.4 Ovocitos vitrificados $< 15\mu\text{m}$ .....	107
4.8.5 Ovocitos mixtos $\geq 15\mu\text{m}$ .....	109
4.8.6 Ovocitos mixtos $< 15\mu\text{m}$ .....	110
4.9 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR EN TRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR GROSOR DE LAS ZONAS PELÚCIDAS Y EL TRATAMIENTO (FIV, ICSI O FIV-ICSI).....	111
4.9.1 FIV $\geq 15\mu\text{m}$ .....	111
4.9.2 FIV $< 15\mu\text{m}$ .....	113
4.9.3 ICSI $\geq 15\mu\text{m}$ .....	114
4.9.4 ICSI $< 15\mu\text{m}$ .....	117
4.9.5 FIV-ICSI $\geq 15\mu\text{m}$ .....	119
4.9.6 FIV-ICSI $< 15\mu\text{m}$ .....	120
4.10 RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES DE 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON EL GROSOR DE LA ZONA PELÚCI- DA $\geq 15\mu\text{m}$ .....	121
4.11 RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES DE 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON EL GROSOR DE LA ZONA PELÚCIDA $< 15\mu\text{m}$ .....	121
<b>5 DISCUSIÓN</b> .....	122
<b>6 CONCLUSIONES</b> .....	130
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	132
<b>8 ABREVIATURAS</b> .....	147
<b>9 AGRADECIMIENTOS</b> .....	151

# RESUMEN

**Introducción:**

La zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular transparente que rodea la membrana plasmática de los ovocitos de los mamíferos. Para que se produzca la implantación, es necesaria la completa expansión del blastocisto, acompañado por el afinamiento de la ZP y la eclosión del pre-embrión favorecida por la disolución de la ZP. Sin embargo, este proceso no siempre sucede, y si el blastocisto no puede salir de la ZP no será posible que se produzca la implantación.

Durante las dos décadas pasadas, se han utilizado diferentes métodos para la manipulación de la ZP en mujeres de edad avanzada (Balaban et al., 2002). Una revisión sistemática (Das et al., 2009), revela que la Eclosión asistida (EA), puede incrementar las tasas de éxito en mujeres con fallo de implantación y probablemente en edad avanzada, pero se debe analizar con más profundidad los datos obtenidos respecto a las tasas de gestación múltiple. Parece ser que, tanto la edad avanzada como el cultivo in vitro de los pre-embriónes pueden causar un endurecimiento de la ZP haciendo necesaria la aplicación de la técnica de EA para facilitar la eclosión de los blastocistos, para aumentar las tasas de gestación e implantación (Magli et al., 1998).

**Objetivos:**

Objetivo principal: analizar si la aplicación del afinamiento de la zona pelúcida (AZPL) es una herramienta útil para aumentar la tasa de gestación en pacientes que se sometan a un TRA, en ciclos de FIV/ICSI, según edad de la paciente (38-39 años y  $\geq$  a 40 años) y según grosor de la ZP ( $< 15\mu\text{m}$  y  $\geq 15\mu\text{m}$ ).

Objetivos secundarios: analizar si la aplicación del AZPL es una herramienta útil para aumentar las tasas de implantación y RNV y disminuir la tasa de aborto, RNV en pacientes que se sometan a TRA, en ciclos de FIV/ICSI, (38-39 años y  $\geq 40$  años) y según grosor de la ZP ( $< 15\mu\text{m}$  y  $\geq 15\mu\text{m}$ ).

**Materiales y Métodos:**

Este estudio retrospectivo se realizó en IVI-Murcia, entre Marzo del 2006 y Diciembre del 2012.

Consta de 308 ciclos que fueron distribuidos, de forma aleatoria, en 2 grupos según se realizara o no AZPL:

A: 154 ciclos en los que no se realizó el AZPL (No-AZPL) a los pre-embriónes.

B: 154 ciclos en los que sí se les realizó el AZPL (AZPL) a los pre-embriónes.

Estos 2 grupos se subdividieron, según edad, en: 38-39 años y  $\geq 40$  años:

-Pacientes con 38-39 años, a cuyos pre-embriónes no se les realizó el AZPL: No-AZPL 38-39 años.

-Pacientes con 38-39 años, a los que sí se les realizó AZPL: AZPL 38-39 años.

-Pacientes con edad  $\geq 40$  años sin AZPL: No-AZPL  $\geq 40$  años.

-Pacientes con edad  $\geq 40$  años con AZPL: AZPL  $\geq 40$  años.

El grosor de la ZP fue analizado y dividido en:

A: pre-embriónes cuyo grosor medio de la ZP fuera  $\geq 15\mu\text{m}$ .

B: pre-embriónes con diámetro medio de la ZP  $< 15\mu\text{m}$ .

A su vez, estos grupos fueron analizados, evaluando el impacto del AZPL, según la edad: 38-39 años y  $\geq 40$  años.

-Pacientes con 38-39 años con pre-embriónes con: ZP  $< 15\mu\text{m}$  y ZP  $\geq 15\mu\text{m}$ .

-Pacientes  $\geq 40$  años con pre-embriónes con: ZP  $< 15\mu\text{m}$  ZP  $\geq 15\mu\text{m}$ .

A cada pre-embrión a transferir, en D3, se le realizó un AZP utilizando el sistema Octax láser shot (MTG-Octax Alemania), cuando le correspondía el AZPL.

El análisis estadístico se realizó con el test de Fisher. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando se obtuvo un valor de  $P < 0.05$ .

**Resultados globales de AZPL y No-AZPL en mujeres  $\geq 38$  años**

	No-AZPL 38-39	AZPL 38-39	No-AZPL $\geq 40$	AZPL $\geq 40$
<b>Tasa Gestación</b>	32,1	<b>46,9*</b>	24,4	22,4
<b>Tasa Implantación</b>	20,8	<b>35,0*</b>	16,4	14,0
<b>Tasa Aborto</b>	20,0	26,7	45,4	46,2
<b>Tasa RNV</b>	26,7	<b>42,7*</b>	15,5	13,8
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	5,7	17,7	9,1	7,7

\*p&lt;0,05

**Resultados globales de AZPL y No-AZPL con ZP  $\geq 15\mu\text{m}$** 

	No-AZPL 38-39	AZPL 38-39	No-AZPL $\geq 40$	AZPL $\geq 40$
<b>Tasa Gestación</b>	30,2	<b>50,8*</b>	40,0	23,1
<b>Tasa Implantación</b>	21,5	<b>38,8*</b>	23,8	15,6
<b>Tasa Aborto</b>	21,7	20,0	40,0	55,5
<b>Tasa RNV</b>	26,3	<b>50,8*</b>	28,0	12,8
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	13,0	20,0	0	11,1

\*p&lt;0,05

**Conclusiones:**

En pacientes de 38-39 años: Las tasas de gestación e implantación obtenidas son significativamente superiores ( $p<0,05$ ) cuando se realiza el AZPL, en ovocitos frescos cuyas ZPs son  $\geq 15\mu\text{m}$ , al compararlas con pacientes en las que no se ha aplicado el AZPL a sus pre-embriones antes de la transferencia.

La tasa de aborto no se ve afectada cuando se aplica el AZPL a los pre-embriones antes de la transferencia.

La tasa de RNV obtenida es significativamente superior ( $p<0,05$ ) cuando se realiza el AZPL, en ovocitos frescos cuyas ZPs son  $\geq 15\mu\text{m}$  al compararlas con pacientes en las que no se ha aplicado el AZPL a sus pre-embriones antes de la transferencia.

No hay diferencias estadísticamente significativas en las tasas de gestación gemelar obtenidas en los subgrupos de este grupo de edad.

Palabras clave: zona pelúcida, edad materna avanzada, gestación, tratamiento de reproducción asistida, eclosión asistida, afinamiento de la zona pelúcida mediante láser.



# SUMMARY

### Introduction:

The zona pellucida (ZP) is a transparent extracellular matrix surrounding the oocyte plasma membrane of mammals. In order for implantation to occur, the full expansion of the blastocyst, accompanied by thinning of the ZP and the emergence of pre-embryo favored by the dissolution of the ZP is necessary. However, this process does not always happen, and if the blastocyst can not leave the ZP, it would not be possible for the implantation to occur.

Over the last two decades, different methods have been used for handling the ZP in old women (Balaban et al., 2002). A systematic review (Das et al., 2009) reveals that assisted hatching (AH), can increase success rates in women with implantation failure and probably old women, but the data of rates of multiple pregnancy must be analysed more deeply.

It seems that the advanced age and the in vitro culture of the pre-embryos can cause hardening of the ZP, so making the application of Assisted hatching (AH) technique to facilitate the hatching of blastocysts necessary, and then to increase pregnancy rates and implantation (Magli et al., 1998).

### Objectives:

Main objective: to analyse whether the application of laser assisted zona thinning (LAZT) is a useful tool to increase the pregnancy rate in patients who undergo in ART, in cycles of IVF/ICSI, according to patient age (38- 39 years and  $\geq 40$  years) and thickness according to ZP ( $<15 \mu\text{m}$  and  $\geq 15 \mu\text{m}$ ).

Secondary objectives: to analyse whether the application of AZPL is a useful tool to increase implantation rates, LB in patients undergoing ART, and decrease miscarriages rates in cycles of IVF / ICSI (38-39 years and  $\geq 40$  years) and according to ZP thickness ( $<15 \mu\text{m}$  and  $\geq 15 \mu\text{m}$ ).

### Materials and Methods:

This retrospective study was performed in IVI-Murcia, between March 2006 and December 2012.

It consists of studying 308 cycles which were distributed randomly in 2 groups as placed or not LAZT:

A: 154 cycles in which the LAZT (Non- LAZT) is not performed on pre-embryos.

B: 154 cycles in those that underwent the LAZT on pre-embryos.

These two groups were subdivided according to age, in: 38-39 years rank and  $\geq 40$  years rank:

- Patients with 38-39 years, whose pre-embryos underwent the LAZT: No- LAZT 38-39 years.
- Patients with 38-39 years, who underwent yes LAZT: LAZT 38-39 years.
- Patients with age  $\geq 40$  years without LAZT: No- LAZT  $\geq 40$  years.
- Patients aged  $\geq 40$  years with LAZT: LAZT  $\geq 40$  years.

The thickness of the ZP was analysed and divided into:

A: pre-embryos whose average thickness was  $\geq 15 \mu\text{m}$  ZP.

B: pre-embryos ZP average diameter of  $<15 \mu\text{m}$ .

And in turn, these groups were analysed, evaluating the impact of LAZT, according to age: 38-39 years and  $\geq 40$  years.

- Patients with 38-39 years with pre-embryos: ZP  $<15 \mu\text{m}$  and  $15 \mu\text{m} \geq \text{ZP}$ .
- Patients  $\geq 40$  years with pre-embryos: ZP  $<15 \mu\text{m}$  and ZP  $\geq 15 \mu\text{m}$ .

To each pre-embryo transfer, in D3, was performed a LAZT OCTAX system using laser shot (MTG-OCTAX Germany), when belonging to LAZT.

Statistical analysis was performed using Fisher's test. The results were considered statistically significant when  $P < 0.05$  was obtained.

**Overall results of LAZT and Non- LAZT in women  $\geq 38$  years**

	No- LAZT 38-39	LAZT 38-39	No- LAZT $\geq 40$	LAZT $\geq 40$
<b>Pregnancy rate</b>	32,1	<b>46,9*</b>	24,4	22,4
<b>Implantation rate</b>	20,8	<b>35,0*</b>	16,4	14,0
<b>Abortion rate</b>	20,0	26,7	45,4	46,2
<b>LB rate</b>	26,7	<b>42,7*</b>	15,5	13,8
<b>Twins Pregnancy rate</b>	5,7	17,7	9,1	7,7

\*p&lt;0.05

**Overall results of LAZT and Non- LAZT in women  $\geq 38$  years with ZP  $\geq 15\mu\text{m}$** 

	No- LAZT 38-39	LAZT 38-39	No- LAZT $\geq 40$	LAZT $\geq 40$
<b>Pregnancy rate</b>	30,2	<b>50,8*</b>	40,0	23,1
<b>Implantation rate</b>	21,5	<b>38,8*</b>	23,8	15,6
<b>Abortion rate</b>	21,7	20,0	40,0	55,5
<b>LB rate</b>	26,3	<b>50,8*</b>	28,0	12,8
<b>Twins Pregnancy rate</b>	13,0	20,0	0	11,1

\*p&lt;0.05

**Conclusions:**

In patients from 38 to 39 years old:

The pregnancy and implantation rates obtained are significantly higher ( $p < 0.05$ ) when the LAZT is done in fresh oocytes which are  $\geq 15\mu\text{m}$  ZPS, when it is compared with patients that have not been applied LAZT their pre-embryos before transfer.

The abortion rate is not affected when the LAZT is applied to pre-embryos before embryo transfer.

RNV obtained rate is significantly higher ( $p < 0.05$ ) when the LAZT is performed in fresh oocytes which are ZPs  $\geq 15\mu\text{m}$  as compared to patients where it has not been applied LAZT their pre-embryos prior to transfer.

No statistically significant differences in twin pregnancy rates are obtained from sub-groups of this age group.

Key words: zona pellucida, advanced maternal age, pregnancy, assisted reproduction treatment, assisted hatching, laser assisted zona thinning.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ZONA PELÚCIDA

### 1.1.1 Origen y Formación

Durante el crecimiento del folículo ovárico, los ovocitos de los mamíferos comienzan a rodearse de una capa denominada zona pelúcida (ZP) (Bleil *et al.*, 1980). El nombre proviene del latín, y significa cinturón o cintura (zona) transparente (pelúcida). Como su nombre indica, la ZP es una matriz extracelular transparente que rodea la membrana plasmática de los ovocitos de los mamíferos. Constituye una capa homogénea que separa el oolema de la región más interna de las células foliculares que es la corona radiata (Fig. I-1).

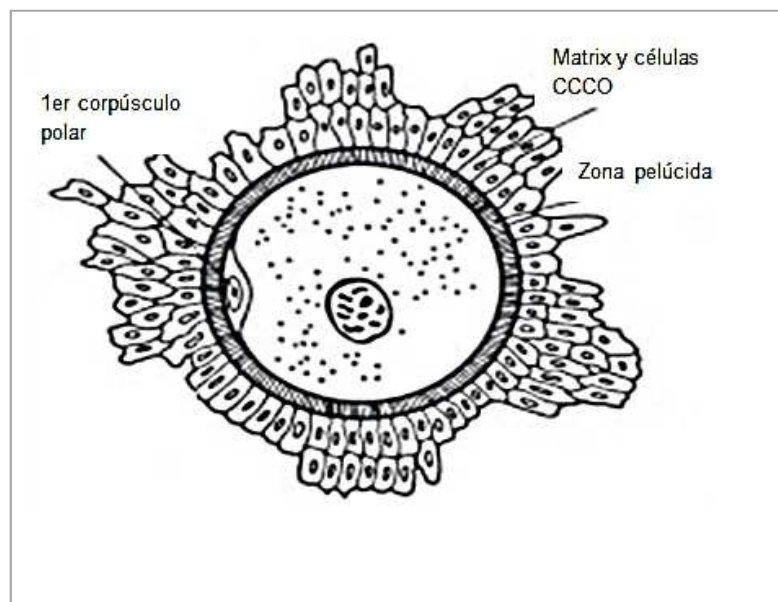


Fig. I-1. Localización de la ZP en el ovocito de los mamíferos. (O Rigol, *Obstetricia y ginecología*, 1984).

Se forma alrededor de los ovocitos (Fig. I-2) de los mamíferos durante los estadios iniciales de la ovogénesis (folículo primario y secundario), y tiene un aspecto fibrogranular (Cariño *et al.*, 2001).

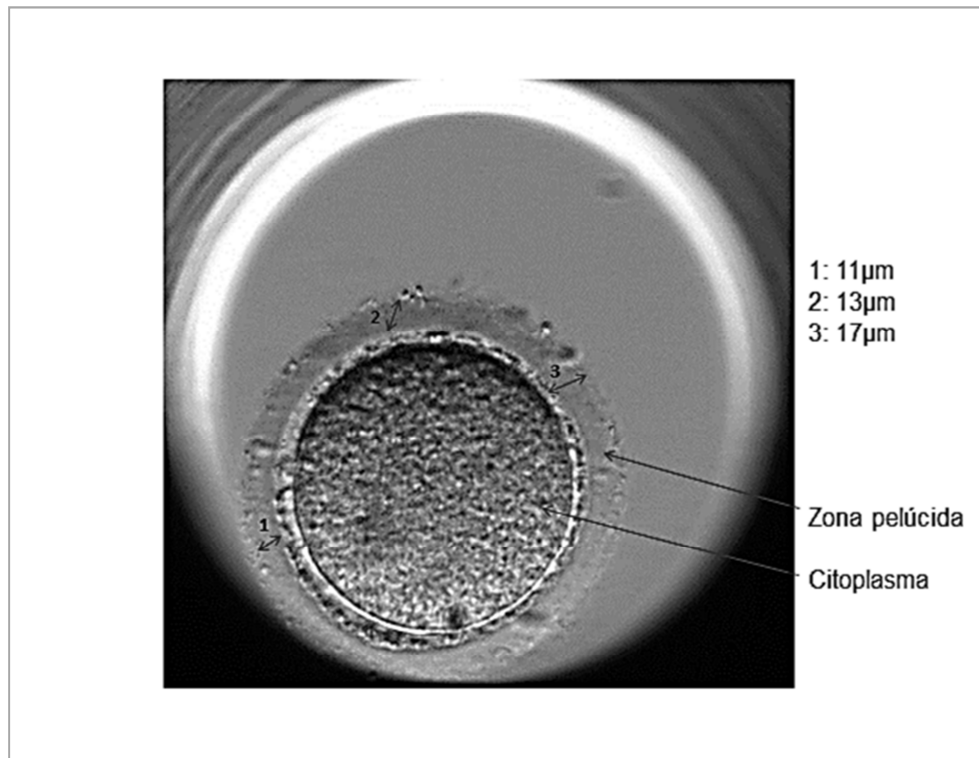


Fig. I-2. Ovocito humano: medidas de la ZP indicadas por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

### 1.1.2 Estructura y composición de la zona pelúcida

Los experimentos de Bleil *et al.*, 1980, en ratón, describen las proteínas de la ZP identificadas como ZP1, ZP2 y ZP3. En 1991, Wassarman y Mortillo también describieron, con microscopía electrónica, la ZP de los ovocitos de mamíferos, la cual constaba de tres glicoproteínas, compuestas de una estructura fibrogranular, notando que cada una de ellas era heterogénea. En la mayoría de las especies, la ZP es secretada en capas, una zona interna que está localizada desde la membrana plasmática hasta la mitad de la ZP, una zona intermedia y una zona externa, que se encuentra cerca de las células del cúmulo, y que sería la que interaccionaría con el espermatozoide.

Se han desarrollado diferentes técnicas para aislar las glicoproteínas de la ZP, desde el punto de vista inmunológico y molecular, permitiendo de este modo su conocimiento (Wassarman, 1988; Dunbar *et al.*, 1994).

La ZP, en la mayoría de los mamíferos, está formada por tres o cuatro glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 las cuales son secretadas por el ovocito y

las células de la granulosa, que apoyan el crecimiento del ovario, formando una estructura tridimensional compleja (Wassarman, 1999; Lefievre *et al.*, 2004).

Se han propuesto dos modelos de ZP donde se sugieren diferentes sitios de unión de las glicoproteínas. En el primer modelo, la ZP se construye de forma tridimensional en la hendidura entre el ovocito y el folículo. El entrecruzamiento tridimensional de la ZP es establecido extracelularmente, lejos de la superficie del ovocito. Posiblemente, la razón por la cual haya una expresión de unión de las tres glicoproteínas, unidas a la membrana de la ZP, es la de prevenir el montaje prematuro y la condensación de ésta. Este modelo (Fig. I-3) implica que hay demasiado espacio de entrecruzamiento entre ZP1 y los filamentos ZP2 y ZP3 (Wassarman *et al.*, 1988).

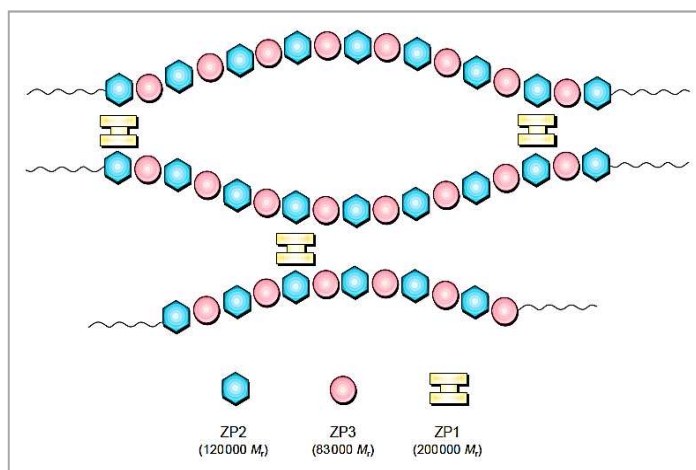


Fig. I-3. Los filamentos están contruidos por unidades repetitivas de ZP2-ZP3 y están entrecruzados por ZP1. (Wasserman, *Annual Review of Biochemistry*, 1988).

Aunque el modelo es consistente con experimentos realizados, no está claro si los sitios de unión de ZP1 están presentes en cada dímero ZP2-ZP3, y si es así, se desconoce la distribución real de los enlaces cruzados.

Existe un segundo modelo donde se describe que la ZP está unida a la superficie del ovocito. Las capas de la ZP bidimensional se forman pero de manera incompleta. En este modelo (Fig. I-4) la expresión de la unión a la membrana es una parte integral de la construcción de la ZP (Green *et al.*, 1997). A pesar de todas las explicaciones dadas por los investigadores, se propone seguir estudiando cómo y cuándo se forma la ZP.

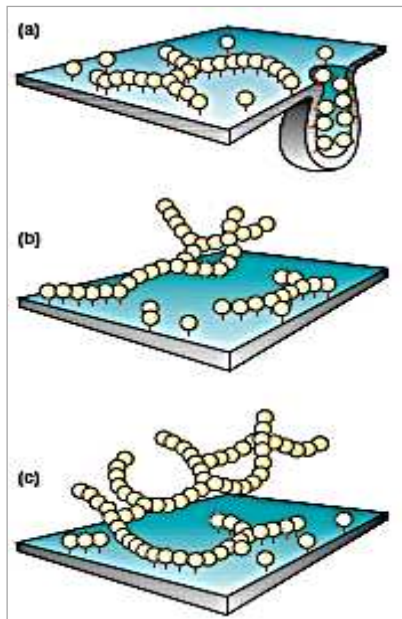


Fig. I-4. (Green et al., 1997).

(a) Las proteínas de la ZP se unen a la membrana por exocitosis. La síntesis de ZP1, ZP2 y ZP3 está coordinada y se hace por la misma vía sintética. Los gránulos se encuentran en la superficie del ovocito.

(b) Los filamentos se unen a la membrana plasmática.

(c) Los filamentos se sitúan lejos de la membrana.

La mayoría de las especies difieren en el grosor de la ZP. Por ejemplo, en ratón es de  $5\mu\text{m}$ , en humano y en cerdo varía de 13 a  $16\mu\text{m}$  y en vaca es de  $27\mu\text{m}$  (Dunbar *et al.*, 1994). Esta variedad se puede deber a la asimetría que hay entre la membrana externa y la membrana interna de la ZP. La membrana externa presenta una apariencia de “queso suizo” y la membrana interna presenta una apariencia regular y rugosa (Phillips *et al.*, 1980).

Se ha visto que, en ovocitos humanos, se encuentran diferencias en la ZP de ovocitos fecundados versus no fecundados. Su apariencia en los ovocitos humanos no fecundados es porosa, compuesta por una serie de anillos aleatoriamente superpuestos en diferentes capas, mientras que en los ovocitos fecundados se observa la ZP más compacta, anillos fundidos y poros borrados por un material que emerge de la capa interna (Nikas *et al.*, 1994). Familiari *et al.*, en 1992, revelan que los ovocitos maduros y fecundados, en humanos, están acompañados de cambios de los filamentos de la ZP, lo cual es muy importante en los procesos de unión, penetración y selección del espermatozoide.

Se sabe que la ZP de los mamíferos es una única matriz extracelular que rodea al ovocito maduro (Dunbar *et al.*, 1983). Para entender mejor tanto la composición como las funciones de la ZP es importante tener en cuenta el modelo animal, concretamente el modelo de ratón.



El proceso de la formación de la ZP está todavía pendiente de elucidar aunque se plantean diferentes hipótesis:

- 1- El ovocito es el único participante en la síntesis de las glicoproteínas de la ZP.
- 2- Las células foliculares son las únicas responsables de la síntesis de las glicoproteínas.
- 3- Ambos, las células foliculares y el ovocito, sintetizan las glicoproteínas de la ZP.

Los experimentos de Bleil *et al.*, 1980, y de Eberspaecher *et al.*, 2001, se decantan por la primera hipótesis, mientras que Lee *et al.*, 1993 y Sinowitz *et al.*, 2001, establecen que las glicoproteínas que originan la ZP se expresan tanto en las células de la granulosa como en los ovocitos en un patrón específico.

La ZP del ratón consiste en tres glicoproteínas llamadas mZP1, mZP2 y mZP3 y son sintetizadas por el ovocito durante 2-3 semanas. La ZP, inicialmente, se observa como depósitos aislados que se unen para formar una matriz. En general, está compuesta por tres glicoproteínas las cuales están organizadas formando un entramado fibrilar que constituyen la capa extracelular (Wassarman *et al.*, 2012).

La evidencia de la existencia de cuatro glicoproteínas en la ZP de los ovocitos humanos está avalada por los trabajos de Lefievre *et al.*, 2004, diferenciándolo del modelo del ratón. Las glicoproteínas han sido descritas como ZP1, ZP2, ZP3 y ZPB. La demostración de que existe una cuarta glicoproteína en la ZP humana, requiere una re-interpretación de los numerosos estudios de electroforesis (Fig. I-5).

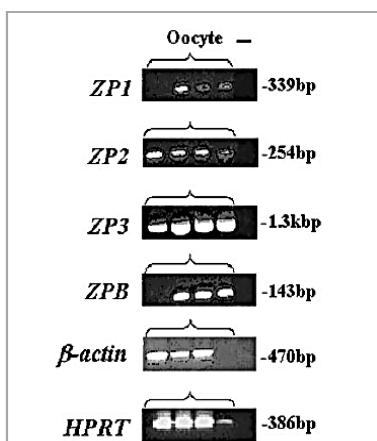


Fig. I.5. Análisis por PCR de la expresión de genes de ZP de ovocitos humanos. (Lefrieve *et al.*, 2004).

Hay que tener en cuenta que el peso molecular de las glicoproteínas varía según la técnica de medición empleada: 1. Western Blot (Gupta *et al.*, 1998): ZP1: 63-80kDa, ZP2: 65-100kDa y ZP3: 58-68kDa. 2. SDS-PAGE (Shabinowitz *et al.*, 1988): ZP1: 92-110kDa, ZP2: 64-78kDa, ZP3: 57-73kDa.

Las propiedades físicas de la ZP son aún desconocidas, aunque se reconoce que es un gel de glicoproteína sulfatado, del orden del 2-6% (peso-volumen) del ovocito, con propiedades de elasticidad en determinados intervalos de tiempo (Green *et al.*, 1997).

### 1.1.3 Función de la zona pelúcida

La ZP es de vital importancia en la reproducción de los mamíferos ya que juega un papel importante durante la ovogénesis, la fecundación y la implantación (Bedford *et al.*, 1977; Sinowatz *et al.*, 2001; Pelletier *et al.*, 2004; Wassarman *et al.*, 2012).

Protección del ovocito, inicio de la reacción acrosómica, interacción ovocito/espermatozoide, prevención de la polispermia, prevención de la dispersión de las blastómeras, ayudar en el transporte a través del oviducto y evitar el contacto con otras células que se encuentran en el tracto reproductivo como las epiteliales, los leucocitos y los espermatozoides están definidas como funciones de la ZP (Modlinski *et al.*, 1970; Wassarman *et al.*, 1991; Sinowatz *et al.*, 2001). Todas estas funciones son esenciales para mantener la integridad del pre-embrión pre-compactado. Se entiende por compactación la formación de las uniones estructurales entre las blastómeras. Según Modlinski *et al.*, 1970, una vez realizada la compactación de las blastómeras, la ZP ya no es esencial.

Se ha destacado, en ratones, la existencia de un receptor de espermatozoide en la glicoproteína ZP3 (Monné *et al.*, 2011) y se han diferenciado proteínas que intervienen en la función receptora del espermatozoide. Estudios, en el ratón, concluyen que la unión de gametos se encuentra determinada por una cadena de oligosacáridos unidos en treonina presentes en ZP3, mientras que otras especies involucran oligosacáridos unidos a residuos de asparagina y treonina.

La característica de la ZP de ser una matriz extracelular altamente viscosa posiblemente sirve para estabilizar las uniones gap entre el ovocito y las células de la corona radiata (Wassarman *et al.*, 2012).

La capacitación consiste en una serie de eventos moleculares tales como el aumento de la concentración de calcio intracelular y de adenosina mono-fosfato cíclico (AMPc) que ocurren en el espermatozoide después de su maduración, en el epidídimo, y que confiere la habilidad al espermatozoide para que pueda producirse la reacción acrosómica (Visconti *et al.*, 1995).

En la mayoría de las especies, la adhesión de los espermatozoides a las glicoproteínas de la ZP tiene lugar por medio de los oligosacáridos complementarios. Las anomalías en la estructura o en la función de las glicoproteínas de la ZP pueden dar lugar a fecundaciones anómalas, disminución de la viabilidad pre-embrionaria e incluso a una menor capacidad de implantación.

El acrosoma es una vesícula secretora, en forma de capucha, que se encuentra en la región apical del espermatozoide, sobre el segmento anterior del núcleo, con contenido enzimático (Zhao *et al.*, 2007). Es un evento exocitótico que involucra la fusión de la membrana plasmática del ovocito con la membrana acrosomal externa del segmento principal del acrosoma del espermatozoide (Fig. I-6). Con posterioridad a la reacción del segmento principal del acrosoma, el segmento ecuatorial puede reaccionar. Este proceso se puede producir durante el contacto del espermatozoide con la ZP. Se desencadenan una serie de procesos tales como: a) liberación de enzimas acrosomales que favorecen el paso a través de la ZP, b) exposición de la membrana acrosomal interna como nuevo dominio de membrana en la superficie celular, c) adquisición, en el caso de la reacción del seguimiento principal del acrosoma, de la capacidad de fusión de la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial del espermatozoide (Visconti *et al.*, 1998). Solamente la membrana plasmática del espermatozoide que ha experimentado la reacción acrosómica es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

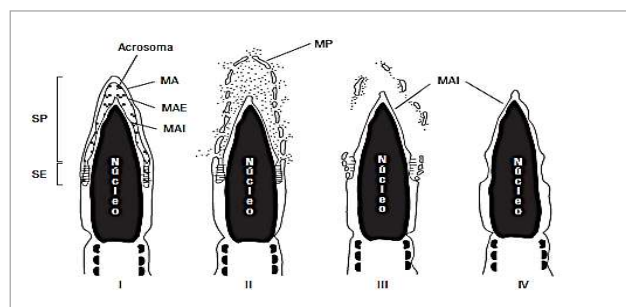


Fig. I-6. Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano (Del Rio *et al.*, 2007).

I Espermatozoide con el acrosoma intacto (no reaccionado).

II Reacción del segmento principal (SP) del acrosoma. Fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) en el segmento principal del acrosoma.

III Reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE).

IV Espermatozoide con reacción acrosómica del segmento principal ecuatorial (SP).

La membrana acrosómica interna (MAI) se continúa con la membrana plasmática del segmento post ecuatorial.

MA: Membrana acrosomal.

La ZP3 es responsable tanto de la inducción de la reacción acrosómica como del reconocimiento entre el espermatozoide capacitado, con el acrosoma intacto, y el ovocito (Llanos *et al.*, 1993). Aunque las altas concentraciones de estradiol, en el moco cervical en períodos fértiles, inhiben la reacción acrosómica, el espermatozoide estaría expuesto a inductores de reacción acrosómica, como altas concentraciones de progesterona, a través del tracto genital femenino (Del Río *et al.*, 2007).

Después de la penetración del primer espermatozoide, la ZP sufre grandes modificaciones y cumple la función de protección del ovocito contra la polispermia (Yanagimachi, 1994).

#### **1.1.4 Endurecimiento de la zona pelúcida**

Como ya se ha comentado, lo único que se conoce de la ZP es que es un gel de glicoproteína, sulfatado y elástico durante determinados intervalos de tiempo (Green, 1997). El endurecimiento superficial de la ZP (EZP), o “zona hardening”, no es una alteración de las propiedades físicas de la ZP, es decir, un endurecimiento de la matriz de la ZP. En realidad se refiere a la resistencia de la misma a la digestión enzimática, aunque algunos autores han demostrado que sí que existe un endurecimiento real de esta (Green, 1997; Papi *et al.*, 2010).

Los estudios de Shiewe *et al.*, 1995a, observaron un endurecimiento de la ZP en ovocitos humanos, no fecundados, al ser tratados con metodología enzimática después de 24 horas de cultivo *in vitro*, comparado con ovocitos fecundados de mujeres jóvenes (menores de 25 años) y mayores de 39 años, pero sus datos no apoyan la

hipótesis de la existencia de un endurecimiento de la ZP durante el cultivo prolongado. Por el contrario, De Meestere *et al.*, en 1997, demuestran, en ratones, que solo se percibía un ligero endurecimiento de la ZP en estadio de mórula. Con todo lo visto hasta ahora, podemos concluir que el endurecimiento de la ZP es un fenómeno universal y no siempre está acompañado por un cambio mecánico.

Los estudios de Mondéjar *et al.*, 2013, proponen que factores del líquido folicular son los responsables del endurecimiento de la ZP y de la monospermia durante la fecundación en mamíferos. Puesto que no existe una certera relación entre el EZP y la monospermia, este grupo analizó los diferentes fluidos del oviducto y lo correlacionaron con variaciones en los niveles de monospermia después de la FIV (Fecundación in vitro), en porcinos. Los resultados de los estudios demuestran que el mecanismo del endurecimiento de la ZP ocurre, antes de la fecundación, en el fluido ovárico y está directamente relacionado con los niveles de monospermia, confirmando que esto es mediado por una glicoproteína específica: oviduct-specific glycoprotein (OVPG1).

La estructura molecular de ZP3 es determinante en el endurecimiento de la ZP así como también en la interacción de los gametos, los reordenamientos estructurales post fecundación y el bloqueo de unión de los espermatozoides (Munné *et al.*, 2011).

Se establece la hipótesis de que el incremento anormal del endurecimiento de la ZP puede ser el responsable de la incapacidad de la eclosión pre-embrionaria en los pre-embriones humanos y, por ende, la reducción en los porcentajes de implantación cuando las pacientes se someten a técnicas de reproducción asistida (TRA) (Cohen *et al.*, 1991). Además, la exposición de los pre-embriones al ambiente del medio de cultivo in vitro puede dar lugar a un endurecimiento de la ZP debido a la ausencia de lisinas y otras moléculas que son secretadas "in vivo" desde el entorno natural de tejidos o debido al entrecruzamiento de las glicoproteínas de la ZP que posteriormente pueden poner en peligro del proceso de la eclosión (Bider *et al.*, 1997, Hammadeh *et al.*, 2011).

Se ha observado que existe una correlación entre las concentraciones de la FSH basal, la edad y los cambios físicos o químicos en la ZP que inducen al endurecimiento de esta (Cohen *et al.*, 1992).

### 1.1.5 Grosor de la zona pelúcida

Estudios cuantitativos demuestran que una de las características más relevantes de la ZP es la variación del grosor de la misma. (Bertrand *et al.*, 1996; Garside *et al.*, 1997; Palmstierna *et al.*, 1998; Calderón *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 2004). Al igual que las anomalías en la ZP, el grosor de la misma se relaciona con baja tasa de implantación, debido a la falta de eclosión (Gabrielsen *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002).

Se cree que el grosor de la ZP está considerablemente influenciado por la estimulación hormonal y la edad materna avanzada (Nawroth *et al.*, 2001)

El grosor de la ZP ha generado interés desde hace muchos años. Recientemente, se ha propuesto que su engrosamiento puede servir como un diagnóstico clínico para la selección de pre-embriónes. Pelletier *et al.*, 2004, registró el grosor de las diferentes zonas pelúcidas (ZPs) en ovocitos inmaduros, maduros y en pre-embriónes en día 3 de desarrollo (D3), concluyendo que el grosor de la ZP de los ovocitos y los pre-embriónes varía de una forma considerable. Observaron que la capa más interna es la más gruesa de las tres zonas siendo la capa externa menos gruesa que esta. La capa intermedia es la más delgada de las tres. En la mayoría de las pacientes, concluyeron que no todas las ZPs de sus ovocitos/pre-embriónes tienen el mismo grosor. Lo más interesante de este trabajo es que observaron que las ZPs empiezan a adelgazarse a partir del D3 de desarrollo, concluyendo que las tres capas que forman la ZP son más delgadas en los pre-embriónes que en los ovocitos.

La ZP de los pre-embriónes humanos, en D3, es de  $15,0 \pm 2,8\mu\text{m}$ , más fina que la ZP de los ovocitos inmaduros ( $20,4 \pm 2,4\mu\text{m}$ ) y que la de los ovocitos maduros ( $19,5 \pm 2,2\mu\text{m}$ ). El adelgazamiento de la ZP se debe, principalmente, a una disminución de la capa externa (Tabla I-1).

ZP( $\mu\text{m}$ )	Ovocitos inmaduros	Ovocitos maduros	Pre-embriónes D3
	n=3	n=92	n=83
<b>Capa interna</b>	10,5 $\pm$ 2,3	9,8 $\pm$ 2,1	7,9 $\pm$ 1,9
<b>Capa intermedia</b>	3,4 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 1,2
<b>Capa externa</b>	6,5 $\pm$ 2,1	6,1 $\pm$ 1,7	3,7 $\pm$ 1,4
<b>Total</b>	20,4 $\pm$ 2,4	19,5 $\pm$ 2,2	15,2 $\pm$ 2,8

Tabla I-1. Promedio de grosor de los ovocitos y los pre-embriónes (Pelletier *et al.*, 2004).

Cohen *et al.*, 1991, consideran que una ZP gruesa en humanos es aquella que mide más de 15µm y establecen la hipótesis de que un incremento del grosor, en pacientes mayores de 38 años, está altamente relacionado con los cambios hormonales y la edad por lo que todos estos indicadores han sido propuestos para predecir la posterior implantación.

Shiwe *et al.*, 1995b, observaron que ovocitos y pre-embriones no presentan anomalías relacionadas con el endurecimiento de la ZP cuando se utilizan medios de cultivo enriquecidos con proteína. No encuentran ninguna relación entre el endurecimiento y el grosor de la ZP o la edad. Sin embargo, los trabajos publicados por Sun *et al.*, 2005, al estudiar el potencial de implantación según el grosor de la ZP, encontraron que las mujeres menores de 35 años tienen mejor pronóstico reproductivo comparado con las mujeres mayores de 34.

Los datos analizados por Garside *et al.*, 1997, respecto a las medidas del grosor de ZPs pre-embrionarias, revelan que pacientes con pre-embriones que tienen la ZP fina:  $17,7 \pm 0,14\mu\text{m}$  en el día 1 (D1),  $16,3 \pm 0,14\mu\text{m}$  en el día 2 (D2) y  $14,9 \pm 0,14\mu\text{m}$  en el D3, tienen mejores resultados en las tasas de gestación e implantación. Las ZPs disminuyen de grosor en pre-embriones de mujeres mayores de 34 años. Nawroth *et al.*, 2001, consideran que los cambios en la ZP están correlacionados con el número de blastómeras, el grado de fragmentación y la edad. Por ello, recomiendan la medición de la ZP como parámetro a incluir para realizar una mejor selección pre-embrionaria, y así optimizar las tasas de gestación e implantación, ya que el grosor de la ZP puede ser el responsable de una menor tasa de fecundación en pacientes sometidos a un programa de FIV. Primi *et al.*, 2004, estudian el grosor de la ZP de pacientes con diferentes etiologías y observan que, en los pre-embriones con ZPs mayores o menores de 17µm, los resultados clínicos son similares.

En 1997, Loret *et al.*, intentaron correlacionar los estados hormonales y la infertilidad de las pacientes con los cambios en el grosor de la ZP en el ovocito y en los siguientes estadios. Encontraron que el promedio del grosor de la ZP, en D1, es de  $18,2 \pm 0,2\mu\text{m}$ , en D2 es de  $16,02 \pm 2,0\mu\text{m}$  y en D3 es de  $13,9 \pm 0,16\mu\text{m}$ . Hay una correlación directa entre el grosor de la ZP y los niveles de estradiol y FSH basales, aunque esta relación varía 48 horas más tarde. Pacientes con niveles de FSH alta, en D3 de desarrollo pre-embrionario, tienen una ZP más fina antes de la transferencia. Respecto a los diagnósticos de infertilidad, los datos del grosor de la ZP, en D1, son mayores en pacientes que tenían infertilidad de origen desconocido ( $19,4 \pm 2,7\mu\text{m}$ ), frente a pa-

cientes con endometriosis ( $17,7 \pm 2,2\mu\text{m}$ ), con esterilidad tubárica ( $17,5 \pm 2,4\mu\text{m}$ ) o infertilidad por factor masculino severo ( $16,4 \pm 2,7\mu\text{m}$ ), persistiendo la relación en los siguientes días de cultivo pre-embionario. Consideran que el grosor de la ZP está influenciado por el ambiente preovulatorio hormonal y por el origen de la infertilidad.

En el ratón, se ha demostrado que el diámetro del ovocito es directamente proporcional al grosor de la ZP hasta llegar a  $6,2 \pm 1,9$  (Wassarman *et al.*, 2012).

### **1.1.6 Efecto de la criopreservación en la zona pelúcida**

Al-Hasani *et al.*, 1987, en ratones, comprobaron que la criopreservación inducía cambios en la ZP y/o la liberación prematura del contenido de los gránulos corticales con inhibición de la fecundación. Dentro de los daños más importantes observados en la ZP, debidos a la congelación, están las fracturas, la disrupción de la membrana plasmática y la desorganización extensiva del ooplasma, así como el endurecimiento de la ZP, que puede ser evitado por el uso de la microinyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) ya que este es introducido, de forma artificial, a través de la ZP mediante una micropipeta.

## **1.2 FECUNDACIÓN**

### **1.2.1 Unión espermatozoide – óvulo y su relación con la zona pelúcida**

La fecundación (Fig. I-7) es un proceso complejo que supone la unión de un ovocito y un espermatozoide para dar lugar a una nueva entidad genética. En condiciones naturales, o tras la realización de una FIV convencional, el espermatozoide, una vez capacitado, atraviesa las células del cúmulo-corona y se une a la ZP del ovocito. Esta unión desencadena la liberación del contenido del acrosoma del espermatozoide (reacción acrosómica), permitiendo a este que atraviese la ZP fusionándose con la membrana del ovocito. Después de la fusión de las dos membranas, el ovocito es activado, el espermatozoide entra al citoplasma y tras una serie de procesos bioquímicos y físicos se generan la extrusión del segundo corpúsculo polar, la formación del pronúcleo femenino y la descondensación de la cabeza del espermatozoide así como la formación del pronúcleo masculino (Fig. I-8). Una vez que se produce la fecundación, la ZP es bioquímicamente modificada para prevenir que más espermatozoides penetren por ella. Este fenómeno se conoce como “zona reaction” (Austin *et al.*, 1954; Dean, 1992; Evans *et al.*, 2002).



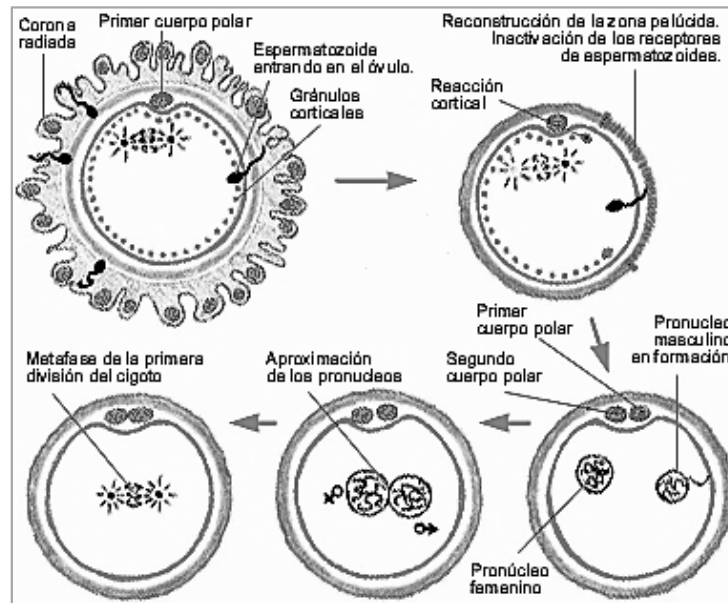


Fig. I-7. Fecundación en mamíferos (Zapata M, 2010).

### 1.2.2 Reacción cortical

La presencia de los gránulos corticales, en hámster, fue descrita por Austin, en 1956. Los describe como grandes estructuras ubicadas en la superficie del espacio perivitelino, antes de la penetración del espermatozoide. El diámetro de los gránulos está entre  $0,1-0,5\mu\text{m}$ , visualizado con microscopio electrónico, con una densidad entre 50-100 por  $100\mu\text{m}^2$ . En ratones, se piensa que los factores liberados de los gránulos corticales, dentro del espacio perivitelino y la ZP, modifican ZP2 y ZP3 produciendo un bloqueo de la polispermia (Gross *et al.*, 2000).

En mamíferos, tras la penetración del espermatozoide al ovocito, se produce la reacción cortical, proceso por el cual los gránulos corticales son liberados mediante exocitosis al espacio perivitelino. Esta reacción cortical es producida como respuesta a la unión y penetración del espermatozoide (Green, 1997) o por la activación partenogénica, lo que conlleva a una alteración de las características estructurales y bioquímicas de la ZP y/o membrana plasmática lo que ocasiona una inhibición de la penetración polispermica (Sun, 2003). En la exocitosis de los gránulos corticales se produce una liberación de enzimas, las cuales participan en la eliminación de los receptores superficiales, para los espermatozoides, en la glicoproteína ZP3, lo que previene la unión e inicio de la reacción acrosómica en la superficie externa de la ZP (Green, 1997).

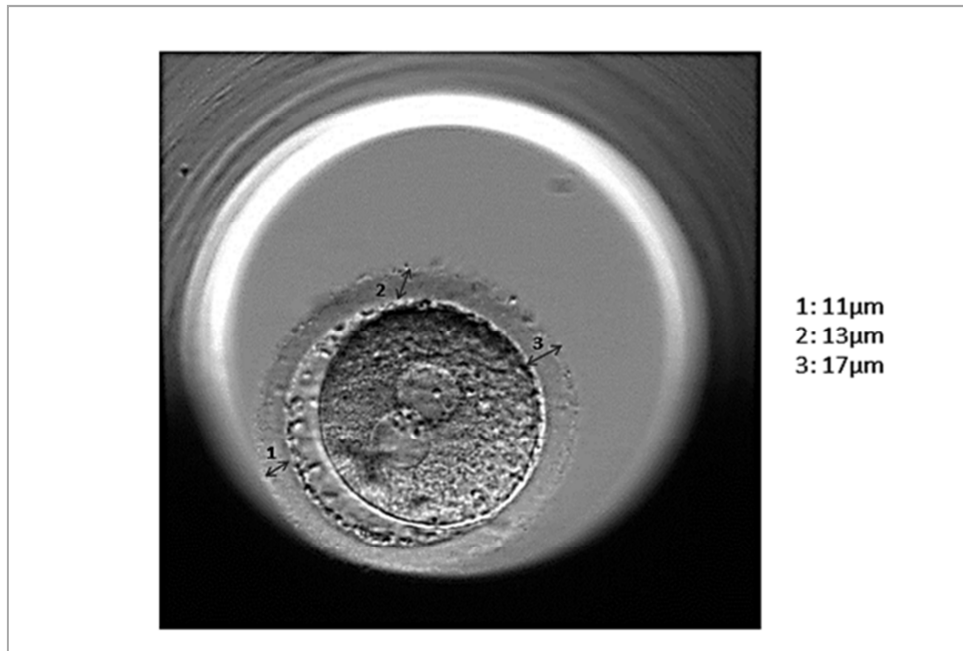


Fig. I-8. Ovocito humano fecundado: medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

Los cambios de la ZP observados al microscopio, entre la ovulación y la fecundación, demuestran que microvellosidades y células foliculares, en ovarios de rata, se disgregan dentro de la ZP (Chung *et al.*, 1971). Debido a consideraciones éticas, en cuanto a la investigación en humanos, la mayoría de los estudios en los procesos de fecundación se basan en los resultados obtenidos en la FIV (Plachot *et al.*, 1992). La desventaja que se presenta es que hay que retirar las células del cúmulus para poder observar la fecundación.

Los resultados de Raz *et al.*, en 1996, demuestran que hay una distribución no uniforme de diferentes residuos de azúcares, en la ZP de la rata, observando un cambio post fecundación, posiblemente correlacionado con cambios en la ZP que conducen al bloqueo de la polispermia.

Payne *et al.*, 1997, aportaron información relevante acerca del tiempo de división en eventos de fecundación por medio de la ICSI y posteriores divisiones pre-embriónicas mediante un sistema de "time lapse" video. Según sus estudios de grabación continua, en 30 ovocitos correctamente fecundados, determinaron que la presencia de los pronúcleos masculino y femenino se observaba a partir de 2h 51 minutos

hasta las 5h post microinyección. También determinaron que la descondensación del espermatozoide precedía a la extrusión del segundo corpúsculo polar.

Existen otros estudios, donde se valora el impacto del grosor de la ZP durante los procesos de fecundación, después de FIV e ICSI, en humanos. Bertrand *et al.*, 1995, determinaron que el grosor de la ZP variaba desde 10 a 31 $\mu$ m, con una media de 17,5 $\mu$ m, y que el grosor de las ZPs de los ovocitos fecundados ( $16 \pm 3,2\mu$ m) era significativamente menor que el grosor de las ZPs de aquellos ovocitos que no fueron fecundados ( $18,9 \pm 4,02\mu$ m) ( $p \leq 0,001$ ). Un año después, este mismo grupo (Bertrand *et al.*, 1996) estudió el diámetro de los ovocitos humanos fecundados correctamente ( $16,4 \pm 3,1\mu$ m) y compararon el grosor de la ZP con los no fecundados ( $18,9 \pm 3,8 \mu$ m) y los ovocitos poliespérmicos ( $15,1 \pm 2,4\mu$ m), con diferencias estadísticamente significativas, concluyendo que el grosor de la ZP es una característica individual que puede estar influenciada por el tratamiento hormonal durante la estimulación y puede afectar a los procesos de la fecundación. El estudio realizado en 1971, por Chung, en ratones, demuestra de igual forma la disminución del grosor de la ZP de ovocitos fecundados respecto con los no fecundados.

Hay dos hipótesis (Chamberlin *et al.*, 1989) con la cuales se intenta explicar la influencia del grosor de la ZP en las tasas de fecundación. Una de ellas es que el mayor grosor de la ZP debilita al espermatozoide al tener que atravesar una mayor distancia antes de llegar al citoplasma. La segunda hipótesis considera que la ausencia de fecundación no está directamente ligada al grosor de la ZP, siendo éste un signo general de disfunción por parte del ovocito. Bertrand *et al.*, 1995, concluyen que el grosor de la ZP debe ser un factor adicional a tener en cuenta para la interpretación de la fecundación. El evento de la fecundación no ejerce una influencia inmediata sobre el grosor de la ZP, sino aproximadamente 20h después de este mismo proceso. Por el momento, no se ha encontrado una relación entre el grosor de la ZP y las tasas de gestación en pacientes. Los investigadores concluyen que, la técnica recomendada para fecundar los ovocitos con una ZP  $\geq 22 \mu$ m debería de ser la ICSI y no la FIV convencional.

### **1.3 DESARROLLO PRE-EMBRIONARIO Y SU RELACIÓN CON LA ZONA PELÚCIDA**

#### **1.3.1 Día 2 y Día 3 y su relación con la zona pelúcida**

La velocidad de división normal es la que presenta un pre-embrión que duplica su número de células en 24h (Fig. I-9, I-10, I-11). La división de los pre-embriones humanos involucra una serie de divisiones mitóticas, del citoplasma, cada 12-18 h con aumento aparente en el tamaño (de 2-8 células), pero el volumen de las blastómeras es reducido aproximadamente en un 28,5% a través de las sucesivas divisiones pre-embriónicas acompañado de una elongación progresiva de la blastómera encontrando cambios en la ZP (Maneiro *et al.*, 1990).

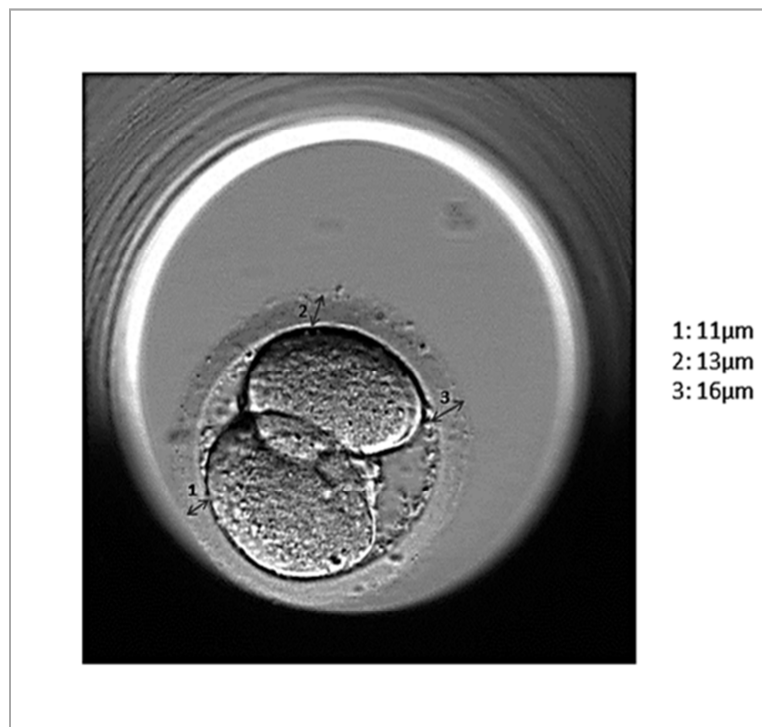


Fig. I-9. Pre-embrión humano en D2 (2 blastómeras). Medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

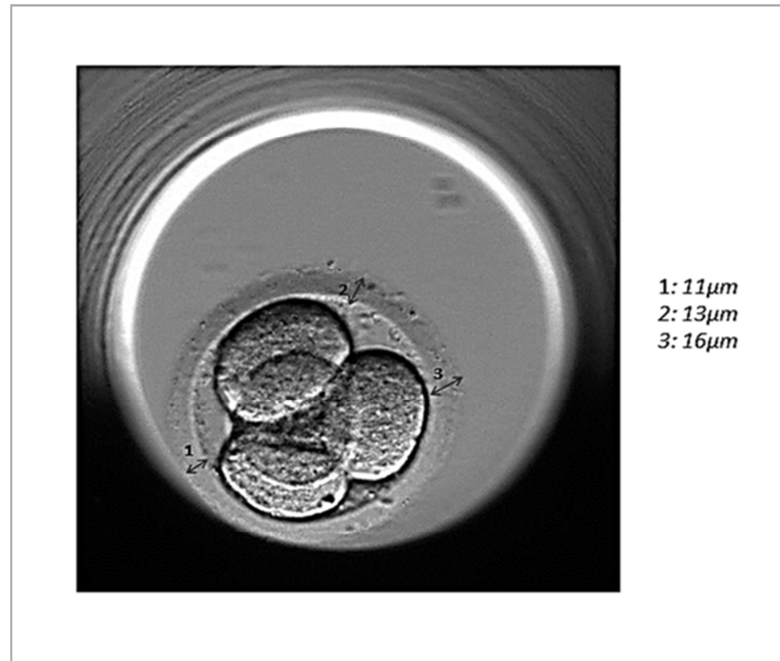


Fig. I-10. Pre-embrión humano en D2 (4 blastómeras). Medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

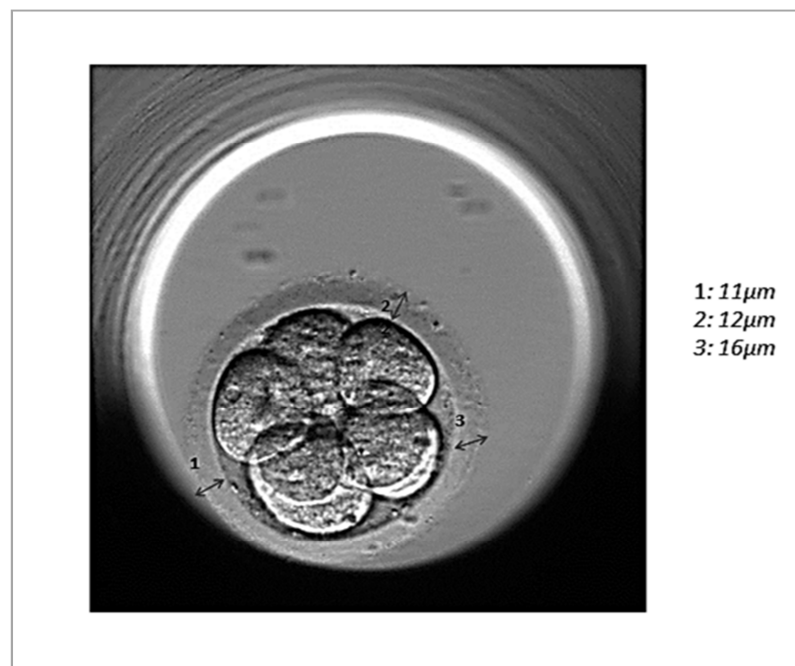


Fig. I-11. Pre-embrión humano en D3 (8 blastómeras). Medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

La ZP tiende gradualmente a adelgazarse debido a la liberación de agentes que disgregan la misma o debido a que se establece una presión durante la morfogénesis preimplantatoria.

Para realizar una buena valoración morfológica, ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción), en 2007, recomienda que el intervalo de observación en D2 sea 44-47h post inseminación y 67-71h post inseminación para el D3. Los parámetros evaluados en los dos días son: número de células y ritmo de división, porcentaje y tipo de fragmentación celular, desigualdad en el tamaño de las blastómeras, contorno de las blastómeras, visualización de núcleos y grado de multinucleación, anillo citoplasmático, presencia/ausencia de vacuolas, zona pelúcida, grado de compactación, adhesión temprana y “pitting” o moteado del citoplasma.

En los últimos años, se ha desarrollado un nuevo sistema, no invasivo, conocido como “time-lapse”, que tiene las características de un incubador convencional, pero con la diferencia que tiene incorporado un sistema para capturar imágenes de forma continua que genera una grabación. Esto posibilita la visualización, en tiempo real, del desarrollo pre-embrionario de forma continuada lo que supone una ventaja ya que permite determinar el tiempo exacto en el que ocurre cada acontecimiento: desde la formación de los pronúcleos hasta la formación del blastocisto (Meseguer *et al.*, 2011). El sistema ofrece una mínima manipulación pre-embrionaria y una mejora en las condiciones de cultivo, reduciendo los cambios de temperatura y CO<sub>2</sub>, además de aportar objetividad y exactitud en los acontecimientos analizados así como la visualización en tiempo real de la evolución pre-embrionaria. Sin embargo, hasta el momento, no se conocen estudios de la ZP con este tipo de sistema.

Es poco lo que se conoce acerca de la ZP y sus características durante las divisiones celulares. Pelletier *et al.*, 2004, utilizan un microscopio digital de luz polarizada (LC-PolScope; Cambridge Research and Instrumentation, Inc., Woburn, USA). Registraron los datos de las medidas del grosor de las ZPs tanto en los ovocitos inmaduros, como en los ovocitos maduros y los pre-embriones en D3 de desarrollo. Observaron que, tanto en los ovocitos como en los pre-embriones, la capa interna de la ZP era la más gruesa y también tenía una alta “retardance” (diferencia en el intercambio de fase entre dos luces polarizadas después de someterlas a un haz de luz). Sin embargo, no obtuvieron diferencias entre los ovocitos inmaduros (vesícula germinal y metafase I) y los maduros (metafase II). Obtuvieron que la ZP era más delgada en los pre-embriones que en los ovocitos y que la capa más delgada era la intermedia.

Los parámetros para valorar la calidad pre-embrionaria como la fragmentación, la simetría y el tamaño de las blastómeras se siguen teniendo en cuenta en la actualidad a la hora de seleccionar un pre-embrión para su transferencia. Cohen *et al.*, 1989,

incorporaron un sistema de video cinematográfico para analizar las imágenes de los pre-embriónes y observaron variaciones en las ZPs pre-embriónicas. Cuando las variaciones del grosor de las ZPs oscilaban más de 25%, de forma individual por pre-embrión transferido, la tasa de gestación obtenida fue del 40% (24 de 60 pacientes) ( $p=0,002$ ). Las pacientes que no tuvieron gestación fueron aquellas en las que sus pre-embriónes presentaban una ZP mayor o igual de  $15\mu\text{m}$ .

Garside *et al.*, 1997 observan que el grosor de la ZP de los ovocitos y los pre-embriónes de mujeres varía de una forma considerable. El grosor de la ZP de los cigotos y los pre-embriónes fue medido diariamente, en 81 pacientes, con una media de edad de  $33,8 \pm 4,2$ , registrando datos de  $17,7 \pm 0,14\mu\text{m}$  en D1, de  $16,3 \pm 0,14\mu\text{m}$  en D2 y de  $14,9 \pm 0,14\mu\text{m}$  en D3. Encontraron relación con el grosor de la ZP y el número de blastómeras, obteniendo que los pre-embriónes transferidos con la ZP delgada tienen una alta posibilidad de implantar. Consideran que el promedio del grosor de la ZP disminuye con la edad, después de los 35 años. Correlacionan los cambios del grosor de ZP con número de blastómeras, fragmentación y edad. Loret *et al.*, en el mismo año, publicó un estudio donde el grosor de la ZP de cigotos y pre-embriónes fue medido en 96 pacientes, con una media de edad de  $33,8 \pm 4,2$ . Los datos registrados en D1 fueron de  $18,2 \pm 0,2\mu\text{m}$ , en D2 de  $16,0 \pm 0,2\mu\text{m}$  y en D3 de  $13,9 \pm 0,16\mu\text{m}$ . Concluyen que el grosor de la ZP humana puede estar influenciado por el ambiente hormonal pre-ovulatorio y el diagnóstico clínico. Según Bleil *et al.*, 1980, el grosor de las ZPs, en los pre-embriónes humanos, varían entre  $13\text{-}15\mu\text{m}$ . Pelletier *et al.*, 2004, observa que el grosor de la ZP de ovocitos y pre-embriónes de mujeres varía de una forma considerable.

Palmstierna *et al.*, 1998, aplican seis criterios morfológicos para predecir las tasas de gestación de las pacientes que se someten a ciclos de FIV: correcto desarrollo pre-embriónico, fragmentación, forma regular de las blastómeras, tamaño similar de las mismas, número de blastómeras mononucleadas y variación del grosor de la zona pelúcida (ZPTV). Con estos datos, si el resultado de la ZPTV era menor de 15%, las tasas de gestación eran muy bajas (4,5%) en cambio, si el porcentaje de ZPTV fluctuaba entre 15-20%, las tasas de gestación alcanzaban un 24,1%. Si en los tratamientos con FIV al menos un pre-embrión tiene ZPTV mayor de 20%, la tasa de gestación es del 76%. Con estos estudios, lanzan la hipótesis de que el dato de ZPTV puede representar la habilidad que tenga el pre-embrión para poder eclosionar y ser un parámetro para predecir la gestación con pre-embriónes de buena calidad.

Gabrielsen *et al.*, en 1989, establecen dos líneas de evidencia clínica que han contribuido significativamente en los criterios de selección pre-embionaria. La primera, donde existe una evidencia inicial que demuestra que las tasas de implantación, en los pre-embiones humanos, se correlacionan con la variación y el grosor de la ZP. Aquellos embriones que presentaban una ZP uniforme, tenían unas tasas de implantación del 10% y embriones con ZPs finas o irregulares presentaban resultados implantatorios del 29%. Y la segunda línea era aquella donde se observan efectos adversos por cultivos prolongados en condiciones sub óptimas manifestadas en el grosor y endurecimiento de la ZP, generando resultados negativos ocasionados por la incapacidad pre-embionaria de realizar la eclosión. Aunque la mayoría de los estudios indican la gran influencia del grosor de la ZP, algunos autores observan claramente que las variaciones en esta es un indicador para el éxito en FIV (Cohen *et al.*, 1989; Palmstierna *et al.*, 1998).

### **1.3.2 Mórula y estadios de blastocistos relacionados con la zona pelúcida**

La palabra mórula proviene de la raíz latina “morus” que significa mora. De este modo fueron llamadas las divisiones pre-embionarias, después de D3 de desarrollo, ya que según los investigadores, notaron la similitud, apariencia y forma con la mora (Fig. I-11). El pre-embrión humano empieza el proceso de mórula, aproximadamente en el estadio de 32 células. A continuación se produce la compactación que es un proceso que implica la formación de estrechas uniones intercelulares entre blastómeras, las cuales inician un aplanamiento, incrementándose las áreas de contacto. Las líneas intercelulares son indistinguibles y la superficie de la mórula compactada se empieza a caracterizar por presencia y distribución de microvellosidades y polarización del citoplasma (Nikas *et al.*, 1996). Durante la compactación una variedad de uniones se forman entre las células en el siguiente orden: uniones gap, adherencias, uniones tight y desmosomas. Cada tipo de unión juega un papel fundamental en la comunicación celular, la adhesión y la diferenciación.

Según Kolima *et al.*, 2005, las ZPs finas ( $7,9 \pm 2,1\mu\text{m}$ ) de pre-embiones humanos en estadio de mórula, obtienen tasas de gestación más altas al compararlas con las ZPs gruesas ( $9,7 \pm 2,0\mu\text{m}$ ).



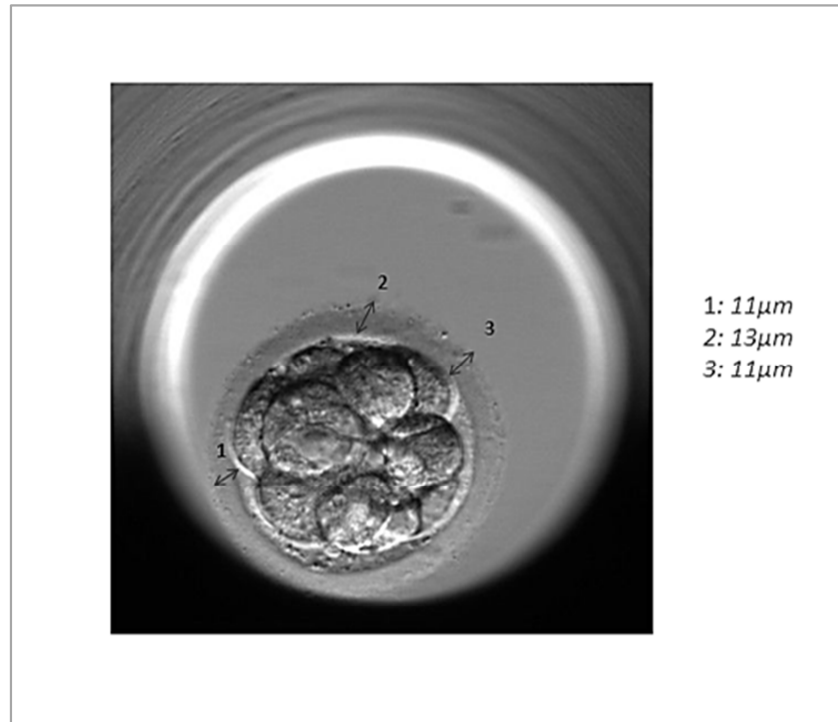


Fig. I-12. Pre-embrión humano en D4 (mórula). Medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

Durante el proceso de compactación, las blastómeras pierden su identidad y se observa una única masa celular. Es en este estadio cuando el pre-embrión entra en el útero.

Posteriormente, se forman las capas de células internas y externas. Los orgánulos de estas últimas presentan una distribución polarizada en el citoplasma. El siguiente acontecimiento en el desarrollo pre-embionario es la formación de la cavidad o blastocele. La formación del blastocisto representa el inicio del transporte de fluido por las células del trofoectodermo, así como la diferenciación física de las células en un compartimiento interno (masa celular interna) y otro externo (trofoectodermo), que engloba la masa celular y retiene el fluido del blastocele.

Mercader *et al*; 2007, diferencian seis tipos morfológicos dentro del estadio de blastocisto:

Blastocisto temprano (BT): inicio de la formación de la cavidad o blastocele y empieza la diferenciación celular (Fig.I-13).

Blastocele cavitado (BC): el blastocele ocupa más del 50% del volumen del pre-embrión (Fig. I-14).

Blastocisto expandido (BE): blastocele rodeado por una monocapa celular o trofoectodermo que formará la placenta y una masa celular interna (mci) que dará lugar al pre-embrión (Fig. I-15). Con la expansión del pre-embrión se produce un aumento del volumen y una disminución del grosor de la ZP.

Blastocisto eclosionando o "hatching" (BHi): el blastocisto comienza a salir a través de la ZP (Fig. I-16).

Blastocisto eclosionando en 8 (BHi en 8): cuando la mitad del blastocisto está fuera de la ZP (Fig. I-17).

Blastocisto eclosionado o "hatched" (BH): el blastocisto está completamente fuera de la ZP (Fig. I-18).

El grosor de la ZP puede presentar grandes variaciones a lo largo del desarrollo del blastocisto. El afinamiento ocurre hasta su mínima expresión cuando el blastocisto está totalmente expandido y se inicia la eclosión con la ruptura de la ZP. Lo más frecuente es que la ZP inicie su afinamiento en D5 de desarrollo pre-embionario, aportando mejores tasas de implantación que cuando aparece adelgazada en D6.

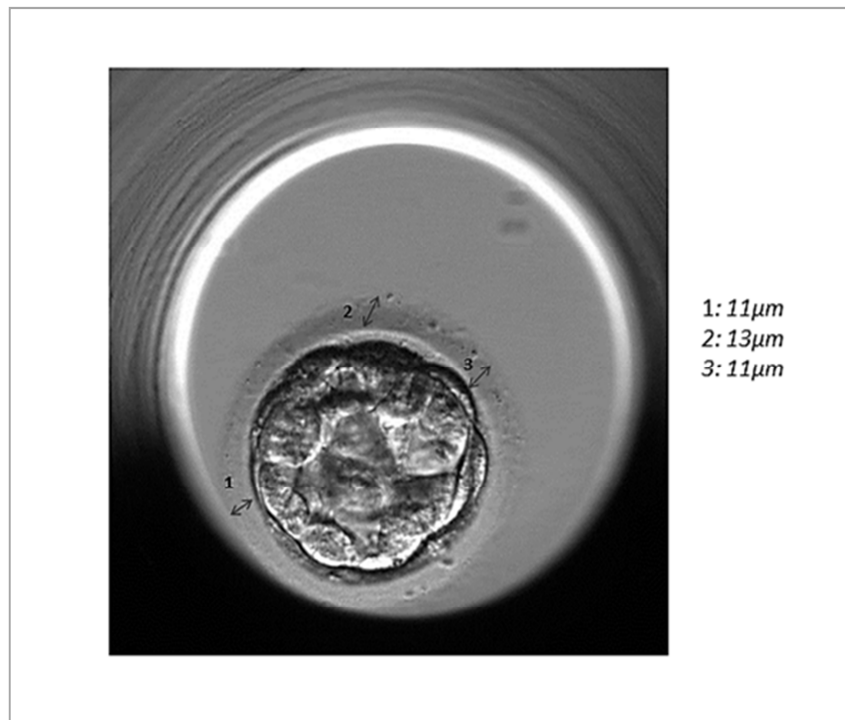


Fig. I-13. División pre-embionaria de humano en BT. Medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

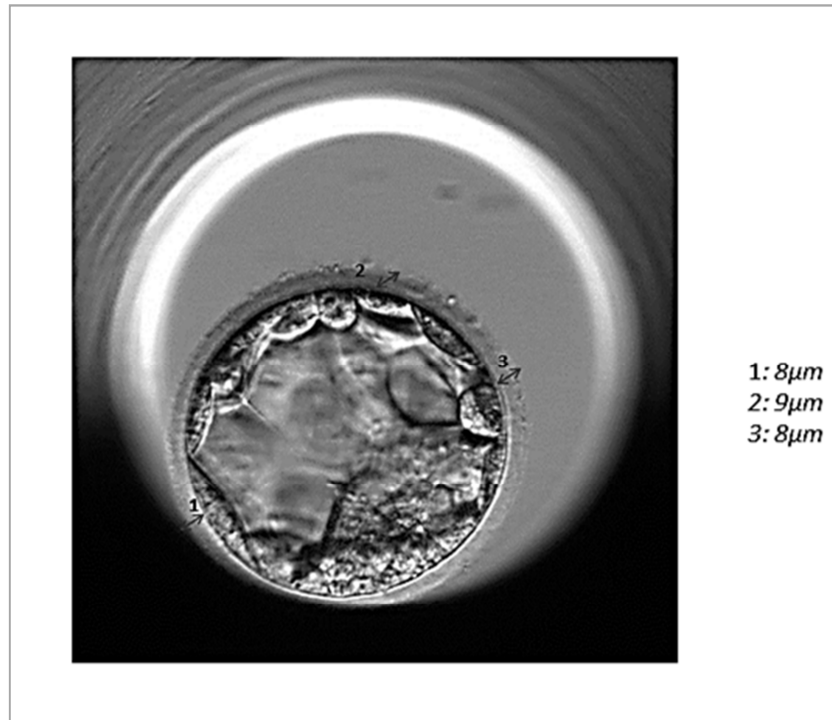


Fig. I-14. División pre-embionaria de humano en BC: medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

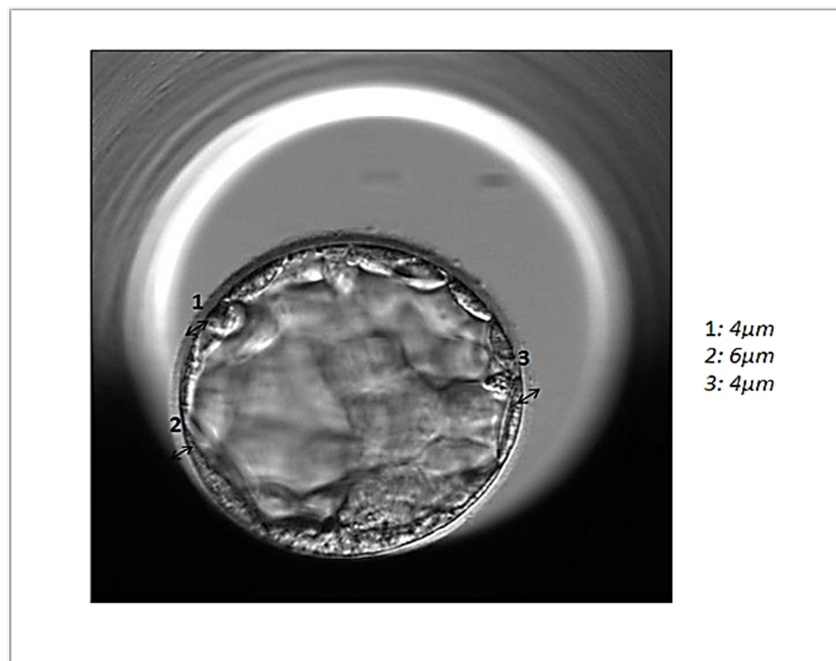


Fig. I-15. División pre-embionaria de humano en BE: medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

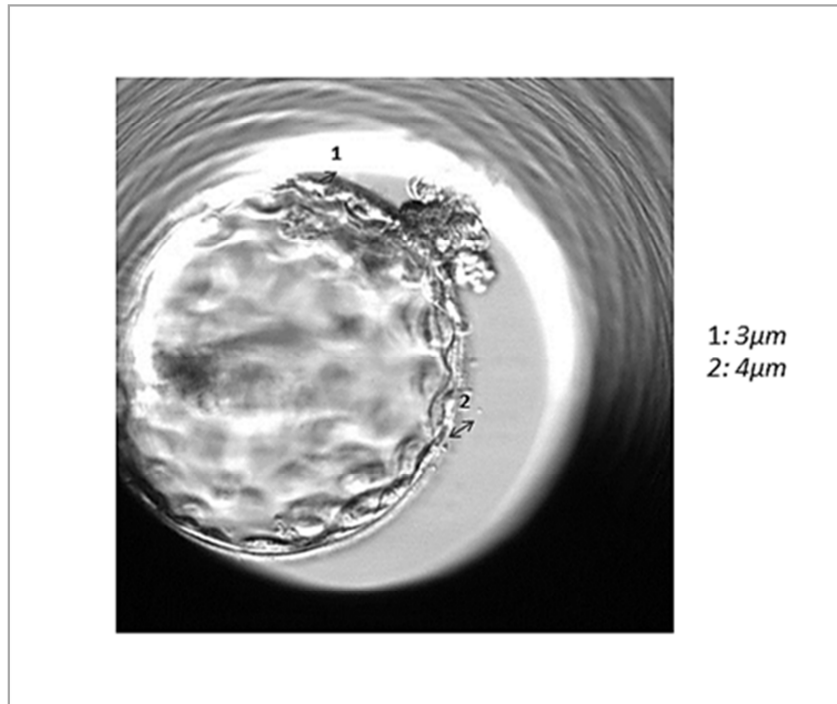


Fig. I-16. División pre-embionaria de humano en BHi eclosionando: medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.

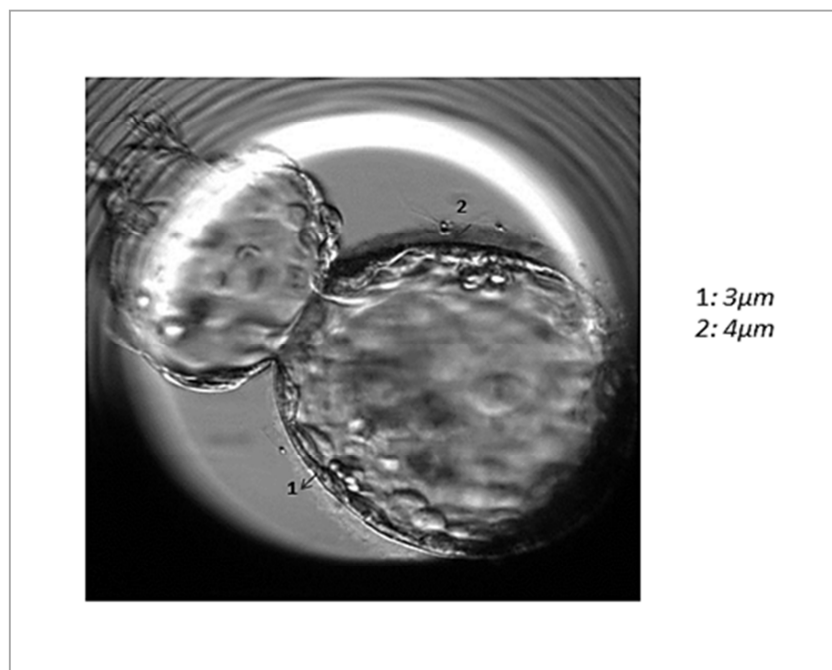


Fig. I-17. División pre-embionaria de humano en BHi eclosionando en 8: medidas de la ZP indicada por flechas. Fotografía: IVI-Murcia.



Fig. I-18. División pre-embriónica de humano en BH eclosionado. Fotografía IVI-Murcia.

#### **1.4 ECLOSIÓN PRE-EMBRIONARIA**

Al llegar el pre-embrión al estadio de blastocisto, hay una combinación de lisinas (proteasas) producidas por el trofoectodermo y/o el útero, lo cual ayuda a la disolución de la ZP (Gordon *et al.*, 1993). Además, también se requiere de un proceso mecánico, el blastocisto se contrae y se re expande hasta que la ZP se vuelve muy fina. La elasticidad y el afinamiento de la ZP son fundamentales para que el proceso sea correcto, lo cual es un requisito para la implantación (Hammadeh *et al.*, 2011). La eclosión o “hatching” es indispensable para la implantación, es decir, el blastocisto debe ser capaz de salir de la ZP. Esto se produce, además de “in vivo”, in vitro y fuera del útero (gestación ectópica), lo que indica que la participación del útero no es necesaria.

Sin embargo, el mecanismo por el cual la eclosión promueve la implantación pre-embriónica aún no está completamente claro. La mayoría de los pre-embriones eclosionan durante este tiempo, sugiriendo que una precisa sincronización entre el pre-embrión y el endometrio debe ser esencial (Liu *et al.*, 1993).

## **1.5 IMPLANTACIÓN PRE-EMBRIONARIA**

La implantación pre-embriónica o nidación es la fijación del pre-embrión, en estado de blastocisto, al útero materno que debe encontrarse en fase receptiva.

Se considera que la implantación pre-embriónica es un suceso único, ya que tanto el pre-embrión como la madre, siendo organismos diferentes genética e inmunológicamente, tienen la capacidad de comunicarse y establecer una relación de la cual va a depender la continuidad de la especie humana (Simón *et al.*, 1997). La implantación ocurre 6 o 7 días después de la ovulación y de forma sincronizada, puesto que el período de tiempo en el que transcurre el diálogo entre endometrio y pre-embrión debe coincidir con la de máxima receptividad uterina, proceso que recibe el nombre de ventana de implantación. El período de la ventana de implantación es desde el día 20 hasta el día 24 después de la ovulación.

La implantación consta de tres fases: aposición, adhesión e invasión. En la fase de aposición, el blastocisto encuentra su lugar de implantación orientándose de forma específica con su polo pre-embriónico dirigido hacia el epitelio endometrial superficial. En la adhesión, se produce un contacto directo entre el epitelio endometrial y el trofocotodermo del blastocisto. Tanto la aposición como la adhesión ocurren entre el sexto y séptimo día post fecundación. En la última fase, la invasión, el trofoblasto embriónico penetra y desplaza al epitelio endometrial, destruyendo la membrana basal e introduciéndose en el estroma invadiendo los vasos uterinos.

La implantación temprana está asociada a un embarazo viable, mientras que una implantación tardía se relaciona con la incidencia de abortos.

La relación entre el grosor de la ZP y la implantación sigue estando en duda, según Tucker *et al.*, 1993, sugiriendo que el factor limitante no es el grosor, sino la resistencia de la capa de la ZP.

## **1.6 ESTRATEGIAS PARA POTENCIAR LA ECLOSIÓN PRE-EMBRIONARIA IN VITRO: ECLOSIÓN ASISTIDA**

Si el blastocisto no puede salir de la ZP no será posible que se produzca la implantación.

La eclosión asistida (EA) o “assisted hatching” (AH) fue introducido por Cohen en 1990, quien propuso esta técnica como parte de una solución a los problemas de la implantación pre-embrionaria (Cohen *et al.*, 1990). Este mismo grupo desarrolló inicialmente, en 1989, la disección parcial de la zona pelúcida (PZD), de forma mecánica. La idea era para facilitar la penetración del espermatozoide en el ovocito a través del orificio realizado (Cohen *et al.*, 1989). Al encontrar superiores tasas de implantación, en los ovocitos sometidos a PZD, llegaron a la conclusión de que al hacer el orificio de forma mecánica, en la ZP, se podía favorecer la eclosión de los blastocistos, aumentando de esta forma las tasas de gestación e implantación. Cohen y su grupo, consideran que las posibles causas de fallo de implantación, en líneas generales, son: 1-El ambiente folicular y la receptividad endometrial. 2-Las condiciones de cultivo a las que los gametos y los pre-embriones están expuestos. 3-El procedimiento de la transferencia. 4-Las anomalías genéticas. Además, sugieren una quinta causa que es la imposibilidad del pre-embrión para realizar la eclosión de la ZP de manera natural, a pesar de la buena morfología pre-embrionaria (Cohen *et al.*, 1990).

Se sabe que la eclosión asistida está indicada en pacientes de peor pronóstico reproductivo como pueden ser aquellas que pertenecen al grupo de fallo de implantación (Magli *et al.*, 1998; Primi *et al.*, 2004), con edad avanzada (Cohen *et al.*, 1992; Schoolcraft *et al.*, 1994; Montag *et al.*, 1999; Ghobara *et al.*, 2006) y en criotransferencias (Gabrielsen *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2008).

Durante las dos décadas pasadas, se han utilizado diferentes métodos para la manipulación de la ZP en mujeres a partir de los 35 años (Balaban *et al.*, 2002). El meta análisis, sobre el impacto de la EA, con diferentes técnicas, publicado por Edi-Osagie *et al.*, 2003, indica una mejora en los resultados en mujeres de edad materna avanzada. Otra revisión sistemática (Das *et al.*, 2009), donde se analizaron los datos de 28 publicaciones, revelan que hay evidencias de que la EA puede incrementar las tasas de éxito en mujeres con fallo de implantación y probablemente en edad avanzada, pero se deben estudiar más las tasas de gestación múltiple. Parece ser que, tanto la edad avanzada como el cultivo in vitro de los pre-embriones pueden causar un en-

endurecimiento de la ZP haciendo necesaria la aplicación de la técnica de EA para facilitar la eclosión de los blastocistos, aumentando de este modo las tasas de gestación e implantación (Magli *et al.*, 1998).

Se cree que la no eclosión de forma natural es debida a anomalías en la ZP que pueden ser producidas por condiciones subóptimas endureciéndose la ZP en pre-embriones criopreservados (Cohen *et al.*, 1990), por engrosamiento o endurecimiento de esta (Cohen *et al.*, 1991) o en pre-embriones que provienen de mujeres con 38 o más años (Cohen *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 1995).

Los pre-embriones en los que se realiza un orificio en la ZP inician la eclosión más rápidamente que los pre-embriones intactos. Esto puede permitir un acelerado contacto pre-embrión-endometrio con una exposición temprana de los pre-embriones a factores vitales de crecimiento. Además, la mayoría de las moléculas son capaces de atravesar la ZP y el transporte de metabolitos está relacionado con el grosor de esta. Existen vías de transporte de metabolitos y factores de crecimiento, a través de la ZP, que pueden alterarse debido a la presencia de un orificio artificial (Cohen *et al.*, 1992, 1994). Teóricamente, la EA abre importantes rutas para favorecer el paso de nutrientes del medio de cultivo hacia el ovocito/pre-embrión. Estos nutrientes mejoran el desarrollo del pre-embrión hasta la formación del blastocisto (Hershlag *et al.*, 2005). El estudio de Schiewe *et al.*, 1995, muestra que las condiciones subóptimas de cultivo pueden perjudicar la producción de lisinas en la ZP, por lo tanto, la optimización de las condiciones de cultivo, el pH y la temperatura pueden evitar el deterioro *in vitro* del pre-embrión. También demostraron que algunos pre-embriones experimentaban una reducción completa o inhabilidad para secretar el factor "hatching" (deterioro cuantitativo) y/o lisinas uterinas independientemente de las condiciones de cultivo lo que podría inhibir la eclosión normal del blastocisto.

Mercader *et al.*, 2001, evaluaron la tasa de eclosión espontánea pre-embriónica, en un sistema de cocultivo, en mujeres con edad avanzada y/o fallos repetidos de implantación. Se analizaron un total de 1.372 embriones. En el grupo control (ovocitos de donantes), 275 de 447 pre-embriones se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto (61,5%) y 38 de ellos (8,5%) eclosionaron en día 6 de desarrollo. En pacientes mayores de 36 años, la eclosión espontánea fue significativamente más baja (3,4%) comparada con el grupo de mujeres menores de 37 años (9,1%). Concluyen que la eclosión espontánea en humanos puede ocurrir en un sistema de cocultivo *in vitro*, indicando que el fallo repetido de implantación y la edad materna avanzada están



asociados con baja calidad pre-embionaria, pero la habilidad del pre-embrión para eclosionar no se ve afectada.

Para realizar la EA, se han desarrollado diferentes técnicas:

### 1.6.1 Técnica no invasiva: tratamiento enzimático

Esta técnica busca un adelgazamiento de la ZP pero sin romperla. Es un procedimiento realizado en pre-embiones, en estadio de blastocisto, que consiste en sumergirlos en una solución de pronasa, durante un minuto, para debilitar la ZP (Fig. I-19). Esta técnica fue descrita por Fong *et al.*, 1998, publicando tasas de gestación e implantación de 53% y 33%, respectivamente, en 19 pacientes, con una media de edad de  $32,6 \pm 5,2$  años. Otro estudio publicado por Sifer *et al.*, 2006, presenta el mismo tratamiento enzimático pero en pre-embiones criopreservados en D3, y se comparan descongelados frente a grupo control. Las tasas de gestación e implantación, de pacientes con pre-embiones sometidos a este tratamiento enzimático, fueron 28,0% y 15,2 % vs 31,0% y 17,8%, respectivamente, en pacientes con las mismas edades entre 28 y 36 años en cada grupo. Concluyen que el tratamiento enzimático no mejora los resultados en un programa de congelación de pre-embiones.

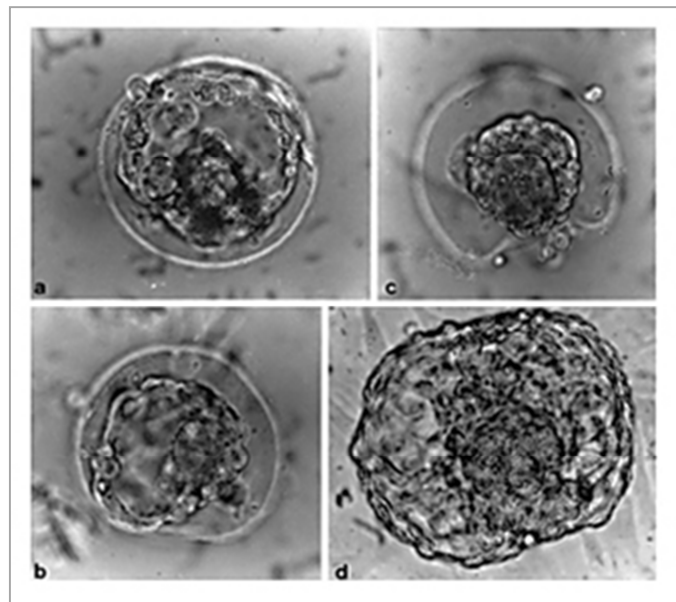


Fig. I-19. Colapso de la cavidad blastocélica y reexpansión del blastocisto 2 horas después de remover ZP por tratamiento enzimático (Fong *et al.*, 1998).

## 1.6.2 Técnicas invasivas: química y mecánica

Los métodos invasivos crean un orificio en la ZP utilizando diversos procedimientos.

### 1.6.2.1 Digestión química con solución ácida de tyrode

Cohen *et al.*, 1990, fueron los primeros en desarrollar la técnica y demostraron que la apertura de un orificio, en la ZP, favorece el proceso de eclosión pre-embriónica que necesitan realizar todos los pre-embiones antes de su implantación en el endometrio. Se realiza a pre-embiones de D2 o D3 de desarrollo pre-embriónico, con ácido tyrode (pH 2,35) produciendo una rotura completa de la ZP. El tamaño del orificio practicado no debe ser superior a 30 $\mu$ m (Fig. I-20). La técnica se introdujo con el objetivo de evitar los posibles efectos perjudiciales de la disección de la zona pelúcida (PZD).

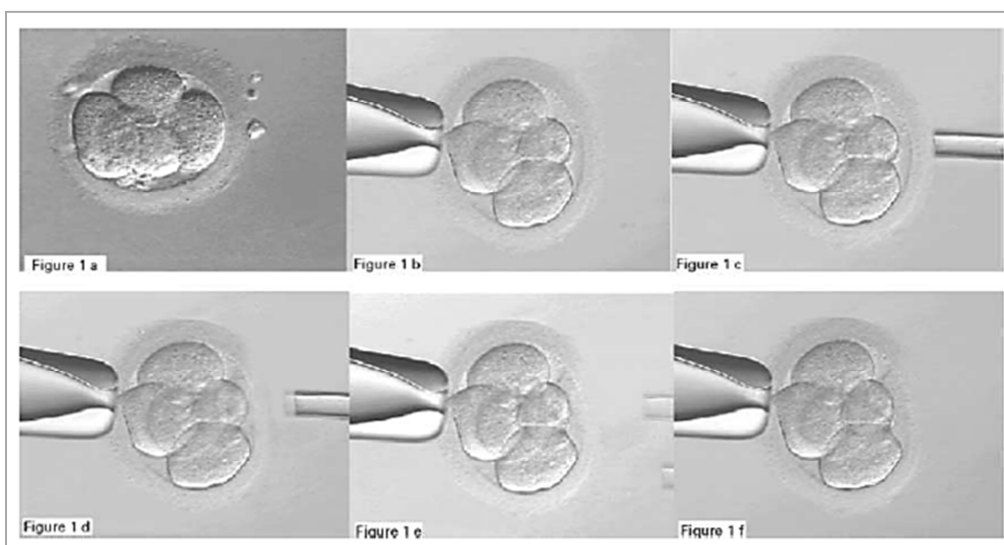


Fig. I-20. Digestión química con solución ácida de tyrode (Gabrielsen *et al.*, 2004).

Se ha visto que los pre-embiones tratados con esta técnica pueden presentar dificultades en el momento de eclosionar (Cohen *et al.*, 1992).

Los primeros estudios, con el uso de esta metodología, en mujeres menores de 38 años, describen resultados más altos en tasas de implantación, del 28% frente al grupo control de un 21% no siendo estadísticamente significativo, aunque la incidencia

de gestación múltiple se incrementa del 38% al 60%. También realizaron un segundo análisis para valorar la eficacia de la técnica en embriones con ZP mayores de 15 $\mu$ m frente al grupo control existiendo diferencias significativas a favor del grupo de EA (Cohen *et al.*, 1992). Tucker *et al.*, 1993, aplicaron la técnica de afinamiento de la ZP mediante ácido tyrode en 110 pacientes, obteniendo una tasa de gestación de 44,6%, mientras que en el grupo control (108 pacientes) la tasa de gestación fue del 37,0%. Aunque no encontraron diferencias estadísticamente significativas, demostraron que la aplicación de la técnica de tyrode no perjudica el desarrollo pre-embionario y los resultados de gestación e implantación. Los resultados de Schoolcraft, demuestran que la EA, aplicada a pacientes con pobre pronóstico reproductivo, mejoran las tasas de gestación e implantación (Schoolcraft *et al.*, 1994). Gabrielsen *et al.*, 2004 demuestran que cuando aplican la técnica a pre-embiones descongelados, las tasas de gestación son similares, pero las de implantación son más altas cuando la técnica de eclosión asistida es aplicada comparándola con el grupo control (11,4% vs 5,8%). A pesar de hacer un orificio pequeño, no se puede eludir el micro daño que se ocasiona a las frágiles blastómeras con el ácido tyrode (Hsieh *et al.*, 2002).

#### 1.6.2.2 Disección mecánica parcial de la zona pelúcida (PZD)

Consiste en realizar un orificio artificial mediante la perforación de la ZP con una micropipeta que es empujada, de forma tangencial, a través del espacio perivitelino y la ZP (Cohen *et al.*, 1990). El método es fácil y seguro pero se producen orificios de diferente tamaño y esto, parece ser que no es óptimo (Fig. I-21).

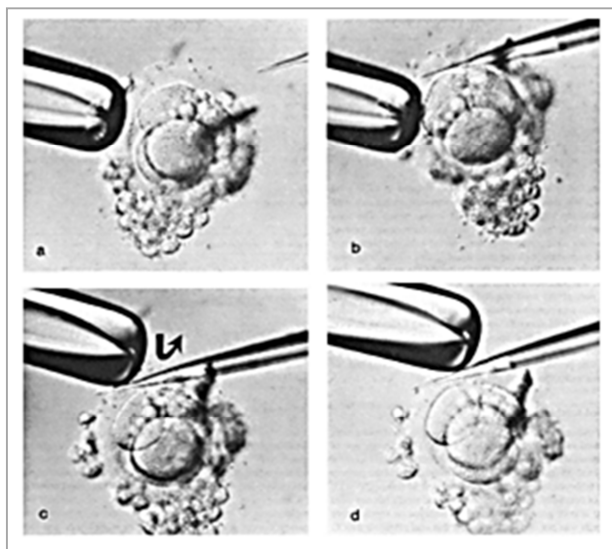


Fig. I.21. Disección mecánica parcial de la ZP (PZD) (Cohen *et al.*, 1990).

Este grupo publicó los resultados obtenidos en 77 pacientes (media de edad: 34 años) sometidas a este procedimiento. Las tasas de gestación e implantación no fueron estadísticamente significativas cuando la técnica fue aplicada. Hellebaut *et al.*, 1996, concluyeron con sus estudios que la eclosión asistida a través de PZD, antes de la transferencia pre-embionaria, no mejoraba las tasas de gestación e implantación en pacientes sometidas a ICSI.

El orificio generado por esta técnica puede hacer que el pre-embrión quede atrapado dentro de la ZP impidiendo la eclosión. En la actualidad, según la literatura revisada, la técnica no se realiza debido a que es complicada y laboriosa.

### **1.6.2.3 Disección parcial alargada de la zona pelúcida (LZD)**

En 2012, Sun *et al.*, describen la técnica de disección parcial alargada de la ZP (LZD), utilizando las mismas pipetas que para la ICSI por medio de una metodología de tipo mecánico, en transferencia de blastocistos vitrificados y desvitrificados. Según los autores, este método puede solucionar el problema relacionado con el tamaño y el sitio de la eclosión asistida, pudiendo de esta manera, facilitar la salida del blastocisto. No se requiere ningún equipo nuevo y es de fácil manejo. Solo requiere de un micro-manipulador y las micropipetas de microinyección. Una vez colocada la pipeta holding, a las 9:00 horarias, en el blastocisto colapsado, se introduce la micropipeta de ICSI con la micropipeta de microinyección, a las 4:00 horarias. Posteriormente se procede a la introducción de la micropipeta de microinyección a las 8:00 o 9:00 horarias y se realiza un roce y disección sobre el borde de la pipeta “holding” mediante fricción continua (Fig. I-22). La tasa de blastocisto eclosionado fue significativamente más alta con LZD que comparada con el grupo PZD (52,4% vs 31%), al igual que las tasas de gestación e implantación.

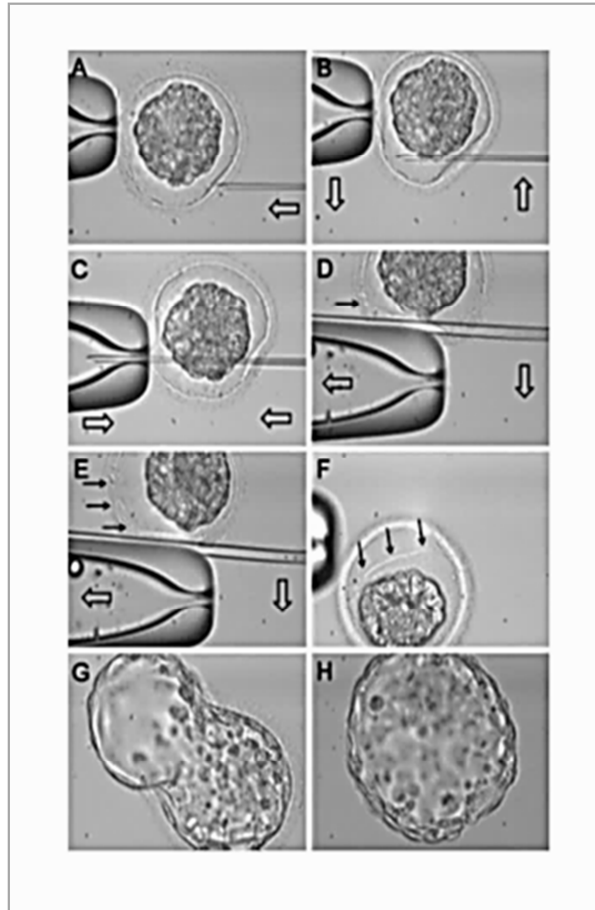


Fig. I-22 LZP usando una micropipeta de ICSI (Sun *et al.*, 2012).

#### 1.6.2.4 Piezomanipulación

Técnica utilizada con movimientos vibratorios generados por pulsos de una pieza eléctrica controlada para aplicar al área de la ZP (Nakayama *et al.*, 1990). La ZP de un pre-embrión humano fue colocada en un área para la micromanipulación con una micropipeta, que se utilizaba para la ICSI, la cual fue producida por una unidad de piezo-micromanipulador. Una tercera parte de la circunferencia visible de la ZP fue reducida en más de un 75% del grosor original con vibraciones débiles. Los autores describen que el orificio realizado en la ZP se realiza en un mínimo tiempo y con alta precisión. Un promedio de 6 aplicaciones son realizadas para producir un gran orificio, el cual facilita la completa eclosión del blastocisto. Los pre-embriones no sufren ningún daño, el desarrollo pre-embriionario a blastocisto es semejante al grupo control, pero los porcentajes de los blastocistos en eclosión son más altos cuando la técnica es aplicada. Además, los resultados de gestación fueron significativamente más altos con la Piezomanipulación (22,4%) al compararlos con el grupo control (7,4%) (Fig. I-23).

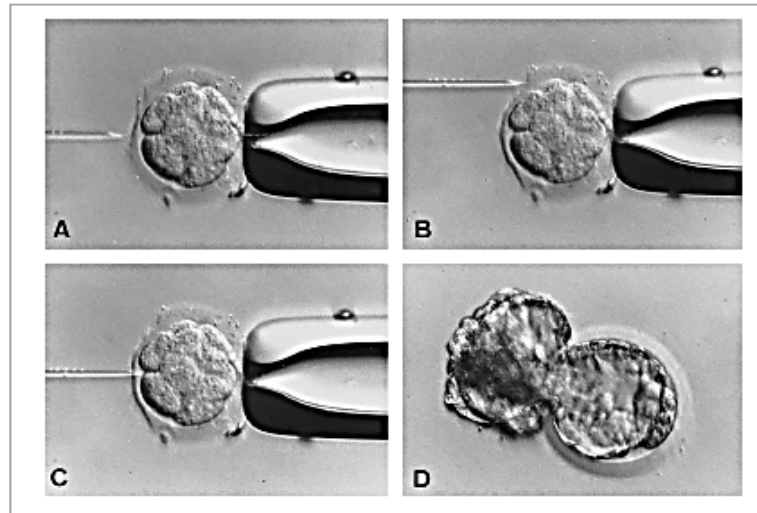


Fig. I-23. Piezomanipulación (Nakayama et al., 1990).

### 1.6.2.5 Disección de la zona pelúcida con láser

Se han propuesto diferentes metodologías con láser para mejorar los resultados de gestación e implantación. Sin embargo, no existe un consenso acerca de la efectividad de la eclosión asistida en los pre-embriones que provienen de mujeres en edad reproductiva avanzada.

Los primeros estudios publicados utilizando láser, en pre-embriones de ratón, demuestran un aumento en las tasas de implantación (Tadir *et al.*, 1991; Khalifa *et al.*; Germond *et al.*, 1995).

### 1.6.2.6 Eclosión asistida total mediante láser (EATL)

Consiste en la creación de un orificio entre 20-30 $\mu$ ms en la ZP, utilizando un sistema de láser “no contact”, adaptado a un microscopio invertido a 20-40x aumentos, con un tiempo de exposición variable según el tipo de láser utilizado.

En pre-embriones humanos, Strohmer *et al.*, 1992, fue pionero en desarrollar la técnica EATL obteniendo tasas de gestación de 40,0% vs 16,2% con EATL vs grupo control respectivamente, en pacientes con fallos previos de implantación. La técnica parece tener ciertas ventajas sobre otros métodos empleados, es sencilla de manejar y fácilmente adaptable a cualquier microscopio invertido. Se tiene un mayor control y precisión, en comparación con otros métodos, permite la micromanipulación “non contact” y evita cualquier clase de daño mecánico o químico de los pre-embriones. Diferentes autores han apostado por esta técnica. Shiewe *et al.*, 1995b, demostraron con

sus experimentos, en ratones, que la tasa de blastocisto eclosionado se incrementaba en un 57% en los pre-embriónes en los que se realizaba EATL frente a los que no se realizaba (5%). Las tasas de implantación no se vieron afectadas por la realización de la eclosión asistida mediante láser de forma total. Hsieh *et al*, 2002, señalan que la EA con láser es más efectiva que la EA con ácido tyrode, mejorando las tasas de implantación y de gestación en mujeres de edad avanzada.

Aktan *et al.*, en 2006, publicaron un trabajo randomizado acerca de la longitud del AZPL en pre-embriónes transferidos (25 y 50 $\mu$ m) y los efectos en la implantación, en 60 pacientes con 38 años o más, concluyendo que la longitud de ambos tamaños no tienen ninguna significancia estadística respecto a las tasas de gestación en mujeres de edad avanzada: 23,3% y 26,7%, respectivamente. Además, el procedimiento en sí, es más rápido, puede tardar unos segundos comparado con la técnica mecánica, y hay que tener en cuenta que un tiempo excesivo fuera del incubador puede ser perjudicial para los pre-embriónes (Makrakis *et al.*2006).

El orificio se debe de realizar en los espacios entre blastómeras para evitar que el láser ocasione algún daño al citoplasma celular (Fig. I-24), (Ghobara *et al.*, 2006). Sin embargo, Mantoudis *et al.*, 2001, sostiene que la EATL ocasiona efectos negativos sobre la capa interna de la ZP y como consecuencia, las tasas de gestación e implantación se ven perjudicadas.

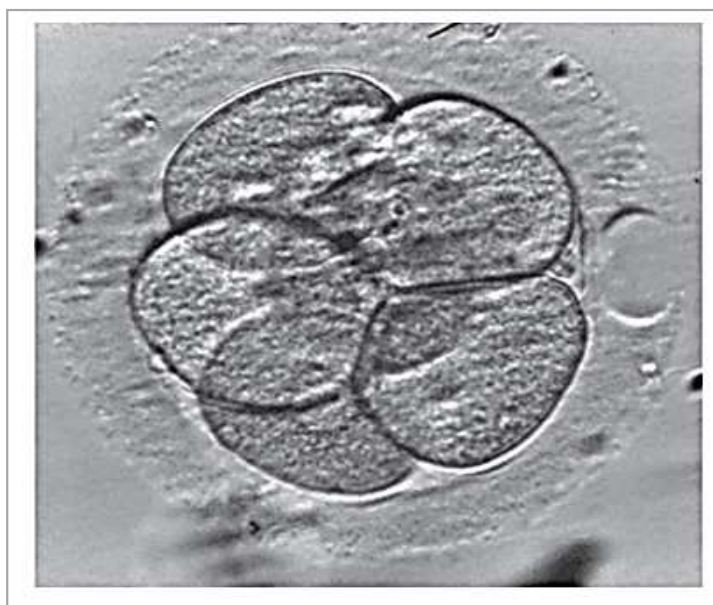


Fig. I-24. EATL realizado a un pre-embrión en D3 de desarrollo (Ghobara *et al.*, 2006).

### 1.6.2.7 Afinamiento de la zona pelúcida mediante láser (AZPL)

En 1996, Antinori *et al*, publican los primeros trabajos donde realizan un pequeño afinamiento de la ZP pre-embriónica, de forma parcial (AZPL). Este afinamiento consiste en adelgazar el 50% del grosor de la ZP realizando 5 o 6 pulsos, utilizando una longitud aproximada de 20µm en pre-embiones de D2 de desarrollo. Estudiaron 773 pre-embiones, con ZP mayor de 12µm, obteniendo unos resultados estadísticamente significativos en tasas de gestación (44,0% vs 23,0%) e implantación (11,8% vs 7,1) frente al grupo control (Figura I-25). Antinori se basó en el modelo animal utilizado por Khalifa *et al.*, 1992, donde compararon, en pre-embiones de ratón, el desarrollo a blastocisto utilizando la técnica de la eclosión asistida con ácido tyrode, en un grupo de pre-embiones, en D3, y AZPL en otro grupo intentando simular el adelgazamiento natural de la ZP. La eclosión pre-embriónica mejoraba cuando la AZPL fue aplicada (31,4%), mientras que en el otro grupo, la llegada de los pre-embiones a blastocisto fue del 12%. Además, el grupo de Antinori publicó otro artículo, ese mismo año, en el que al comparar las tasas de gestación e implantación, en pacientes con pre-embiones tratados y no tratados, obtienen un aumento estadísticamente significativo tanto en la tasa de gestación (44,4% vs 19,3%, respectivamente) como en la de implantación (16,0% vs 5,1%, respectivamente). Gordon *et al.*, 1993, compararon resultados de implantación, también en el ratón, pero haciendo un afinamiento en toda la circunferencia pre-embriónica encontrando un gran incremento en las tasas de implantación.



Fig.I-25. AZPL realizado a un pre-embrión en D3 de desarrollo (Antinori *et al.*, 1995).



Blake *et al.*, 2001, realizó un orificio en la ZP entre 20-40µm de diámetro, en 26 pre-embriones, y 8 de 9 blastocistos, mostraron indicios de estrangulamiento sin estar asociado un afinamiento natural y expansión del pre-embrión. Los autores decidieron investigar la causa de este fenómeno. Un aspecto clave del afinamiento de la zona es la salida del pre-embrión. No obstante, hay que subrayar que la manipulación no mejora la viabilidad intrínseca del pre-embrión, sino que simplemente intenta favorecer a los pre-embriones que no tienen la capacidad de eclosionar de la ZP. Este grupo realizó un AZPL, con un máximo de 6 pulsos, en un 50-80% del grosor de la ZP, con una longitud aproximada de 80µm, obteniendo que el inicio de la eclosión era evidente en los pre-embriones que habían tenido el afinamiento, mientras que en el grupo control no había evidencias. Los investigadores añaden información acerca de 38 blastocistos del grupo experimental de los cuales 16 habían iniciado la eclosión por el sitio donde se había realizado el afinamiento de la ZP (68% vs 33%), respectivamente. Los pre-embriones restantes no tenían un sitio de eclosión definido, concluyendo que el AZPL incrementa, de forma significativa, las tasas de eclosión completa *in vitro*.

Se ha publicado que las pacientes que se pueden beneficiar de esta técnica son las que pertenecen al grupo de infertilidad idiopática (Loret de Mola *et al.*, 1997) o baja calidad pre-embionaria y mayores de 38 años (Bider *et al.*, 1997). Mantoudis *et al.*, 2001, publicó un trabajo donde comparó resultados entre EATL y AZPL, en 164 pacientes, mayores de 37 años, y observó que ésta última técnica era más efectiva en tasas de gestación, aunque las tasas de implantación eran similares. Sin embargo, la tasa de gestación múltiple que obtuvieron era mayor en el grupo de AZPL mientras que las tasas de aborto se observaron en mayor porcentaje en el grupo de EATL. Ghobara *et al.*, 2006, obtienen similares resultados pero en mujeres menores de 37 años, mientras que en las mujeres mayores de 38, no encontraron ningún impacto positivo después de la aplicación del AZPL. Petersen *et al.*, en el 2002, publica una modalidad de afinamiento de la zona pelúcida, con 1-2 pulsos de 10ms, realizadas en cuatro sitios diferentes de la ZP, en cada pre-embrión, en D2 o D3 de desarrollo pre-embionario, momentos previos a la transferencia, para afinar entre un 60-90% la ZP. Este tipo de afinamiento fue comparado con un grupo control, de 50 pacientes, mayores de 37 años, obteniendo peores resultados, de gestación e implantación, en el grupo de estudio (16% y 7%) vs el grupo control (22% y 8%). La explicación que proponen es que la longitud del afinamiento fue menor de 20µm y esto puede ser una limitación en los resultados (Fig.I-26).

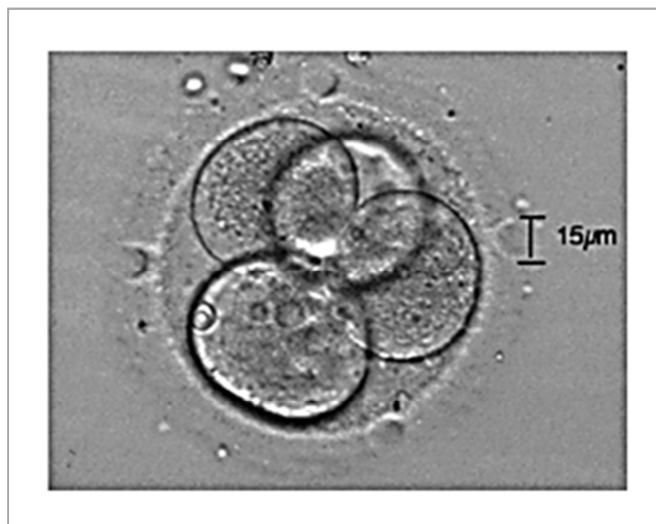


Fig. I-26. AZPL en 4 sitios de la ZP a pre-embrión en D2 (Petersen et al., 2002).

Las ventajas que ofrece la técnica de AZPL son varias: no es necesaria la utilización de una micropipeta de sujeción o “holding”, no existe riesgo de perder blastómeras en el procedimiento, cualquier infección es evitada puesto que no hay una ruptura total de la ZP y no hay que administrar a las pacientes tratamiento profiláctico de inmunosupresores y antibióticos. Además, existe una completa esterilidad, una alta precisión y una mayor selectividad en los procesos de micromanipulación y no hay ningún contacto del láser con las blastómeras, lo que quiere decir que no hay ningún efecto adverso. Tampoco se observan estrangulamientos pre-embriónicos, permitiendo la eclosión de una forma más favorable comparada con EAT (Blake *et al.*, 2001; Antinori *et al.*, 1995).

#### 1.6.2.8 Expansión mecánica

Fang *et al.*, en 2009, desarrollaron una nueva técnica inspirada en el efecto natural de la expansión del blastocisto sobre la ZP. No realiza orificios ni afinamientos sino que expande o estira la ZP a través de una presión hidrostática inyectada, para ayudar al proceso de la eclosión en pre-embriones de D3 congelados y descongelados. Debido a la hipótesis del endurecimiento de la ZP, durante la crioconservación pre-embriónica, observó que la presión hidrostática inyectada en pre-embriones descongelados en D3, favorecen las tasas de implantación comparado con el grupo control (37,7% vs 20,3%  $p=0,03$ ). Una vez que los pre-embriones son descongelados, se les inyecta una pequeña cantidad de medio de cultivo (200 $\mu$ l) dentro del espacio perivite-

lino. Tres horas más tarde, los pre-embriónes son reevaluados antes de la transferencia. Con este método, no solo consigue la expansión de los pre-embriónes descongelados, sino que también ejerce una presión sobre las blastómeras (Fig. I-27). Es posible que algunas blastómeras puedan resultar dañadas por la presión ejercida, sin embargo, en el estudio publicado no se detallan datos sobre daños celulares en todo el proceso de la expansión mecánica. Los investigadores no observan cambios en la ultra estructura de la ZP durante la expansión, sugiriendo futuros estudios mediante microscopía electrónica.

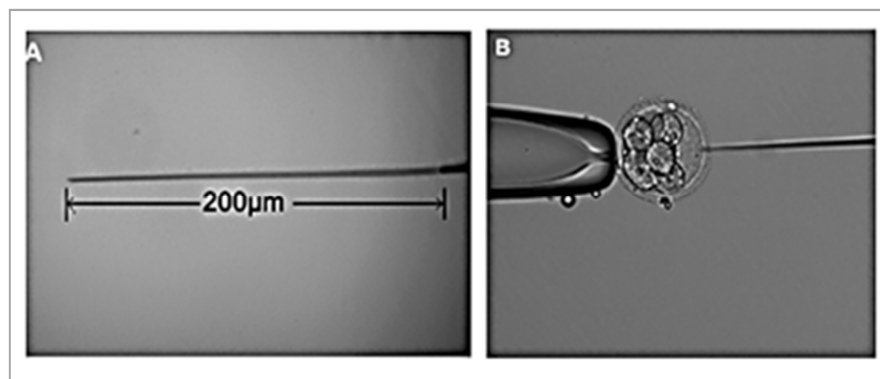


Fig. I-27. Expansión mecánica. (A). Pipeta con 200µm de medio de cultivo. (B). Introducción de medio en el espacio perivitelino del pre-embrión (Fang *et al.*, 2009).

### **1.7 ECLOSIÓN ASISTIDA (EA) RELACIONADO CON MUJERES DE EDAD MATERNA AVANZADA**

Todos los métodos anteriores, excepto el tratamiento enzimático con la pronasa y el AZPL, tienen como objetivo realizar un orificio en la ZP para facilitar la eclosión pre-embionaria y facilitar la implantación. Los estudios que han tenido como objetivo evaluar los resultados clínicos del efecto de la EA tienen resultados contradictorios. Algunos estudios demuestran que la EA es beneficiosa para mujeres de edad avanzada (Schoolcraft *et al.*, 1994; Bider *et al.*, 1997), casos con repetidos fallos de implantación (Strohmer *et al.*, 1992; Antinori *et al.*, 1996), en ciclos con pobre pronóstico en TRA (Nakayama *et al.*, 1999), mientras que otro estudio no obtienen ningún beneficio utilizando la técnica (Sallan *et al.*, 2002).

En la actualidad existe mucha polémica en cuanto a si la EA, utilizando cualquier metodología, mejora las tasas de embarazo, implantación y RNV en casa. La bibliografía consultada revela datos contradictorios comparando EA pero utilizando diferente metodología como AZPL vs tyrode (Hsieh *et al.*, 2002) o EA mediante láser (EAL) vs DZP (Makrakis *et al.*, 2006).

Los datos registrados en la tabla I-2 describen los resultados de tratamientos en pacientes mayores de 35 años, donde solamente se observa que hay una mejora en los resultados de gestación e implantación en 7 de los 17 estudios publicados siendo la última publicación, de 2014, con metodología del afinamiento de la ZP mediante láser.

Autores	Tipo	Nº Pacientes		T. Implantación			T. Gestación		
	EA	EA	No EA	EA	No EA	P	EA	No EA	P
Cohen <i>et al.</i> , (1992)	Tyrode	83	80	16,1	3,3	<0,05	51,0	36,0	<0,05
Schoolcraft <i>et al.</i> ,(1994)	Tyrode	43	33	33,0	6,5	<0,05	64,0	19,0	<0,05
Schoolcraft <i>et al.</i> ,(1995)	Tyrode	38	28	22,0	6,0	<0,05	58,0	21,0	<0,05
Bieder <i>et al.</i> , (1997)	Tyrode	211	174	3,5,0	3,55	NS	8,9	5,1	NS
Magli <i>et al.</i> , (1998)	Tyrode	45	42	11,5	4,0	<0,05	31,0	19,0	<0,05
Edirisingue <i>et al.</i> ,( 1999)	DZP	22	22	4,3	1,6	NS	9,1	4,5	NS
Edirisingue <i>et al.</i> ,( 1999)	DZP	30	29	5,5	6,9	NS	10,0	17,2	NS
Petersen <i>et al.</i> ,(2002)	AZPL	50	50	7,0	8,2	NS	16,0	22,0	NS
Horng <i>et al.</i> , (2002)	AZPL	24	56	9,0	7,4	NS	20,8	14,2	NS
Horng <i>et al.</i> , (2002)	AZPL	16	24	3,1	7,1	NS	12,5	20,8	NS
Primi <i>et al.</i> , (2004)	AZPL	22	21	6,4	9,1	NS	13,6	23,8	NS
Primi <i>et al.</i> , (2004)	AZPL	23	21	9,1	9,1	NS	21,7	23,8	NS
Petersen <i>et al.</i> , (2005)	AZPL	40	40	2,6	10,9	<0,05	25,0	25,0	<0,05
Frydman <i>et al.</i> , (2006)	AZPL	49	54	16,7	16,1	NS	34,7	38,8	NS
Kutlu <i>et al.</i> , (2010)	AZPL	58	55	19,0	17,0	NS	43,0	38,0	NS
Ghannadi <i>et al.</i> , (2010)	AZPL	83	116	-	-	-	27,1	16,3	<0,05
Aktas <i>et al.</i> , (2014)	AZPL	73	73	-	-	-	46,0	26,0	<0,05

Tabla I-2 Estudios de EA en pacientes de edad avanzada.

## 1.8 RIESGO DE GEMELARIDAD

The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (2014), publica que no hay suficientes datos que evidencien el efecto positivo de la EA en la tasa de RNV. Observan que la EA está asociada con un aumento en el riesgo de gemelos monocigóticos aunque no existe una evidencia suficiente. Concluye que la EA

no se recomienda como una técnica de rutina para todas las pacientes que se sometan a TRA, sino en los casos de peor pronóstico reproductivo.

Los nacimientos gemelares monocigóticos se confirman cuando el número de fetos excede el número de pre-embryones transferidos o cuando se observa en un saco amniótico dos fetos (monoamniótico-monocoriónico) o dos sacos separados (diamniótico-monocoriónico) (Alikani *et al.*, 1994). La incidencia de gemelos monocigóticos, en gestaciones espontáneas, está alrededor del 0,4-0,45% (Derom *et al.*, 1978), mientras que los datos de gemelos monocigóticos tras TRA son del 2,3% (Blickstein *et al.*, 2003).

En el contexto de los TRA, existe un gran debate alrededor del incremento de la tasa de gemelaridad monocigótica. Se han sugerido como posible causa varios factores tales como la edad materna avanzada, la estimulación ovárica, la manipulación de la ZP, el cultivo in vitro, anomalías de la ZP y la cavitación múltiple en el blastocisto (Cohen *et al.*, 1990; Aston *et al.*, 2008).

La revisión realizada por Aston *et al.*, 2008, señala estudios que indican el incremento del riesgo de gemelos homocigóticos en: 1,2% (Herghlag *et al.*, 1999), 3,2% (Saito *et al.*, 2000), 5,9% (Tarlantzis *et al.*, 2002) y 2,4% (Alikani *et al.*, 2003). También observa que no existe una asociación entre la manipulación de la ZP y el incremento de gemelos monocigóticos (Behr *et al.*, 2000; Schachter *et al.*, 2001; Milki *et al.*, 2003; Elizur *et al.*, 2004; Yanaihara *et al.*, 2007).

## **2. OBJETIVOS**

### 1. Objetivo principal:

Analizar si la aplicación del AZPL es una herramienta útil para aumentar la tasa de **gestación** en pacientes que se sometan a un TRA, en ciclos de FIV/ICSI, según:

1A) La edad de la paciente:

- Pacientes con 38-39 años
- Pacientes con edad mayor o igual a 40 años

1B) El grosor de la ZP:

- Menor de 15 $\mu$ m
- Mayor o igual de 15 $\mu$ m

### 2. Objetivos secundarios:

Analizar si la aplicación del AZPL es una herramienta útil para aumentar las tasas de **implantación, aborto, RNV** y disminuir o no aumentar las tasas de aborto y gemelari-  
dad en pacientes que se sometan a TRA, en ciclos de FIV/ICSI, según:

2A) La edad de la paciente:

- Pacientes con 38-39 años
- Pacientes con edad mayor o igual a 40 años

2B) El grosor de la ZP:

- Menor de 15 $\mu$ m
- Mayor o igual de 15 $\mu$ m

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1 AMBITO DEL ESTUDIO

Estudio retrospectivo, realizado en el IVI-Murcia, durante el periodo comprendido entre Marzo del 2006 y Diciembre del 2012.

Ha sido aprobado por la Comisión de Investigación del Instituto Valenciano de Infertilidad-IVI Sevilla y el Comité ético de investigación clínica del Hospital General Universitario José María Morales Meseguer de Murcia.

La población estudiada comprende 308 pacientes, con edad materna avanzada (mayor o igual a 38 años), que se sometieron a un TRA (FIV y/o ICSI).

### 3.2 GRUPOS DEL ESTUDIO

Los ciclos correspondientes a las 308 pacientes fueron distribuidos, de forma aleatoria, en 2 grupos, según se realizara o no la técnica motivo de estudio:

A: 154 ciclos en los que no se realizó AZPL (No-AZPL) a los pre-embriones.

B: 154 ciclos en los que sí que se les realizó AZPL (AZPL) a los pre-embriones.

Estos dos grupos se subdividieron a su vez, según la edad, en 2 grupos: 38-39 años y mayor o igual a 40 años, quedando un total de 4 grupos de análisis:

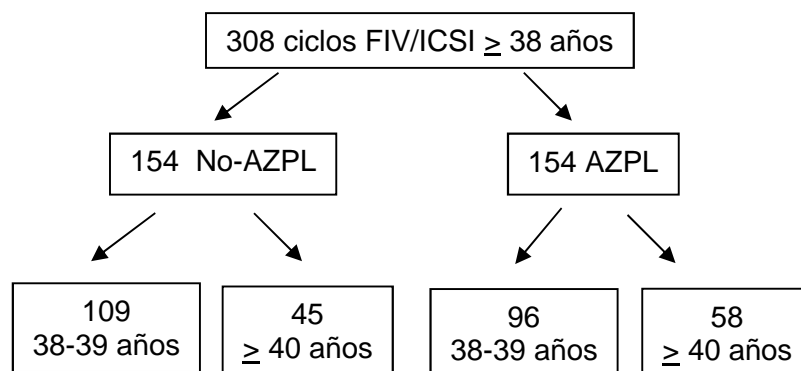
-Pacientes con 38-39 años, a cuyos pre-embriones no se les realizó el afinamiento de la zona pelúcida: No-AZPL 38-39 años.

-Pacientes con 38-39 años, a los que sí que se les realizó AZPL: AZPL 38-39 años.

-Pacientes con edad mayor o igual a 40 años sin AZPL: No-AZPL  $\geq$  40 años.

-Pacientes con edad mayor o igual a 40 años con AZPL: AZPL  $\geq$  40 años.

Los grupos de estudio se presentan en el Esquema M&M-1.



Esquema M&M-1. Grupos de estudio No-AZPL vs AZPL y edad.

El grosor de la zona pelúcida fue analizado y dividido en dos grupos.

A: pre-embriónes cuyo grosor medio de la ZP fuera  $\geq 15\mu\text{m}$ .

B: pre-embriónes con diámetro medio de la ZP  $< 15\mu\text{m}$ .

A su vez, estos grupos fueron analizados evaluando el impacto del AZPL, según 2 grupos de edad: 38-39 años y 40 o más años.

-Pacientes con 38-39 años con pre-embriónes con:

ZP  $< 15\mu\text{m}$

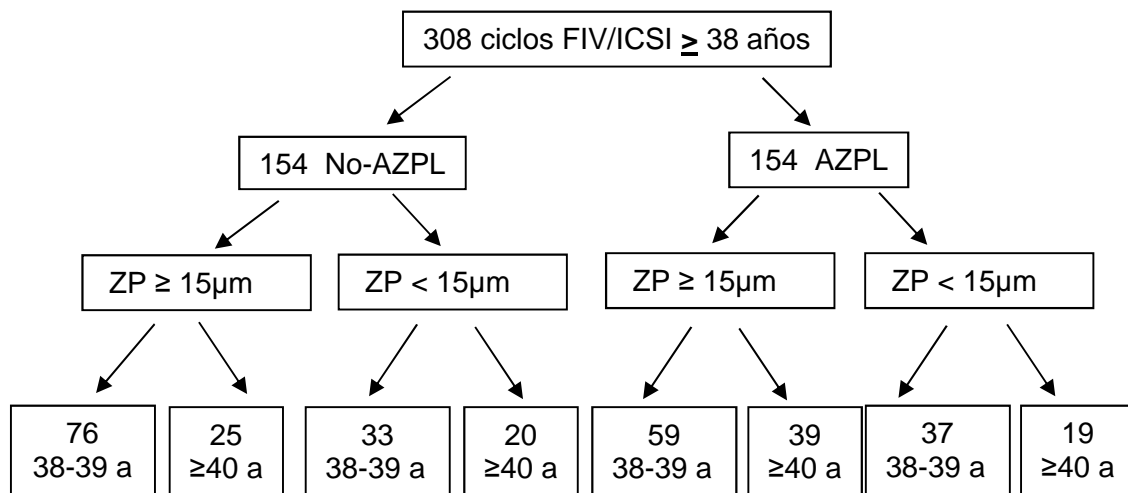
ZP  $\geq 15\mu\text{m}$

-Pacientes  $\geq 40$  años con pre-embriónes con:

ZP  $< 15\mu\text{m}$

ZP  $\geq 15\mu\text{m}$

Los grupos se presentan en el siguiente Esquema M&M-2.



Esquema M&M-2. Grupos de estudio No-AZPL vs AZPL, edad y grosor de ZP pre-embriónica.

### 3.2.1 Criterios de inclusión:

- TRA realizado en la Clínica IVI-Murcia.
- Fecha de transferencia entre marzo de 2006 y diciembre de 2012.
- Pacientes de edad  $\geq 38$  años, de primer ciclo de TRA, con ovocitos propios frescos y/o vitrificados (Tabla M&M-1) cuya técnica de inseminación fue FIV y/o ICSI (Tabla M&M-2).

Tabla M&amp;M-1. Grupos de pacientes según origen de los ovocitos.

<b>Pacientes</b>	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>
Ovocitos frescos 38-39 años	103	89
Ovocitos vitrificados 38-39 años	2	6
Ovocitos frescos-vitrificados 38-39 años	4	1
Ovocitos frescos $\geq$ 40 años	39	49
Ovocitos vitrificados $\geq$ 40 años	6	5
Ovocitos frescos-vitrificados $\geq$ 40 años	0	4

Tabla M&amp;M-2. Grupos de pacientes según tratamiento.

<b>Pacientes</b>	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>
38-39 años FIV	14	7
38-39 años ICSI	92	89
38-39 años FIV-ICSI	3	0
$\geq$ 40 años FIV	3	6
$\geq$ 40 años ICSI	41	51
$\geq$ 40 años FIV- ICSI	1	1

### 3.2.2 Criterios de exclusión:

En el presente estudio no fueron incluidas pacientes:

- Con fallos de implantación.
- Con aborto a repetición.
- Del programa de diagnóstico genético preimplantacional (DGP).
- Con transferencias en estadio de blastocisto.
- Criotransferencias.

### 3.2.3 Base de datos

Los datos procedentes del sistema informático SIVIS (base de datos y programa de gestión clínica del IVI) fueron exportados a un programa Excel, donde se realizaron las acciones pertinentes para revisar la calidad de los mismos, corregir posibles errores y, posteriormente, en SPSS, se procedió al análisis estadístico.

Estos datos fueron anonimizados, de forma que se ocultó la información que pudiera servir para identificar a pacientes concretos en los listados.

## 3.3 METODOLOGÍA

### 3.3.1 Estimulación

Las pacientes fueron estimuladas según los protocolos de estimulación ovárica controlada (EOC) empleados de rutina por los ginecólogos en la consulta. Según la etiología, o determinados factores como la edad materna, se intentaron personalizar al máximo con cada paciente, para obtener los mejores resultados de manera individualizada (Escudero *et al.*, 2004; García Velasco., *et al* 2011). Cuando al menos 2 folículos alcanzaron un diámetro >17mm, se administró la hCG (Ovitrelle, Merck Serono. London, Reino Unido).

### 3.3.2 Punción folicular

Transcurridas 36 horas, las pacientes se sometieron a la aspiración folicular para la obtención de los ovocitos.

Una vez localizados los complejos CCO, mediante inspección bajo lupa del líquido folicular, en placa de Petri embriotestada Nunc 150350 (Biocare, Roma. Italia), sobre la superficie calefactada, a 37°C, de la campana de flujo laminar del laboratorio, éstos fueron trasladados a placas Nunc 150270 (Biocare, Roma. Italia), que contenían

medio de cultivo Global W/Hepes (LGGH-500, Life Global, Connecticut. USA) suplementado con 10% LG Protein Supplement (LGPS, Life Global Connecticut. USA). Las placas fueron cubiertas con aceite mineral Paraffin Oil P.G. (LGPO-500, Life Global, Connecticut. USA) atemperado desde el día anterior. Una vez lavados los ovocitos en este medio, inmediatamente se trasladaron a placas Falcon 351058 (EMB, Barcelona. España), con medio de cultivo Global “for fertilization” (LGGF-050, Life Global, Connecticut. USA), suplementado con 10% LG Protein Supplement (LGPS, Life Global, Connecticut. USA) cubiertas con aceite mineral (Paraffin Oil P.G. (LGPO-500, Life Global, Connecticut. USA), también equilibradas desde del día anterior, donde fueron clasificados según el aspecto del CCCO. Las placas que contienen los ovocitos fueron llevadas a incubadores calibrados y verificados a 37°C y 6,0% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de la FIV y/o la ICSI. El complejo CC fue eliminado con la exposición a hialuronidasa (LGHY-010 Life Global, Connecticut. USA), a una concentración de 80UI/ml cuando los ovocitos se sometían a la ICSI. Los ovocitos desnudos, y clasificados como maduros (MII) por la presencia del primer corpúsculo polar, fueron incubados en placas de cultivo Falcon 351058 (EMB, Barcelona, España) que contenían medio Global “for fertilization” hasta el momento de realizar la microinyección, cuatro horas post recuperación ovocitaria. Los ovocitos que se destinaban a la FIV convencional, eran inseminados a las cuatro horas, después de la recuperación ovocitaria, en una dilución espermática, capacitada previamente en medio Global “for fertilization” mediante técnicas de separación por swim-up o gradientes de densidad Allgrad 45% (AG45-050, Life Global, Connecticut. USA), Allgrad 90% (AG90-050, Life Global, Connecticut. USA). La ICSI fue realizada en un microscopio invertido Eclipse TE 300, (Nikon Instrument, NY, USA), equipado con una óptica de Hoffman, provisto de una placa calefactora Linkan THN 60-10 (Alemania), con un sistema adaptado de micro manipuladores y micro inyectores. Una solución de polivinilpirrolidona (LPVP-502, 5 x 0.2 ml, Life Global, Connecticut. USA) fue utilizada para inmovilizar los espermatozoides antes de la microinyección.

### 3.3.3 Fecundación

El D1 de desarrollo pre-embrionario se valoró la fecundación. Los cigotos, ovocitos correctamente fecundados, se cambiaron a microgotas de medio de cultivo Global (LGGG, Life Global, Connecticut. USA), suplementado con 10% LG Protein Supplement (LGPS, Life Global, Connecticut. USA), cubiertas con aceite mineral Paraffin Oil P.G. (LGPO-500, Life Global Connecticut. USA), en placas Falcon 351008 (EMB. Barcelona. España) previamente equilibradas desde el día anterior.

### 3.3.4 Desarrollo pre-embionario hasta D3

Los pre-embiones fueron evaluados según número de células, porcentaje y tipo de fragmentación, simetría, presencia o no de vacuolas y multinucleación, siguiendo la clasificación de pre-embionaria de ASEBIR tanto en D2 (48 horas post FIV/ICSI) como en D3 de desarrollo pre-embionario (Tabla M&M-3).

### 3.3.5 Selección pre-embionaria para la transferencia

En D3, los pre-embiones fueron seleccionados para realizar la transferencia pre-embionaria, siguiendo la clasificación pre-embionaria de ASEBIR. En ambos grupos de estudio (No-AZPL y AZPL) fueron transferidos pre-embiones de tipo A y B. Los pre-embiones sobrantes de buena calidad, fueron congelados o vitrificados ese mismo día. Los pre-embiones no aptos para ser criopreservados en D3, fueron cultivados hasta D5-6 de desarrollo siendo criopreservados si se desarrollaban hasta el estadio de blastocisto. A los pre-embiones seleccionados para la transferencia se les realizó una captura de imagen que fue archivada en el sistema informático del láser.

Grupo de calidad ASEBIR	Células observadas en D2 de desarrollo pre-embionario in vitro	Células observadas en D3 de desarrollo pre-embionario in vitro
<b>A</b>	4	7, 8
<b>B</b>	2 o 5	7 o más
	4	9 o más
<b>C</b>	2 o 4	6
	6	8 o más
	3	6 o más
<b>D</b>	Más de 6	Cualquier valor
	Cualquier valor	Menos de 5 células
	De D2 a D3 solo aumenta una célula	

Tabla M&M-3. Clasificación morfológica de ASEBIR, 2007.

La clasificación en el D3 de desarrollo pre-embionario in vitro se interpreta en función del aspecto del D2 de desarrollo pre-embionario in vitro. Por esta razón, los pre-embiones deben ser observados y valorados en D2. Para la valoración pre-embionaria, se deben de tener en cuenta los siguientes parámetros morfológicos: número celular y ritmo de división, porcentaje y tipo de fragmentación celular, desigualdad en el tamaño de las blastómeras, visualización de núcleos y grado de multinucleación, anillo citoplasmático, presencia o no de vacuolas, aspecto de la ZP, grado de compactación y “pitting” o moteado del citoplasma.

De acuerdo a estos parámetros, los pre-embiones son clasificados de la siguiente manera (Tabla M&M-4, M&M-5).

Calidad	Fragmentación	Semejanza o tamaño celular	Multinucleación	Citoplasma	Zona pelúcida
<b>A</b>	Menos de 10% No tipo IV	Iguals o semejantes	No	No vacuolas	Normal
<b>B</b>	Entre 10-25% No tipo IV	Iguals o semejantes	No	No vacuolas	Normal

Tabla M&M-4. Asignación de calidad pre-embionaria de D2 en función de las variables consideradas.

Calidad	Fragmentación	Multinucleación	Citoplasma	Siempre que exista
<b>C</b>	Menos de 35% No tipo IV	No	No vacuolas o escasas	*Desigualdad en el tamaño celular *Vacuolas escasas *Zona pelúcida anormal
<b>D</b>	Menos del 25% No tipo IV			*Multinucleación *Vacuolas abundantes *Fragmentación >35% *Fragmentación tipo IV *Anillo citoplasmático D3

Tabla M&M-5. Asignación de calidad pre-embionaria de D2 en función de variables consideradas.

ASEBIR establece la clasificación morfológica de pre-embiones en D3 de desarrollo según el potencial de implantación y su posible correlación con la clasificación morfológica (Tabla M&M-6).

Clasificación por potencial	Tasa teórica de implantación	Destino	Clasificación ASEBIR	Descripción ASEBIR
Óptimos	> 25%	Transferir o criopreservar	<b>A</b>	Pre-embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación
			<b>B</b>	Pre-embrión de óptima calidad con óptima capacidad de implantación
Subóptimos	1-25%	*Transferir si no hay alternativa *Congelar como acompañante *Dejar en observación hasta D5-6	<b>C</b>	Pre-embrión regular con una probabilidad de implantación media
No viables	<1%	Descartar	<b>D</b>	Pre-embrión de mala calidad con probabilidad de implantación nula

Tabla M&M-6. Correlación clasificación morfológica en D3 y potencial implantacional.



### 3.3.6 Técnica de afinamiento de la zona pelúcida mediante láser (AZPL)

A cada uno de los pre-embriones a transferir, en D3 de desarrollo, se le realizó un AZP utilizando el sistema Octax láser shot (MTG-Octax Alemania), cuando el grupo que aleatoriamente le correspondía era el AZPL.

De los 528 pre-embriones del estudio, 265 correspondían al grupo control. Los pre-embriones seleccionados para AZPL (n=263) fueron trasladados al microscopio invertido Eclipse TE 300 (Nikon Instrument, NY. USA), con una óptica de Hoffman, provisto de una placa calefactora Linkan THN 60-10 (Alemania), al cual ha sido adaptado el sistema Octax laser shot (MTG-OCTAX, Alemania).

El sistema Octax Laser Shot está basado en el software de imágenes FIV y base de datos "OCTAX EyeWare™". Incluye la cámara USB 2.0 de alta calidad OCTAX, diseñada para ahorrar espacio (Fig. M&M-1).

Los componentes son:

- OCTAX Laser Shot™ módulo
- Adaptador para microscopios
- Espejo
- Lentes de laser de 25x o 40x
- OCTAX Eye™ USB2 cámara digital
- Software "OCTAX EyeWare™"



Fig. M&M-1 Sistema Octax Laser Shot. <http://www.mtg-de.com>

A cada uno de los pre-embriones, cuando les correspondía el AZPL, se les realizó un afinamiento, utilizando el objetivo de 40x, con un tiempo de exposición entre 1,5-1,9ms y 7-9 disparos consecutivos lo que coincide con un 25% aproximado del total de

la ZP, como indican las flechas en la figura M&M-2. Una vez realizada la técnica, los pre-embriones fueron devueltos al incubador.



Fig. M&M2. AZPL señalado con flechas. IVI-Murcia.

### 3.3.7 Transferencia pre-embionaria

Llegado el momento de la transferencia, los pre-embriones de D3 seleccionados para la misma, fueron cargados en el catéter (Wallace 1816N. Wallace Catheter. Smith-Medical. Brisbane. Australia) con el medio de cultivo Global (LGGG, Life Global, Connecticut. USA), suplementado con 10% LG Protein Supplement (LGPS, Life Global, Connecticut. USA). Todas las transferencias se realizaron bajo control ecográfico.

Los grupos de estudio fueron homogéneos en cuanto al índice de masa corporal (IMC) de la paciente, la edad, la calidad pre-embionaria y el número de pre-embriones transferidos/ciclo.

### 3.3.8 Análisis de las imágenes capturadas

Posteriormente, a las imágenes de los pre-embriones capturadas, se les realizaron tres medidas de la ZP, utilizando el programa informático del sistema Octax. El promedio de las medidas fue registrado en el mismo sistema informático.

El grosor de la ZP fue analizado y dividido en dos grupos según el valor obtenido. Grupo A: pre-embriones cuya medida de la ZP fuera  $\geq 15\mu\text{m}$  (Fig. M&M-3); grupo B: pre-embriones con diámetro medio de la ZP  $<15\mu\text{m}$  (Fig. M&M-4).

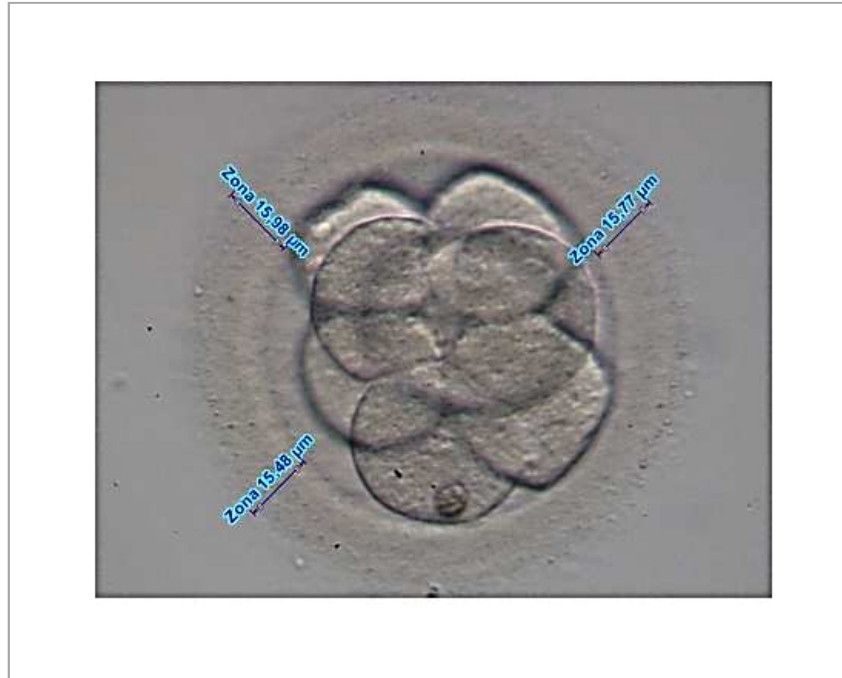


Fig. M&M-3 Medidas ZP. Promedio  $\geq 15\mu\text{m}$ . IVI-Murcia.



Fig. M&M-4 Medidas ZP  $<15\mu\text{m}$ . IVI-Murcia.

### **3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO GRUPO AZPL/NO-AZPL RESPECTO A EDADES Y GROSOR DE ZONAS PELÚCIDAS PRE-EMBRIONARIAS**

El análisis estadístico se realizó con la versión 12.0 del paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc. Chicago. IL) y MedCalc Software (Ghent. Bélgica). En todos los casos, los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando se obtuvo un valor de  $P < 0.05$ .

#### **3.4.1 Tamaño muestral y variables**

El trabajo se ha realizado con un total de 308 pacientes: 154 en el grupo control (No-AZPL) y 154 en el grupo de estudio (AZPL).

Se determinó que la potencia estadística del 86% era suficiente para detectar un 15% de diferencia, en un contraste unilateral de homogeneidad, con un nivel de significatividad del 95%.

#### **Variable principal: tasa de gestación**

Tasa de gestación: se determina mediante la medición de hCG sérica trascurridos 14 días desde la transferencia pre-embriónica. Se considerará el resultado como positivo cuando el valor haya sido superior a 25 mUI/ml. A los 10 días, a la paciente se le realiza una ecografía vaginal para valorar la presencia de saco gestacional y latido fetal cardíaco.

#### **Variables Secundarias: tasas de implantación, de aborto, de recién nacido vivo y gestación gemelar**

Tasa de implantación: Se define como el número de sacos gestacionales observados dividido por el número de pre-embiones transferidos.

Tasa de aborto: Se define como el número de abortos observados dividido por el número de gestaciones.

Tasa de RNV: Se define como el número de nacimientos por cada 100 transferencias realizadas.

Tasa de gestación gemelar: Se define como número de gestaciones clínicas con dos sacos gestacionales respecto al número total de gestaciones.

### **3.4.2 Análisis descriptivo de la correlación de los resultados de los distintos grupos según se haya realizado o no el AZPL**

Las comparaciones de los valores se calcularon mediante la prueba de Fisher teniendo en cuenta la edad de las pacientes: 38-39 años y mayor o igual a 40 años y analizando en cada grupo de edad el grosor de la ZP:  $\geq 15\mu\text{m}$  y  $< 15\mu\text{m}$ , teniendo en cuenta además el origen de los ovocitos (frescos y/o vitrificados) y la técnica de inseminación utilizada (FIV y/o ICSI).

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR APLICACIÓN O NO DE LA TÉCNICA DE ESTUDIO**

Se valoraron un total de 528 pre-embriones (265 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 263 en el grupo AZPL), correspondientes a 308 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 46 de las pacientes, que pertenecían al grupo control (n=154), se obtuvo gestación (29,9%), 3 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 58 quedaron gestantes (37,7%), obteniéndose una gestación gemelar en 9 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 52 vs 71 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 12 de ellas abortaron vs 18 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 36 RNV vs 49 en el grupo de estudio. La tabla R-1 resume los resultados globales obtenidos en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,7 pre-embriones) podemos observar que aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, sí que existe una tendencia a favor del grupo AZPL en la tasa de implantación.

<b>RESULTADOS GLOBALES</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	29,9	37,7	0,185	0,706	[0,426 - 1,164]
<b>Tasa Implantación</b>	19,6	27,1	<b>0,051</b>	0,661	[0,429 - 1,012]
<b>Tasa Aborto</b>	26,1	31,0	0,665	0,786	[0,299 - 2,011]
<b>Tasa RNV</b>	23,3	31,8	0,126	0,655	[0,382 - 1,115]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	6,5	15,5	0,219	0,383	[0,063 - 1,665]

Tabla R-1. Resultados globales de No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq$  38 años.

## **4.2 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR EDADES**

### **2.2.1 Grupo 38-39 años**

Se valoraron un total de 355 pre-embriones (192 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 163 en el grupo AZPL), correspondientes a 205 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 35 de las pacientes (32,1%) que pertenecían al grupo control (n=109), 2 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 45 quedaron gestantes (46,9%) obteniéndose una gestación gemelar en 8 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 40 vs 57 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control, 7 de ellas abortaron vs 12 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 29 RNV vs 41 en el grupo de estudio. La tabla R-2 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en el grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7 podemos observar que se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en las tasas de gestación, implantación y RNV a favor del grupo AZPL.

<b>PACIENTES CON 38-39 AÑOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	32,1	46,9	<b>0,033</b>	0,538	[0,292 - 0,983]
<b>Tasa Implantación</b>	20,8	35,0	<b>0,004</b>	0,490	[0,296 - 0,808]
<b>Tasa Aborto</b>	20,0	26,7	0,600	0,691	[0,201 - 2,216]
<b>Tasa RNV</b>	26,7	42,7	<b>0,018</b>	0,488	[0,259 - 0,910]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	5,7	17,7	0,173	0,284	[0,028 - 1,567]

Tabla R-2. Resultados por grupos de pacientes con 38 y 39 años de No-AZPL y AZPL.



### 2.2.2 Grupo $\geq 40$ años

Se valoraron un total de 173 pre-embriones (73 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 100 en el grupo AZPL), correspondientes a 103 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 11 pacientes (24,4%) que pertenecían al grupo control (n=45), 1 de las cuales tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 13 quedaron gestantes (22,4%) obteniéndose una gestación gemelar en 1 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 12 vs 14 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 5 de ellas abortaron vs 6 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 7 RNV vs 8 en el grupo de estudio. La tabla R-3 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,6 y en el grupo estudio fue de 1,7, podemos observar que no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

PACIENTES $\geq 40$ AÑOS					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	24,4	22,4	0,819	1,119	[0,400 - 3,090]
<b>Tasa Implantación</b>	16,4	14,0	0,672	1,207	[0,474 - 3,034]
<b>Tasa Aborto</b>	45,4	46,2	1,000	0,973	[0,146 - 6,395]
<b>Tasa RNV</b>	15,5	13,8	1,000	1,150	[0,324 - 3,992]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	9,1	7,7	1,000	1,191	[0,014 - 101,85]

Tabla R-3. Resultados por grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL.

### **4.3 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR EDADES Y ORIGEN DE OVOCITOS (FRESCOS, VITRIFICADOS O MIXTOS)**

#### **4.3.1 Ovocitos frescos**

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 481 pre-embriones (243 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 238 en el grupo AZPL), correspondientes a 280 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 40 pacientes (28,2%) que pertenecían al grupo control (n=142), 2 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 51 quedaron gestantes (37,0%) obteniéndose una gestación gemelar en 8 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 45 vs 63 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 10 de ellas abortaron vs 15 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 31 RNV vs 44 en el grupo de estudio. La tabla R-4 resume los resultados globales, obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,7 pre-embriones) podemos observar que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de implantación a favor del grupo AZPL.

<b>RESULTADOS GLOBALES:OVOCITOS FRESCOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	28,2	37,0	0,127	0,670	[0,392 -1,141]
<b>Tasa Implantación</b>	18,5	26,5	<b>0,038</b>	0,632	[0,399 - 0,995]
<b>Tasa Aborto</b>	25,0	29,4	0,813	0,802	[0,278 - 2,237]
<b>Tasa RNV</b>	21,8	31,9	0,060	0,598	[0,336 -1,054]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	5,0	15,7	0,176	0,286	[0,028 -1,559]

Tabla R-4. Resultados globales de grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq 38$  años. Ovocitos frescos.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 333 pre-embriones (181 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 152 en el grupo AZPL), correspondientes a 192 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 33 pacientes (32,0%) que pertenecían al grupo control, n=103), 2 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 39 quedaron gestantes (43,8%) obteniéndose una gestación gemelar en 7 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 37 vs 50 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 7 de ellas abortaron vs 10 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 27 RNV vs 36 en el grupo de estudio. La tabla R-5 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7 podemos observar que se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en las tasas de implantación y RNV a favor del grupo AZPL.

OVOCITOS FRESCOS: PACIENTES CON 38-39 AÑOS					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	32,0	43,8	0,102	0,606	[0,321 - 1,136]
<b>Tasa Implantación</b>	20,4	32,9	<b>0,012</b>	0,525	[0,309 - 0,885]
<b>Tasa Aborto</b>	21,2	25,6	0,783	0,783	[0,219 - 2,672]
<b>Tasa RNV</b>	26,2	40,4	<b>0,045</b>	0,525	[0,271 - 1,006]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	6,1	17,9	0,166	0,300	[0,028 - 1,740]

Tabla R-5. Resultados de grupos de pacientes 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. Ovocitos frescos.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 148 pre-embriones (62 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 86 en el grupo AZPL), correspondientes a 88 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 7 pacientes (18,0%) que pertenecían al grupo control (n=39), ninguna tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 12 quedaron gestantes (24,5%) resultando en gestación gemelar en 1 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 8 vs 13 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 3 de ellas abortaron vs 5 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 4 RNV vs 8 en el grupo de estudio. La tabla R-6 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,6 y en el grupo estudio fue de 1,7 podemos observar que se no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

<b>OVOCITOS FRESCOS: PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	18,0	24,5	0,603	0,677	[0,200 - 2,136]
<b>Tasa Implantación</b>	12,9	15,1	0,813	0,833	[0,278 - 2,348]
<b>Tasa Aborto</b>	42,9	41,7	1,000	1,047	[0,103 - 9,806]
<b>Tasa RNV</b>	10,3	16,3	0,537	0,589	[0,119 - 2,429]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	8,3	1,000	0	[0 - 6,788]

Tabla R-6. Resultados de grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL. Ovocitos frescos.

### 4.3.2 Ovocitos vitrificados

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 28 pre-embriones (14 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 14 en el grupo AZPL), correspondientes a 19 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 5 pacientes (62,5%) que pertenecían al grupo control (n=8), ninguna tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 6 quedaron gestantes (54,5%) no obteniéndose tampoco gestación gemelar en ninguna de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 5 vs 6 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs 3 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 3 RNV vs 3 en el grupo de estudio AZPL. La tabla R-7 resume los resultados globales, obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue 1,7 en el grupo control y 1,3 en el grupo AZPL podemos observar que se no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

RESULTADOS GLOBALES: OVOCITOS VITRIFICADOS					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	62,5	54,5	1,000	1,365	[0,156 - 13,587]
<b>Tasa Implantación</b>	35,7	42,9	1,000	0,749	[0,124 - 4,334]
<b>Tasa Aborto</b>	40,0	50,0	1,000	0,692	[0,032 -12,149]
<b>Tasa RNV</b>	37,5	27,2	1,000	1,560	[0,146 - 17,019]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0			

Tabla R-7. Resultados globales de grupos de pacientes No-AZPL y AZPL mujeres  $\geq 38$  años. Ovocitos vitrificados.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 11 pre-embriones (3 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 8 en el grupo AZPL), correspondientes a 8 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en una paciente (50%) que pertenecía al grupo control (n=2), y no tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 5 se quedaron gestantes (83,3%) sin obtenerse gestación gemelar en ninguna de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 1 vs 5 en el grupo de estudio (AZPL). La paciente que gestó no abortó en el grupo control vs 2 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 1 RNV vs 3 en el grupo de estudio. La tabla R-8 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,5 y en el grupo estudio fue de 1,3 podemos observar que se no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

<b>OVOCITOS VITRIFICADOS: PACIENTES CON 38-39 AÑOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	50,0	83,3	0,464	0,258	[0,002 -31,283]
<b>Tasa Implantación</b>	33,3	62,5	0,545	0,336	[0,004 - 9,199]
<b>Tasa Aborto</b>	0	40,0	1,000	0,000	[0,000 - 77.906]
<b>Tasa RNV</b>	50,0	50,0	1,000	1,000	[0,010 -104,262]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0			

Tabla R-8. Resultados de grupos de pacientes 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. Ovocitos vitrificados.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 17 pre-embriones (11 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 6 en el grupo AZPL), correspondientes a 11 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 4 pacientes (66,7%) que pertenecían al grupo control (n=6), ninguna tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que una paciente quedó gestante (20,0%) sin resultar en gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 4 vs 1 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs la única del grupo AZPL. En el grupo control hubo 2 RNV vs ninguno en el grupo de estudio. La tabla R-9 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,2 podemos observar que se no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

<b>OVOCITOS VITRIFICADOS: PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	66,7	20,0	0,242	6,439	[0,325 - 487,967]
<b>Tasa Implantación</b>	36,4	16,7	0,600	2,697	[0,181 - 168,197]
<b>Tasa Aborto</b>	50,0	100,0	1,000	0	[0 - 58,447]
<b>Tasa RNV</b>	33,3	0	0,455	NA	NA
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0			

Tabla R-9. Resultados de grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL. Ovocitos vitrificados.

### 4.3.3 Ovocitos mixtos

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 19 pre-embriones (8 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 11 en el grupo AZPL), correspondientes a 9 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en una paciente (25,0%) que pertenecía al grupo control, (n=4), la cual fue gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que también una paciente quedó gestante (20,0%) resultando en gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 2 vs 2 en el grupo de estudio (AZPL). La paciente gestante del grupo control no abortó y en grupo AZPL tampoco abortó la única paciente gestante. En el grupo control hubo 2 RNV vs 2 en el grupo de estudio. La tabla R-10 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (2,0 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

RESULTADOS GLOBALES: OVOCITOS MIXTOS					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	25,0	20,0	1,000	1,291	[0,013 - 130,32]
<b>Tasa Implantación</b>	25,0	18,2	1,000	1,468	[0,084 - 25,70]
<b>Tasa Aborto</b>	0	0			
<b>Tasa RNV</b>	50,0	40,0	1,000	1,433	[0,055 - 39,79]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	100,0	100,0	1,000	0,000	NA

Tabla R-10. Resultados globales de grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq 38$  años. Ovocitos mixtos.



## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 11 pre-embriones (8 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 3 en el grupo AZPL), correspondientes a 5 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en una paciente (25,0%) que pertenecía al grupo control (n=4), siendo esta gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que una paciente se quedó gestante (100,0%) resultando también en gestación gemelar. El número de sacos obtenidos fue de 2 en ambos grupos. No se obtuvieron abortos en ninguno de los dos grupos. En ambos grupos se observaron 2 RNV. La tabla R-11 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 2,0 y en el grupo estudio fue de 1,5 podemos observar que se no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

<b>OVOCITOS MIXTOS: PACIENTES CON 38-39 AÑOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	25,0	100,0	0,400	0,000	[0 - 26]
<b>Tasa Implantación</b>	25,	66,6	0,203	0,166	[0,002 - 5,801]
<b>Tasa Aborto</b>	0	0			
<b>Tasa RNV</b>	50,0	200,0	0,467	1,000	[0 - 58,447]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	100,0	100,0	1,000	0,000	NA

Tabla R-11. Resultados globales de grupos de pacientes con 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. Ovocitos mixtos.

C) Grupo  $\geq$  40 años:

Se valoraron un total de 8 pre-embriones que pertenecían al grupo de estudio. No hubo pacientes en el grupo control. En las 4 pacientes que pertenecían al grupo estudio, no se obtuvo gestación (0 %). La media de pre-embriones transferidos fue el mismo en ambos grupos (2,0),

#### **4.4 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADOS POR EDADES Y TÉCNICA DE INSEMINACIÓN (FIV, FIV/ICSI O ICSI)**

##### **4.4.1 FIV**

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 48 pre-embriones (27 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 21 en el grupo AZPL), correspondientes a 30 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI donde los embriones transferidos provenían solamente de FIV. En 4 pacientes que pertenecían al grupo control (n=17) se obtuvo gestación (23,5%), ninguna tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 5 quedaron gestantes (38,5%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 4 vs 6 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs ninguna del grupo AZPL. En el grupo control hubo 2 RNV vs 6 en el grupo de estudio. La tabla R-12 resume los resultados globales, obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,6 pre-embriones) podemos observar que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de RNV a favor del grupo AZPL.

<b>RESULTADOS GLOBALES: FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	23,5	38,5	0,443	0,504	[0,075 - 3,148]
<b>Tasa Implantación</b>	14,8	28,6	0,297	0,443	[0,078 - 2,232]
<b>Tasa Aborto</b>	50	0	1,000	0	NA
<b>Tasa RNV</b>	11,7	46,2	<b>0,049</b>	0,167	[0,013 -1,234]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0			

Tabla R-12. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq 38$  años. FIV.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 33 pre-embriones (22 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 11 en el grupo AZPL), correspondientes a 21 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos provenían solamente de FIV. En 5 pacientes que pertenecían al grupo control (n=14) se obtuvo gestación (35,7%), y ninguna de ellas fue gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 4 pacientes quedaron gestantes (57,1%) obteniéndose gestación gemelar en una de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 4 vs 5 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs ninguna en el grupo AZPL. En el grupo control hubo 2 RNV vs 5 en el grupo de estudio. La tabla R-13 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,6 pre-embriones) podemos observar que se no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos.

<b>FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV: PACIENTES CON 38-39 AÑOS)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	35,7	57,1	0,397	0,435	[0,044 - 3,773]
<b>Tasa Implantación</b>	18,2	45,5	0,121	0,279	[0,040 - 1,767]
<b>Tasa Aborto</b>	40,0	0	1,000	0	NA
<b>Tasa RNV</b>	40,0	71,4	0,058	0,301	[0,013 - 4,923]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	25,0	0,444	0	[0 - 31,200]

Tabla R-13. Resultados globales por grupos de pacientes 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. FIV.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 15 pre-embriones (5 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 10 en el grupo AZPL), correspondientes a 9 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos provenían solamente de FIV. En ninguna de las pacientes que pertenecían al grupo control (n=3) se obtuvo gestación (0%), frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que 1 quedó gestante (16,6%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo estudio fue de 1 (AZPL). En la paciente gestante del grupo AZPL no hubo aborto, obteniéndose 1 RNV. La tabla R-14 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,7 pre-embriones) podemos observar que no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, en ninguno de los grupos.

<b>FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV): PACIENTES CON 38-39 AÑOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	0	16,7	1,000	0	NA
<b>Tasa Implantación</b>	0	10,0	1,000	0	NA
<b>Tasa Aborto</b>	0	0			
<b>Tasa RNV</b>	0	16,7	1,000	0	NA
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0			

Tabla R-14. Resultados globales por grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL. FIV.

#### 4.4.2 ICSI

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 470 pre-embriones (230 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 240 en el grupo AZPL), correspondientes a 273 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos provenían solamente de ICSI. En 42 de las pacientes que pertenecían al grupo control (n=133) se obtuvo gestación (31,6%), 3 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 53 quedaron gestantes (37,9%) obteniéndose gestación gemelar en 8 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 48 vs 65 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 10 de ellas abortaron vs 18 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 34 RNV vs 43 en el grupo de estudio. La tabla R-15 resume los resultados globales, obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,7 pre-embriones) podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

RESULTADOS GLOBALES: ICSI					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	31,6	37,9	0,310	0,758	[0,445 - 1,288]
<b>Tasa Implantación</b>	21,0	27,1	0,131	0,711	[0,452 - 1,112]
<b>Tasa Aborto</b>	23,8	34,0	0,366	0,611	[0,217 - 1,642]
<b>Tasa RNV</b>	25,6	31,0	0,351	0,775	[0,440 - 1,360]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	7,1	15,0	0,336	0,436	[0,070 -1,980]

Tabla R-15. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq 38$  años. ICSI

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 316 pre-embriones (164 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 152 en el grupo AZPL), correspondientes a 181 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos provenían solamente de ICSI. En 31 de las pacientes que pertenecían al grupo control (n=92) se obtuvo gestación (33,7%), 2 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 41 quedaron gestantes (46,0%) obteniéndose gestación gemelar en 7 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 36 vs 52 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 5 de ellas abortaron vs 12 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 27 RNV vs 36 en el grupo de estudio. La tabla R-16 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7 podemos observar que se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en las tasas de implantación, a favor del grupo AZPL.

<b>ICSI PACIENTES CON 38-39 AÑOS</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	33,7	46,0	0,097	0,597	[0,312 - 1,132]
<b>Tasa Implantación</b>	22,0	34,2	<b>0,017</b>	0,542	[0,318 - 0,917]
<b>Tasa Aborto</b>	16,1	29,3	0,265	0,470	[0,114 - 1,677]
<b>Tasa RNV</b>	29,3	40,4	0,122	0,613	[0,314 - 1,185]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	6,5	17,0	0,283	0,340	[0,032 - 1,974]

Tabla R-16. Resultados por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL. 38 y 39 años ICSI.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 154 pre-embriones (66 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 88 en el grupo AZPL), correspondientes a 92 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos provenían solamente de la ICSI. En 11 pacientes que pertenecían al grupo control (n=41) se obtuvo gestación (26,8%), una de la cuales tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 12 se quedaron gestantes (23,5%) con una gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 12 vs 13 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 5 de ellas abortaron vs 6 del grupo AZPL. En ambos grupos hubo 7 RNV. La tabla R-17 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,6 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

ICSI: PACIENTES $\geq 40$ AÑOS					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	26,8	23,5	0,810	1,189	[0,412 - 3,411]
<b>Tasa Implantación</b>	18,2	14,8	0,660	1,280	[0,492 - 3,310]
<b>Tasa Aborto</b>	45,5	50,0	1,000	0,840	[0,121 - 5,675]
<b>Tasa RNV</b>	17,0	13,7	0,773	1,290	[0,349 - 4,775]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	9,1	8,3	1,000	1,095	[0,013 - 94,023]

Tabla R-17. Resultados por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL con 40 y más años. ICSI.

#### 4.4.3 FIV-ICSI

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 10 pre-embriones (8 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 2 en el grupo AZPL), correspondientes a 5 pacientes, 4 del grupo control y 1 del grupo estudio, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos, provenían de cada técnica de inseminación. No se obtuvo ges-

tación en ninguno de los 2 grupos. La media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (2,0 pre-embriones).

B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 6 pre-embriones transferidos en el grupo control, correspondientes a 3 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos, provenían de cada técnica de inseminación. No hubo paciente en el grupo AZPL. No se obtuvo ninguna gestación en pacientes que pertenecían al grupo control. La media de pre-embriones transferidos fue de 2,0 pre-embriones.

C) Grupo  $\geq$  40 años:

Se valoraron un total de 4 pre-embriones transferidos en el grupo control, (2 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 2 en el grupo AZPL) correspondientes a dos pacientes, 1 del grupo control y 1 del grupo estudio que se sometió a un ciclo de FIV/ICSI, donde los pre-embriones transferidos, provenían de cada técnica de inseminación. No se obtuvo ninguna gestación en la paciente que pertenecía al grupo control frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que tampoco hubo gestación. La media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (2,0 pre-embriones).

#### **4.5 RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES DE 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON EL ORIGEN DE LOS OVOCITOS**

	No-AZPL Frescos	AZPL Frescos	No-AZPL Vitriificados	AZPL Vitriificados	No-AZPL Mixtos	AZPL Mixtos
<b>T. Gestación</b>	32,0	43,8	50,0	83,3	25,0	100
<b>T. Implantación</b>	20,4	<b>32,9*</b>	33,3	62,5	25,0	66,6
<b>T. Aborto</b>	21,2	25,6	40,0	0	40,0	0
<b>T. RNV</b>	26,2	<b>40,4*</b>	37,5	50,0	50,0	200
<b>T. Gestación Gemelar</b>	6,0	17,9	0	0	100	100

\*p<0,005

Tabla R-18. Resultados por grupos de pacientes 38-39 años No-AZPL y AZPL, relacionados con el origen de los ovocitos.



**4.6 RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON TRATAMIENTO DE FECUNDACIÓN “IN VITRO” UTILIZADO**

	No-AZPL FIV	AZPL FIV	No-AZPL ICSI	AZPL ICSI	No-AZPL FIV-ICSI	AZPL FIV-ICSI
<b>T. Gestación</b>	28,5	57,1	33,7	46,0	0	0
<b>T. Implantación</b>	18,2	45,5	22,0	<b>34,2*</b>	0	0
<b>T. Aborto</b>	50	0	16,1	29,3	0	0
<b>T.RNV</b>	14,2	71,4	29,3	40,4	0	0
<b>T. Gestación Gemelar</b>	0	25,0	6,5	17,0	0	0

\*p<0,005

Tabla R-19. Resultados por grupos de pacientes con 38-39 años o más No-AZPL y AZPL, relacionados con el tratamiento de fecundación “in vitro” utilizado.

#### **4.7 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR GROSOR DE ZONAS PELÚCIDAS Y EDADES**

##### **4.7.1 ZP $\geq$ 15 $\mu$ m**

A) Grupo global ( $\geq$  38 años):

Se valoraron un total de 339 pre-embriones (177 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 162 en el grupo AZPL), correspondientes a 199 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 33 pacientes (32,7%), que pertenecían al grupo control (n=101), 3 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 39 quedaron gestantes (39,8%) resultando en gestación gemelar en 8 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 39 vs 48 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 9 de ellas abortaron vs 11 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 27 RNV vs 35 en el grupo de estudio. La tabla R-20 resume los resultados globales, obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,7 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>RESULTADOS GLOBALES (ZP <math>\geq</math> 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	32,7	39,8	0,306	0,735	[0,394 - 1,366]
<b>Tasa Implantación</b>	22,0	29,6	0,135	0,672	[0,399 - 1,128]
<b>Tasa Aborto</b>	27,3	28,2	1,000	0,955	[0,295 - 3,035]
<b>Tasa RNV</b>	26,7	35,7	0,221	0,658	[0,342 - 1,254]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	9,1	20,5	0,208	0,392	[0,061 - 1,836]

Tabla R-20. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq$  38 años. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 233 pre-embriones (135 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 98 en el grupo AZPL), correspondientes a 135 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 23 pacientes (30,2%) que pertenecían al grupo control (n=76), 3 de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 30 quedaron gestantes (50,8%) resultando en gestación gemelar en 6 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 29 vs 38 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 5 de ellas abortaron vs 6 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 20 RNV vs 30 en el grupo de estudio. La tabla R-21 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7 podemos observar que se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en las tasas de gestación, implantación y RNV a favor del grupo AZPL.

<b>PACIENTES CON 38-39 AÑOS (ZP ≥ 15µm)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	30,2	50,8	<b>0,021</b>	0,422	[0,195 - 0,902]
<b>Tasa Implantación</b>	21,5	38,8	<b>0,005</b>	0,434	[0,232 - 0,801]
<b>Tasa Aborto</b>	21,7	20,0	1,000	1,109	[0,228 - 5,163]
<b>Tasa RNV</b>	26,3	50,8	<b>0,004</b>	0,348	[0,157 - 0,755]
<b>Gestación Gemelar</b>	13,0	20,0	0,715	0,606	[0,087 - 3,284]

Tabla R-21. Resultados por grupos de pacientes con 38 y 39 años de No-AZPL y AZPL. ZP ≥ 15µm.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 106 pre-embriones (42 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 64 en el grupo AZPL), correspondientes a 64 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 10 pacientes que pertenecían al grupo control (n=25) se obtuvo gestación (40,0%), ninguna tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 9 se quedaron gestantes (23,1%) con una gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 10 en los dos grupos (estudio y AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 4 de ellas abortaron vs 5 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 7 RNV vs 5 en el grupo de estudio. La tabla R-22 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,7 y en el grupo estudio fue de 1,6, podemos observar que no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en las tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares.

<b>PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS (ZP <math>\geq 15\mu\text{m}</math>)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	40,0	23,1	0,171	2,193	[0,646 - 7,630]
<b>Tasa Implantación</b>	23,8	15,6	0,319	1,679	[0,560 - 5,052]
<b>Tasa Aborto</b>	40,0	55,5	0,455	0	[0- 32,50]
<b>Tasa RNV</b>	28,0	12,8	0,336	2,602	[0,611 -12,024]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	11,1	0,715	0	NA

Tabla R-22. Resultados por grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL. ZP  $\geq 15\mu\text{m}$ .

#### 4.7.2 ZP < 15µm

A) Grupo global (≥ 38 años):

Se valoraron un total de 189 pre-embriones (88 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 101 en el grupo AZPL), correspondientes a 109 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 13 pacientes (24,5%) que pertenecían al grupo control (n=53), ninguna de las cuales tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 19 quedaron gestantes (33,9%) resultando en gestación gemelar en 1 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 13 vs 23 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 3 de ellas abortaron vs 7 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 9 RNV vs 14 en el grupo de estudio. La tabla R- 23 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,7 y en el grupo estudio fue de 1,8 podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

RESULTADOS GLOBALES (ZP < 15µm)					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	24,5	33,9	0,301	0,636	[0,250 - 1,576]
<b>Tasa Implantación</b>	14,8	22,8	0,195	0,589	[0,254 - 1,317]
<b>Tasa Aborto</b>	23,1	36,8	0,467	0,525	[0,069 - 3,114]
<b>Tasa RNV</b>	17,0	25,0	0,353	0,616	[0,211 - 1,72]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	5,2	1,000	0	[0 - 56,95]

Tabla R- 23. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres ≥ 38 años. ZP < 15µm.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 122 pre-embriones (57 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 65 en el grupo AZPL), correspondientes a 70 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 12 pacientes (36,4%) que pertenecían al grupo control (n=33), no se obtuvieron gestaciones gemelares frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 15 quedaron gestantes (40,5%) resultando en gestación gemelar en 1 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 12 vs 19 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs 6 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 9 RNV vs 11 en el grupo de estudio. La tabla R-24 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,7 y en el grupo estudio fue de 1,8 podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>PACIENTES CON 38-39 AÑOS (ZP &lt; 15µm)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	36,4	40,5	0,808	0,840	[0,285 - 2,447]
<b>Tasa Implantación</b>	21,0	29,2	0,405	0,648	[0,255 - 1,596]
<b>Tasa Aborto</b>	16,7	40,0	0,236	0,314	[0,025 - 2,370]
<b>Tasa RNV</b>	27,3	29,7	1,000	0,888	[0,272 - 2,837]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	6,7	1,000	0	[0 - 48,714]

Tabla R- 24. Resultados por grupos de pacientes con 38 y 39 años de No-AZPL y AZPL. ZP < 15µm.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 67 pre-embriones (31 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 36 en el grupo AZPL), correspondientes a 39 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En una paciente que pertenecía al grupo control, con edades  $\geq 40$  años (n=20) se obtuvo gestación (5,0%), y no fue gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 4 pacientes quedaron gestantes (21,0%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 1 en el grupo estudio y 4 en el grupo AZPL. La paciente gestante del grupo control abortó vs 1 del grupo AZPL. En el grupo control no hubo RNV vs 3 en el grupo de estudio. La tabla R-25 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,6 y en el grupo estudio fue de 1,9 podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS (ZP &lt; 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	5,0	21,0	0,182	0,205	[0,004 - 2.361]
<b>Tasa Implantación</b>	3,2	11,1	0,363	0,271	[0,005 - 2.947]
<b>Tasa Aborto</b>	100,0	25,0	1,000	0	NA
<b>Tasa RNV</b>	0	15,7	0,106	0	[0 - 2,218]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R-25. Resultados por grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL. ZP < 15 $\mu$ m.

#### **4.8 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR GROSOR DE LAS ZONAS PELÚCIDAS Y ORIGEN DE OVOCITOS (FRESCOS, VITRIFICADOS O MIXTOS)**

##### **4.8.1 Ovocitos frescos. ZP $\geq$ 15 $\mu$ m**

A) Grupo global ( $\geq$  38 años):

Se valoraron un total de 303 pre-embriones (161 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 142 en el grupo AZPL), correspondientes a 178 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 28 pacientes (30,4%) que pertenecían al grupo control, con edades mayores de 37 años (n=92) de las cuales 2 tuvieron gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 35 quedaron gestantes (40,7%) resultando en gestación gemelar en 7 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 33 vs 43 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 8 de ellas abortaron vs 10 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 22 RNV vs 31 en el grupo de estudio. La tabla R- 26 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7 podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos en cuanto a las tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares.

<b>RESULTADOS GLOBALES (ZP <math>\geq</math> 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	30,4	40,7	0,162	0,639	[0,327 - 1,238]
<b>Tasa Implantación</b>	20,5	30,3	0,063	0,595	[0,339 - 1,036]
<b>Tasa Aborto</b>	28,6	28,6	1,000	1,000	[0,284 - 3,434]
<b>Tasa RNV</b>	23,9	36,0	0,101	0,559	[0,275 - 1,122]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	7,1	20,0	0,277	0,313	[0,029 -1,848]

Tabla R-26. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq$  38 años. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.



## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 213 pre-embriones (124 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 89 en el grupo AZPL), correspondientes a 124 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 21 pacientes (30,0%) que pertenecían al grupo control (n=70), resultando en gestación gemelar en 2 de ellas frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 26 quedaron gestantes (48,2%) resultando en gestación gemelar en 6 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 25 vs 33 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 5 de ellas abortaron vs 5 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 18 RNV vs 26 en el grupo de estudio. La tabla R-27 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7, podemos observar que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las tasas de gestación, implantación y RNV a favor del grupo AZPL.

<b>PACIENTES CON 38-39 AÑOS (ZP <math>\geq</math> 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	30,0	48,2	<b>0,043</b>	0,465	[0,206 – 1,031]
<b>Tasa Implantación</b>	20,2	37,1	<b>0,008</b>	0,430	[0,221 – 0,829]
<b>Tasa Aborto</b>	23,8	19,2	0,734	1,305	[0,252 – 6,770]
<b>Tasa RNV</b>	25,8	48,2	<b>0,014</b>	0,376	[0,163 – 0,848]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	9,5	23,1	0,269	0,358	[0,032 – 2,333]

Tabla R-27. Resultados por grupos de pacientes con 38 y 39 años de No-AZPL y AZPL. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 90 pre-embriones (37 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 53 en el grupo AZPL), correspondientes a 54 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 7 pacientes (31,8%) que pertenecían al grupo control (n=22), ninguna tuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 9 se quedaron gestantes (28,1%) con una gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 8 vs 10 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 3 de ellas abortaron vs 5 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 4 RNV vs 5 en el grupo de estudio. La tabla R-28 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,7 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS (ZP <math>\geq 15\mu\text{m}</math>)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	31,8	28,1	0,772	1,189	[0,304 -4,523]
<b>Tasa Implantación</b>	21,6	18,9	0,793	1,184	[0,359 -3,796]
<b>Tasa Aborto</b>	42,9	55,6	1,000	0,620	[0,053 - 6,419]
<b>Tasa RNV</b>	18,2	15,6	1,000	1,196	[0,208 - 6,425]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	11,1	1,000	0	[0- 87,631]

Tabla R-28. Resultados por grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL. ZP  $\geq 15\mu\text{m}$ .

#### 4.8.2 Ovocitos frescos. ZP < 15µm

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 178 pre-embriones (82 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 96 en el grupo AZPL), correspondientes a 102 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 12 pacientes (24,0%) que pertenecían al grupo control (n=50), de las cuales ninguna obtuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 16 quedaron gestantes (30,8%) resultando en gestación gemelar en 1 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 12 vs 20 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs 5 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 9 RNV vs 13 en el grupo de estudio. La tabla R- 29 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,6 y en el grupo estudio fue de 1,8 podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos en cuanto a las tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares.

RESULTADOS GLOBALES (ZP < 15µm)					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	24,0	30,8	0,509	0,713	[0,267 - 1,861]
<b>Tasa Implantación</b>	14,6	21,0	0,330	0,653	[0,270 - 1,522]
<b>Tasa Aborto</b>	16,7	31,2	0,662	0,453	[0,035 -3,589]
<b>Tasa RNV</b>	18,0	25,0	0,473	0,661	[0,222 - 1,892]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	6,3	1,000	0	[0 - 51,959]

Tabla R-29. Resultados por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq 38$  años. Ovocitos frescos. ZP < 15µm.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 120 pre-embriones (57 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 63 en el grupo AZPL), correspondientes a 68 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 12 pacientes (36,4%) que pertenecían al grupo control (n=33), no resultando gestación gemelar en ninguna de ellas frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 13 quedaron gestantes (37,1%) resultando en gestación gemelar en 1 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 12 vs 17 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs 5 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 9 RNV vs 10 en el grupo de estudio. La tabla R-30 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7, podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>PACIENTES CON 38-39 AÑOS (ZP &lt; 15µm)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	36,4	37,1	1,000	0,967	[0,321- 2,902]
<b>Tasa Implantación</b>	21,0	27,0	0,524	0,724	[0,281 - 1,818]
<b>Tasa Aborto</b>	16,7	38,5	0,378	0,335	[0,025 - 2,754]
<b>Tasa RNV</b>	27,3	28,6	1,000	0,938	[0,282 - 3,086]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	7,7	1,000	0	[0 - 42,251]

Tabla R- 30. Resultados por grupos de pacientes con 38 y 39 años de No-AZPL y AZPL. Ovocitos frescos. ZP < 15µm.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 57 pre-embriones (25 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 32 en el grupo AZPL), correspondientes a 34 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En ninguna paciente que pertenecía al grupo control (n=17) se obtuvo gestación (0%), frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 3 quedaron gestantes (17,6%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo estudio (AZPL) fue de 3. De las pacientes gestantes del grupo estudio, ninguna abortó. En el grupo estudio hubo 3 RNV. La tabla R-31 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7.

<b>PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS (ZP &lt; 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	0	17,6	0,227	0	[0 - 2,329]
<b>Tasa Implantación</b>	0	9,1	0,248	0	[0 - 3,058]
<b>Tasa Aborto</b>	0	0	1,000	0	NA
<b>Tasa RNV</b>	0	17,6	1,000	0	NA
<b>Tasa Gestación Gemelar</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R- 31. Resultados por grupos de pacientes con 40 y más años de No-AZPL y AZPL. Ovocitos frescos. ZP < 15 $\mu$ m.

### 4.8.3 Ovocitos vitrificados. ZP $\geq 15\mu\text{m}$

A) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 18 pre-embriones (8 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 10 en el grupo AZPL), correspondientes a 13 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 4 pacientes (80,0%) que pertenecían al grupo control (n=5), de las cuales en ninguna se obtuvo gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 3 quedaron gestantes (37,5%) sin gestación gemelar en ninguna de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 4 vs 3 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control, 1 de ellas abortó vs 1 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 3 RNV vs 2 en el grupo de estudio. La tabla R- 32 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,6 y en el grupo estudio fue de 1,3 podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

RESULTADOS GLOBALES (ZP $\geq 15\mu\text{m}$ )					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	80,0	37,5	0,266	5,700	[0,337 - 391,23]
<b>Tasa Implantación</b>	50,0	30,0	0,630	2,222	[0,234 - 24,495]
<b>Tasa Aborto</b>	25,0	33,3	1,000	0,707	[0,006 - 78,184]
<b>Tasa RNV</b>	60,0	25,0	0,293	3,951	[0,251 - 87,432]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R-32. Resultados globales de grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq 38$  años. Ovocitos vitrificados. ZP  $\geq 15\mu\text{m}$ .

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 9 pre-embriones (3 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 6 en el grupo AZPL), correspondientes a 6 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 1 paciente (50%) que pertenecía al grupo control (n=2), no resultando gestación gemelar en esta paciente frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 3 quedaron gestantes (75,0%) sin gestación gemelar en ninguna de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 1 vs 3 en el grupo de estudio (AZPL). De la paciente gestante del grupo control no abortó vs 1 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 1 RNV vs 2 en el grupo de estudio. La tabla R-33 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos fue la misma en ambos grupos (1,5 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>OVOCITOS VITRIFICADOS: PACIENTES CON 38-39 AÑOS (ZP <math>\geq</math> 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	50,0	75,0	1,000	0,408	[0,003 -52,093]
<b>Tasa Implantación</b>	33,3	50	1,000	0,540	[0,006 -16,499]
<b>Tasa Aborto</b>	0	33,3	1,000	0,000	[0,000 -39,001]
<b>Tasa RNV</b>	50,0	50,0	1,000	1,000	[0,009 -117,17]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R-33. Resultados de grupos de pacientes No-AZPL y AZPL con 38-39 años. Ovocitos vitrificados. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.

C) Grupo  $\geq$  40 años:

Se valoraron un total de 9 pre-embriones (5 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 4 en el grupo AZPL), correspondientes a 7 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en todas las pacientes que pertenecían al grupo control (n=3), sin que ninguna fuera gemelar, frente al grupo que pertenecía a AZPL en que no hubo gestación (0%). El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 3. De las pacientes gestantes del grupo estudio, una abortó. En el

grupo estudio hubo 2 RNV. La media de pre-embryones transferidos en grupo control fue 1,7 y en el grupo estudio fue de 1,0

#### 4.8.4 Ovocitos vitrificados. ZP < 15µm

A) Grupo global (≥ 38 años):

Se valoraron un total de 10 pre-embryones (6 pre-embryones transferidos en el grupo control vs 4 en el grupo AZPL), correspondientes a 6 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 1 paciente que pertenecía al grupo control (n=3) se obtuvo gestación (33,3%), no resultando gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 3 quedaron gestantes (100,0%) sin gestación gemelar en ninguna de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 1 vs 3 en el grupo de estudio (AZPL). La paciente gestante del grupo control abortó vs 2 del grupo AZPL. En el grupo control no hubo RNV vs 1 en el grupo de estudio. La tabla R-34 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embryones transferidos en grupo control fue 2,0 y en el grupo estudio fue de 1,3, podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

OVOCITOS VITRIFICADOS: RESULTADOS GLOBALES (ZP < 15µm)					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	33,3	100,0	0,4	0	[0- 4,923]
<b>Tasa Implantación</b>	16,7	75,0	0,190	0,097	[0,001 - 2,490]
<b>Tasa Aborto</b>	100,0	66,7	1,000	NA	NA
<b>Tasa RNV</b>	0	33,3	1,000	0	[0 - 116,78]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R-34. Resultados globales de grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres ≥ 38 años. Ovocitos vitrificados. ZP < 15µm.



## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 2 pre-embriones (2 pre-embriones transferidos en el grupo AZPL), correspondientes a 2 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. No se obtuvieron pacientes en el grupo control. Se obtuvo gestación en todas las pacientes que pertenecían al grupo estudio (n=2), no resultando gestación gemelar en ninguna de las pacientes. El número de sacos obtenidos en el grupo estudio fue de 2. De las pacientes gestantes del grupo estudio, una abortó. En el grupo estudio hubo 1 RNV.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 8 pre-embriones (6 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 2 en el grupo AZPL), correspondientes a 4 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 1 paciente que pertenecía al grupo control (n=3) se obtuvo gestación (33,3%), frente al grupo que pertenecía a AZPL en que hubo 1 gestación (100,0%), sin gestación gemelar en ambos grupos. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 1 vs 1 en el grupo de estudio (AZPL). La paciente gestante del grupo control y la del grupo AZPL abortaron. En ninguno de los grupos hubo RNV. La tabla R-35 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue la misma en ambos grupos (2,0 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos en cuanto a las tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares.

<b>OVOCITOS VITRIFICADOS: PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS (ZP &lt; 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	33,0	100,0	1,000	0	[0 -39,001]
<b>Tasa Implantación</b>	16,7	50,0	0,464	0,258	[0,002 -31,283]
<b>Tasa Aborto</b>	100,0	100,0	1,000	0	NA
<b>Tasa RNV</b>	0	0	1,000	0,	NA
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R-35. Resultados por grupos de pacientes con 40 y más años No-AZPL y AZPL. Ovocitos vitrificados. ZP < 15 $\mu$ m.

#### 4.8.5 Ovocitos mixtos. ZP $\geq$ 15 $\mu$ m

A) Grupo global ( $\geq$  38 años):

Se valoraron un total de 18 pre-embriones (8 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 10 en el grupo AZPL), correspondientes a 9 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 1 paciente que pertenecía al grupo control (n=4) se obtuvo gestación (25,0%), resultando gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 1 quedó gestante (20,0%) con gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 2 vs 2 en el grupo de estudio (AZPL). No se presentaron abortos en ninguno de los dos grupos. En ambos grupos hubo 2 RNV. La tabla R-36 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control la misma en ambos grupos (2,0 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

OVOCITOS MIXTOS: RESULTADOS GLOBALES (ZP $\geq$ 15 $\mu$ m)					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	25,0	20,0	1,000	1,290	[0,013 -130,326]
<b>Tasa Implantación</b>	25,0	20,0	1,000	1,312	[0,074 - 23,228]
<b>Tasa Aborto</b>	0	0	1,000	0	NA
<b>Tasa RNV</b>	50,0	40,0	1,000	1,433	[0,055 – 39,792]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	100,0	100,0	1,000	0	NA

Tabla R-36. Resultados globales de grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq$  38 años. Ovocitos mixtos. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.

B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 10 pre-embriones (8 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 2 en el grupo AZPL), correspondientes a 5 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 1 paciente que pertenecía al grupo control (n=4) se obtuvo gestación (25,0%), resultando gestación gemelar en esta paciente frente al grupo que pertenecía a AZPL en que la única paciente quedó gestante (100,0%) con gestación gemelar. El número de sacos obtenidos fue 2 en ambos grupos. No se presenta-

ron abortos en ninguno de los dos grupos. En el grupo control hubo 1 RNV vs 1 en el grupo de estudio. La tabla R-37 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriónes transferidos fue la misma en ambos grupos (2,0 pre-embriónes), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>OVOCITOS MIXTOS: PACIENTES CON 38-39 AÑOS: ZP <math>\geq</math> 15<math>\mu</math>m</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	25,0	100,0	0,4000	0	[0 - 26,000]
<b>Tasa Implantación</b>	25,0	100,0	0,133	0	[0 - 3.2300]
<b>Tasa Aborto</b>	0	0			
<b>Tasa RNV</b>	50,0	200,0	1,000	0	[0 - 58.447]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	100,0	100,0	1,000	0	NA

Tabla R-37. Resultados de grupos de pacientes con 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. Ovocitos mixtos. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.

#### C) Grupo $\geq$ 40 años:

Se valoraron un total de 8 pre-embriónes transferidos en el grupo AZPL, correspondientes a 4 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. No hubo ninguna paciente en el grupo control. En ninguna paciente que pertenecía al grupo AZPL, con edades mayores de  $\geq$ 40 años (n=4) se obtuvo gestación (0%). La media de pre-embriónes transferidos en grupo estudio fue de 2,0 pre-embriónes.

#### 4.8.6 Ovocitos mixtos. ZP < 15 $\mu$ m

##### A) Grupo global ( $\geq$ 38 años):

No hubo transferencias pre-embriónicas procedentes de ovocitos mixtos cuando el promedio de las ZPs era < 15 $\mu$ m en ninguno de los dos grupos.

#### **4.9 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CORRELACIÓN DE LA GESTACIÓN, LA IMPLANTACIÓN, EL ABORTO, LOS RNV Y LA GESTACIÓN GEMELAR ENTRE GRUPOS, DISCRIMINADO POR GROSOR DE LAS ZONAS PELÚCIDAS Y TRATAMIENTO(FIV, ICSI O FIV-ICSI)**

##### **4.9.1 FIV. ZP $\geq$ 15 $\mu$ m**

A) Grupo global ( $\geq$  38 años):

Se valoraron un total de 32 pre-embriones (19 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 13 en el grupo AZPL), correspondientes a 20 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 4 pacientes (33,3%) que pertenecían al grupo control (n=12), sin gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 3 quedaron gestantes (37,5%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 4 vs 4 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs ninguna del grupo AZPL. En el grupo control hubo 2 RNV vs 4 en el grupo de estudio. La tabla R-38 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control la misma en ambos grupos (1,6 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>RESULTADOS GLOBALES: FECUNDACIÓN IN VITRO (ZP <math>\geq</math> 15<math>\mu</math>m)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	33,3	37,5	1,000	0,841	[0,092 - 8,330]
<b>Tasa Implantación</b>	21,0	30,8	0,684	0,610	[0,088 - 4,163]
<b>Tasa Aborto</b>	50,0	0	1,000	0	NA
<b>Tasa RNV</b>	16,7	50,0	0,161	0.219	[0,014 - 2.242]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R-38. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq$  38 años. FIV. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 22 pre-embriones (16 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 6 en el grupo AZPL), correspondientes a 14 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 4 pacientes que pertenecían al grupo control (n=10) se obtuvo gestación (40,0%), sin gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 3 quedaron gestantes (75,0%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos fue de 4 en ambos grupos. De las pacientes gestantes del grupo control 2 de ellas abortaron vs ninguna del grupo AZPL. En el grupo control hubo 2 RNV vs 4 en el grupo de estudio. La tabla R-39 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue 1,6 y en el grupo estudio fue de 1,5, podemos observar que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las tasas de RNV a favor del grupo AZPL.

<b>PACIENTES CON 38-39 AÑOS: FECUNDACIÓN IN VITRO (ZP ≥ 15µm)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	40,0	75,0	0,559	0.248	[0,004 - 4.443]
<b>Tasa Implantación</b>	25,0	66,7	0,136	0.183	[0,012 - 1.837]
<b>Tasa Aborto</b>	50,0	0	0,429	Inf	[0,142 - Inf]
<b>Tasa RNV</b>	20,0	100,0	<b>0,015</b>	0	[0 - 0,792]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	0	1,000	0	NA

Tabla R-39. Resultados por grupos de pacientes con 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. FIV. ZP ≥ 15µm.

## C) Grupo ≥ 40 años:

Se valoraron un total de 10 pre-embriones (3 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 7 en el grupo AZPL), correspondientes a 6 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En ninguna paciente que pertenecía al grupo control, con edades mayores de ≥40 años se obtuvo gestación, frente al grupo que pertenecía a AZPL en que tampoco hubo gestación. La media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 1,5 y en el grupo estudio fue de 1,8.

#### 4.9.2 FIV. ZP < 15µm

##### A) Grupo global (≥ 38 años):

Se valoraron un total de 16 pre-embriones (8 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 8 en el grupo AZPL), correspondientes a 10 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En ninguna paciente que pertenecían al grupo control (n=5) se obtuvo gestación, frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 2 quedaron gestantes (40,0%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo de estudio (AZPL) fue de 2. De las pacientes gestantes del grupo estudio, ninguna abortó. En el grupo estudio hubo 2 RNV. La media de pre-embriones transferidos es la misma en ambos grupos (1,6 pre-embriones).

##### B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 7 pre-embriones (4 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 6 en el grupo AZPL), correspondientes a 7 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. No hubo pacientes que pertenecían al grupo control (n=0), frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 1 quedó gestante (33,3%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo estudio fue de 1. La paciente gestante del grupo estudio, no abortó. En el grupo estudio hubo 1 RNV. La media de pre-embriones transferidos en el grupo control fue 1,5 y en el grupo estudio fue de 1,7.

##### C) Grupo ≥ 40 años:

Se valoraron un total de 5 pre-embriones (2 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 3 en el grupo AZPL), correspondientes a 3 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. No se obtuvo gestación en ninguna paciente que pertenecía al grupo control (n=1), frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que 1 se quedó gestante (50,0%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo de estudio (AZPL) fue de 1, sin presentar aborto. En el grupo estudio hubo 1 RNV. La media de pre-embriones transferidos en el grupo control fue de 2,0 y en el grupo estudio fue de 1,5.

#### 4.9.3 ICSI. ZP $\geq$ 15 $\mu$ m

A) Grupo global ( $\geq$  38 años):

Se valoraron un total de 304 pre-embriones (154 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 150 en el grupo AZPL), correspondientes a 177 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 29 pacientes (33,3%) que pertenecían al grupo control (n=87), resultando en gestación gemelar en 2 de ellas frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 36 quedaron gestantes (40,0%) resultando gestación gemelar en 6 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 35 vs 44 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 7 de ellas abortaron vs 11 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 25 RNV vs 31 en el grupo de estudio. La tabla R-40 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

RESULTADOS GLOBALES: ICSI (ZP $\geq$ 15 $\mu$ m)					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	33,3	40,0	0,436	0,751	[0,387 - 1,449]
<b>Tasa Implantación</b>	22,7	29,3	0,194	0,610	[0,409 - 1,224]
<b>Tasa Aborto</b>	24,0	28,9	0,783	0	[0,218 - 2,662]
<b>Tasa RNV</b>	28,7	34,8	0,425	0.219	[0,386 -1,521]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	6,9	16,7	0,282	1,852	[0,034 -2,334]

Tabla R- 40. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres  $\geq$  38 años. ICSI. ZP  $\geq$  15 $\mu$ m.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 211 pre-embriones (118 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 93 en el grupo AZPL), correspondientes a 120 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 19 pacientes (29,2%) que pertenecían al grupo control (n=65), resultando en gestación gemelar en 2 de ellas frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 27 quedaron gestantes (49,1%) resultando gestación gemelar en 5 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 25 vs 34 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 3 de ellas abortaron vs 6 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 20 RNV vs 26 en el grupo de estudio. La tabla R-41 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 1,8 y en el grupo estudio fue de 1,7, se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las tasas de gestación e implantación a favor del grupo AZPL.

<b>ICSI: PACIENTES CON 38-39 AÑOS (ZP ≥ 15µm)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	29,2	49,0	<b>0,038</b>	0,431	[0,188 - 0,970]
<b>Tasa Implantación</b>	21,2	36,6	<b>0,020</b>	0,468	[0,241 - 0,898]
<b>Tasa Aborto</b>	15,8	22,2	0,716	0,662	[0,093 - 3,698]
<b>Tasa RNV</b>	30,7	47,3	0,090	0,499	[0,219 - 1,116]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	10,5	18,5	0,682	0,525	[0,045 -3,707]

Tabla R-41. Resultados de grupos de pacientes con 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. ICSI. ZP ≥ 15µm.



C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 93 pre-embriones (36 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 57 en el grupo AZPL), correspondientes a 57 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 10 pacientes (45,4%) que pertenecían al grupo control (n=22), sin gestación gemelar en ninguna de las pacientes, frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 9 quedaron gestantes (25,7%) resultando gestación gemelar en 1 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 10 vs 10 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 4 de ellas abortaron vs 5 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 5 RNV vs 5 en el grupo de estudio. La tabla R-42 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control la misma en ambos grupos (1,6 pre-embriones), podemos observar que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>ICSI: PACIENTES <math>\geq 40</math> AÑOS (ZP <math>\geq 15\mu\text{m}</math>)</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	45,4	25,7	0,155	0,431	[0,188 - 0,970]
<b>Tasa Implantación</b>	27,8	17,5	0,302	0,468	[0,241 - 0,898]
<b>Tasa Aborto</b>	40	55,6	0,656	0,662	[0,093 - 3,698]
<b>Tasa RNV</b>	22,7	14,3	0,485	0,499	[0,219 - 1,116]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	20	0,455	0,525	[0,045 -3,707]

Tabla R-42. Resultados por grupos de pacientes con 40 o más años No-AZPL y AZPL. ICSI. ZP  $\geq 15\mu\text{m}$ .

#### 4.9.4 ICSI. ZP < 15µm

A) Grupo global (≥ 38 años):

Se valoraron un total de 166 pre-embriones (76 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 90 en el grupo AZPL), correspondientes a 96 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 13 pacientes (28,3%) que pertenecían al grupo control (n=46), resultando en gestación gemelar en 1 de ellas frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 17 quedaron gestantes (34,0%) resultando gestación gemelar en 2 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 13 vs 21 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 3 de ellas abortaron vs 7 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 9 RNV vs 12 en el grupo de estudio. La tabla R-43 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 1,7 y en el grupo estudio fue de 1,8, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

RESULTADOS GLOBALES: ICSI (ZP < 15µm)					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	28,3	34,0	0,660	0,767	[0,291 - 1,985]
<b>Tasa Implantación</b>	17,1	23,3	0,342	0,680	[0,287 - 1,560]
<b>Tasa Aborto</b>	23,1	41,2	0,440	0,441	[0,057 - 2,672]
<b>Tasa RNV</b>	19,6	24,0	0,630	0,772	[0,254 - 2,271]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	7,7	11,8	1,000	0,635	[0,010 - 13,597]

Tabla R-43. Resultados globales por grupos de pacientes No-AZPL y AZPL en mujeres ≥ 38 años. ICSI. ZP < 15µm.

## B) Grupo 38-39 años:

Se valoraron un total de 106 pre-embriones (46 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 60 en el grupo AZPL), correspondientes a 61 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. Se obtuvo gestación en 12 pacientes (44,4%) que pertenecían al grupo control (n=27), sin gestación gemelar en ninguna de ellas frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 14 quedaron gestantes (41,2%) resultando gestación gemelar en 2 de ellas. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 11 vs 18 en el grupo de estudio (AZPL). De las pacientes gestantes del grupo control 3 de ellas abortaron vs 6 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 7 RNV vs 10 en el grupo de estudio. La tabla R-44 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 1,7 y en el grupo estudio fue de 1,8, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

<b>ICSI: PACIENTES CON 38-39 AÑOS: ZP &lt; 15 µm</b>					
	<b>No-AZPL</b>	<b>AZPL</b>	<b>p value</b>	<b>odds ratio</b>	<b>IC</b>
<b>Tasa Gestación</b>	44,4	41,2	1,000	1,140	[0,364 - 3,572]
<b>Tasa Implantación</b>	24,0	30,0	0,518	0,735	[0,274 - 1,903]
<b>Tasa Aborto</b>	25,0	42,9	0,216	0,281	[0,022 - 2,154]
<b>Tasa RNV</b>	25,9	29,4	1,000	0,842	[0,227 - 2,989]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	14,3	0,483	0	[0 - 6,17]

Tabla R-44. Resultados de grupos de pacientes con 38 y 39 años No-AZPL y AZPL. ICSI. ZP < 15µm.

C) Grupo  $\geq 40$  años:

Se valoraron un total de 60 pre-embriones (30 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 30 en el grupo AZPL), correspondientes a 35 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En 1 paciente que pertenecía al grupo control (n=19) se obtuvo gestación (5,3%), con gestación gemelar frente al grupo que pertenecía a AZPL en las que 3 quedaron gestantes (18,8%) sin gestación gemelar. El número de sacos obtenidos en el grupo control fue de 2 vs 3 en el grupo de estudio (AZPL). La paciente gestante del grupo control no abortó vs 1 del grupo AZPL. En el grupo control hubo 2 RNV vs 2 en el grupo de estudio. La tabla R-45 resume los resultados obtenidos, en cuanto a tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestaciones gemelares. Teniendo en cuenta que la media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 1,6 y en el grupo estudio fue de 1,9, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos.

ICSI: PACIENTES $\geq 40$ AÑOS (ZP < 15 $\mu$ m)					
	No-AZPL	AZPL	p value	odds ratio	IC
<b>Tasa Gestación</b>	5,3	18,8	0,312	0,250	[0,004 - 3,526]
<b>Tasa Implantación</b>	6,7	10,0	1,000	0,648	[0,050 - 6,120]
<b>Tasa Aborto</b>	0	33,3	1,000	NA	NA
<b>Tasa RNV</b>	10,5	12,5	1,000	0,828	[0,054 - 12,795]
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	100,0	0	0,250	NA	NA

Tabla R-45. Resultados por grupos de pacientes con 40 o más años No-AZPL y AZPL. ICSI. ZP < 15 $\mu$ m.

4.9.5 FIV/ICSI. ZP  $\geq 15\mu$ mA) Grupo global ( $\geq 38$  años):

Se valoraron un total de 4 pre-embriones transferidos en el grupo control correspondientes a 2 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. No hubo transferencias en el grupo AZPL. En ninguna paciente que pertenecía al grupo control, con edades mayores de 37 años (n=2), se obtuvo gestación. La media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 2,0.

**B) Grupo 38-39 años:**

Se valoraron un total de 2 pre-embriones (2 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 0 en el grupo AZPL), correspondientes a 1 paciente, que se sometió a un ciclo de FIV/ICSI. En la paciente que pertenecían al grupo control, con edades 38-39 años (n=1) no se obtuvo gestación. La media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 2,0.

**C) Grupo  $\geq$  40 años:**

Se valoraron un total de 2 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 0 en el grupo AZPL), correspondientes a 1 paciente, que se sometió a un ciclo de FIV/ICSI. En la paciente que pertenecía al grupo control, con edades mayores de  $\geq$ 40 años, no se obtuvo gestación. La media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 2,0.

**4.9.6 FIV/ICSI. ZP < 15 $\mu$ m****A) Grupo global ( $\geq$  38 años):**

Se valoraron un total de 6 pre-embriones (4 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 2 en el grupo AZPL), correspondientes a 3 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En ninguna de las pacientes que pertenecían al grupo control, con edades mayores de 37 años (n=2), se obtuvo gestación, frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que tampoco quedó gestante. La media de pre-embriones transferidos en fue la misma en ambos grupos (2,0).

**B) Grupo 38-39 años:**

Se valoraron un total de 6 pre-embriones (4 pre-embriones transferidos en el grupo control vs 2 en el grupo AZPL), correspondientes a 2 pacientes, que se sometieron a un ciclo de FIV/ICSI. En las paciente que pertenecían al grupo control, con edades mayores de 37 años (n=2) no se obtuvo gestación frente al grupo que pertenecía a AZPL en la que tampoco quedó gestante. La media de pre-embriones transferidos en grupo control fue de 2,0.

No hubo transferencias pre-embionarias procedentes de FIV-ICSI con 40 o más años cuando el promedio de las ZPs era < 15 $\mu$ m.

#### 4.10 RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES CON 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON EL GROSOR DE LA ZP ( $\geq 15\mu\text{m}$ )

	No-AZPL 38-39	AZPL 38-39	No-AZPL $\geq 40$ años	AZPL $\geq 40$ años
<b>Tasa Gestación</b>	30,2	<b>50,8*</b>	40,0	23,1
<b>Tasa Implantación</b>	21,5	<b>38,8*</b>	23,8	15,6
<b>Tasa Aborto</b>	21,7	20,0	40,0	55,5
<b>Tasa RNV</b>	26,3	<b>50,8*</b>	28,0	12,8
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	13,0	20,0	0	11,1

\*p<0,005.

Tabla R-46. Resultados globales según edad, AZPL o no, con ZP  $\geq 15\mu\text{m}$

#### 4.11 RESULTADOS GLOBALES POR GRUPOS DE PACIENTES CON 38-39 AÑOS No-AZPL Y AZPL RELACIONADOS CON EL GROSOR DE LA ZP ( $< 15\mu\text{m}$ )

RESULTADOS GLOBALES SEGÚN EDAD, AZPL O NO CUANDO ZP $< 15\mu\text{m}$				
	No-AZPL 38-39	AZPL 38-39	No-AZPL $\geq 40$ años	AZPL $\geq 40$ años
<b>Tasa Gestación</b>	36,4	40,5	5,0	21,0
<b>Tasa Implantación</b>	21,0	29,2	3,2	11,1
<b>Tasa Aborto</b>	16,7	40,0	100,0	25,0
<b>Tasa RNV</b>	27,3	29,7	0	15,7
<b>Gestación Gemelar (%)</b>	0	6,7	0	0

\*p<0,005.

Tabla R-47. Resultados globales según edad, AZPL o no, con ZP  $< 15\mu\text{m}$

## **5. DISCUSIÓN**

La eclosión pre-embionaria es un proceso imprescindible para que se produzca la implantación del blastocisto. Sin embargo no todos los blastocistos son capaces de eclosionar. Para favorecer la eclosión, se puede realizar en el laboratorio la técnica de la EA que puede mejorar las tasas de implantación, no solamente por facilitar el proceso mecánico de la eclosión (Mantoudis *et al.*, 2001).

Uno de los grupos en los que esta eclosión puede verse dificultada es el grupo de edad materna avanzada. Cohen *et al.*, en 1992, demostraron que cuando la edad media de las pacientes tratadas era de  $36,7 \pm 3,7$  años (edad materna avanzada), tanto la tasa de gestación como la de implantación eran significativamente superiores en el grupo de pacientes en las que los pre-embiones transferidos fueron sometidos a EA, con ácido tyrode, 64 vs 48% y 25 vs 18% respectivamente. Schoolcraft *et al.*, 1994, publican un aumento en las tasas de implantación de 33% en el grupo de EA frente al 6,5% en el grupo de no EA con ácido Tyrode. Estos mismos investigadores publican, en 1995, un aumento en las tasas de gestación (58% en el grupo EA tyrode vs 21% del grupo No EA) estudios realizados a mujeres de 40 años o más. Stein *et al.*, 1995, estudiaron 86 pacientes mayores de 38 años. En 46 pacientes, los pre-embiones fueron tratados con PZD y 43 correspondían al grupo control. Los resultados obtenidos demostraron un aumento significativo en las tasas de gestación en el grupo EA (23,9%) frente al grupo No EA (7,0%). Las tasas de gestación publicadas, en 1998, por Magli *et al.*, en pacientes con edades de 38 años o más en el grupo EA con tyrode y sin aplicar la técnica son similares (14,3 vs 10,0). Por otro lado, Edirisingue *et al.*, 1999, publica que cuando se utiliza la técnica PZD no se incrementan las tasas de gestación/implantación en el grupo de mujeres que tienen 38 años o más.

Desde hace más de una década, se describió un enfoque novedoso que consistía en el afinamiento de la ZP pre-embionaria mediante láser, sin perforar totalmente la membrana, ofreciendo ciertas ventajas sobre el procedimiento de la EA tradicional. Esta modalidad de aplicar el AZPL fue analizada por Mandounis *et al.*, 2001, obteniendo mayores tasas de gestación (22,1%) cuando las comparaba con EATL (14,6%) y EAPL (20,9%).

Ghobara *et al.*, en 2006, analizó si el AZPL mejoraba los resultados de gestación e implantación en pacientes que eran sometidas a la FIV convencional o a la ICSI comparándolo con la EATL. Los resultados obtenidos respecto a las tasas de gestación, implantación y RNV favorecen al grupo de AZPL (22,3%, 12,6 y 18,2% vs 15,7%, 7,2% y 12,5% respectivamente). Además, se analizaron los datos realizando una sub-



división de los grupos por edad. Un primer grupo, pacientes menores de 38 años con las tasas de gestación (19,5% vs 35,5%), implantación (10,3% vs 24,8% ) y RNV (16,2% vs 29,7%) y un segundo grupo, compuesto por pacientes con edad mayor de 37 años, encontrando una mejora en los resultados en cuanto a las tasas de gestación, implantación y RNV (14,8%, 6,4%, 14,5% vs 18,3%, 8,9%, 11,5%, respectivamente) cuando la técnica de AZPL era aplicada.

Aunque existe controversia en la literatura, la facilidad de realizar la técnica nos orientó a plantear un estudio para analizar los resultados en las pacientes de TRA del IVI-Murcia esperando conseguir un aumento en los resultados reproductivos de uno de los grupos de peor pronóstico: el grupo de edad avanzada. El diseño de este estudio fue creado para analizar si los resultados reproductivos aumentaban en las mujeres que se sometían a TRA con edad avanzada, cuando se realizaba el AZPL en los pre-embiones transferidos. Para analizar con mayor profundidad los resultados, decidimos dividir el grupo de edad en dos subgrupos (38-39 años y  $\geq 40$  años). Este estudio es original frente a otros estudios publicados, puesto que los diferentes autores aportan datos globales del grupo de edad avanzada mientras que en este trabajo, se analizan los resultados en los dos subgrupos de edad observando una mejora en los resultados de gestación e implantación en el grupo de 38-39 años cuando la técnica AZPL era aplicada mientras que en el grupo de  $\geq 40$  años esta ventaja no está tan clara.

Según Horng *et al.*, 2002, los resultados no aportan resultados estadísticamente significativos a favor de la EA mediante láser cuando se analizan los datos de mujeres con edades mayores o iguales a 38 años sugiriendo que otros factores deben de ser considerados. Petersen *et al.*, 2002, publican un estudio realizado en 100 pacientes mayores de 37 años, donde concluyen que AZPL de forma parcial, no tiene ningún impacto positivo en tasas de gestación e implantación, transfiriendo una media de 3 embriones en cada uno de los grupos. Frydman *et al.*, en 2006, estudiaron un total de 103 pacientes que se habían sometido a TRA, donde 54 pacientes eran designadas como grupo control y las 49 pacientes restantes pertenecían al grupo AZPL. El rango de edad para ambos grupos era de 37-42 años y el número de pre-embiones transferidos en cada uno de los grupos fue de  $2,7 \pm 0,6$ . Los resultados de gestación, implantación y RNV fueron similares tanto para el grupo de estudio (AZPL) como para el grupo control (No-AZLP): 38,8%, 16,1% y 22,4% vs 34,7%, 16,7% y 29,6% respectivamente. Este equipo de investigadores concluye que la técnica de AZPL no mejora los resultados de gestación, implantación y RNV, en pacientes mayores de 36 años.

Los estudios realizados por Kutlu *et al.*, 2008, consistieron en analizar si existía efectividad de la técnica AZPL en dos grupos de pacientes según su edad: 139 pacientes menores de 35 años y 113 mujeres mayores de 34 años. Sugieren que el AZPL, realizado en pre-embriónes de D3 de desarrollo pre-embriónico, no beneficia a las pacientes, sin embargo recomiendan que se deben de realizar estudios más específicos en diferentes subgrupos de pacientes utilizando diferentes metodologías del láser: AZPL o EATL para seleccionar un grupo de pacientes en el cual se puedan beneficiar del procedimiento adecuado. Ghannani *et al.*, 2010, presentan los resultados de 199 pacientes, mayores de 35 años, que se sometieron a TRA, demostrando que el AZPL incrementa, de forma significativa, las tasas de gestación (27,1%) comparado con el grupo control No-AZPL (16,3%). La media de pre-embriónes transferidos fue de 2,5. La incidencia de gestación múltiple en el grupo AZPL es de 13,0% vs 5,3% en el grupo No-AZPL, sin ser comparables los resultados. Más recientemente, Takahashi *et al.*, 2013, estudian una población de 101 pacientes valorando el AZPL, en pacientes mayores de 37 años, obteniendo una tasa más alta de gestación cuando la técnica era aplicada (28,6%) que cuando no (23,1%), aunque no encuentran diferencias estadísticamente significativas.

En el 2014, Aktas *et al.*, publican el beneficio de la técnica de AZPL con resultados estadísticamente significativos, en mujeres mayores de 34 años y con uno o dos fallos de implantación previos, obteniendo unas tasas de gestación de 23% vs 36% ( $p=0,012$ ) cuando los pre-embriónes transferidos estaban en D2 de desarrollo pre-embriónico y 31% vs 56% ( $p=0,018$ ) cuando los pre-embriónes eran de D3.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo están en concordancia con aquellos publicados a favor del AZPL ya que obtuvimos un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en las tasas de gestación, implantación y RNV cuando esta técnica era aplicada en los pre-embriónes de las pacientes que presentaban una edad de 38-39 años al compararlas con el grupo de pacientes en las que no se había realizado la técnica a sus pre-embriónes (46,9%, 35%, 42,7% vs 32,1%, 20,8%, 26,7%, respectivamente) aunque los grupos analizados no son estrictamente nuestros grupos de estudio: 38-39 años y más de 39 años aplicando AZPL (Mandounis *et al.*, 2001, Horng *et al.*, 2002, Petersen *et al.*, 2002, Ghobara *et al.*, 2006, Frydman *et al.*, 2006, Aktan *et al.*, 2006, Kutlu *et al.*, 2008, Takahashi *et al.*, 2013 y Aktas *et al.*, 2014).

Sin embargo, en el grupo de 40 años o más, los datos obtenidos (22,4%, 14,0%, 13,8% vs 24,4%, 16,4%, 15,5) están más en concordancia con los resultados publica-

dos en los que no se encuentra un beneficio de la técnica. Esto nos indica que el grupo considerado como edad materna avanzada no puede considerarse como un grupo total y que subgrupos dentro de este sí que pueden encontrar beneficios al aplicar la técnica del AZPL.

Respecto a la tasa de gemelaridad, hay que tener en cuenta que la transferencia de más de un pre-embrión, como ocurre en la mayoría de las publicaciones, conlleva asociada la posibilidad de una gestación gemelar o múltiple. Mantoudis *et al.*, 2002, transfieren una media de 2,7 pre-embiones en ambos grupos; Petersen *et al.*, 2004, transfieren  $3,0 \pm 0,9$  pre-embiones en el grupo control y  $2,9 \pm 0,8$  en el grupo estudio; Aktan *et al.*, describen medias similares a las anteriores:  $3,6 \pm 1,5$  en el grupo AZLP 25  $\mu\text{m}$  y  $3,2 \pm 1,5$  en el grupo AZLP 50  $\mu\text{m}$ ; Frydman *et al.*, 2006, Ghobara *et al.*, 2000 y Ghannani *et al.*, 2010, describen una media de 2-3 pre-embiones transferidos; Kutlu *et al.*, 2010, transfieren  $2,9 \pm 0,5$  en No-AZPL y  $2,8 \pm 0,5$  en el grupo AZPL y Aktas *et al.*, 2014, sorprendentemente un pre-embrión en cada uno de los grupos. En nuestro grupo, el número de pre-embiones transferidos, al útero materno, es de 1,5.

Cabe señalar que el aumento en la gemelaridad debería de estar enfocado en el tipo monocorial ya que sería este tipo y no el bicorial, el que estaría provocado por un posible efecto de la ZP en el estrangulamiento de la masa celular interna del pre-embrión al eclosionar, favorecido por la EA. Sin embargo, este dato no consta en las publicaciones revisadas.

Algunas publicaciones muestran un incremento en la tasa de gemelaridad cuando se utiliza la técnica del AZPL. Mantounis *et al.*, 2001, obtienen un 23,3% en EATL mientras que con AZPL la tasa fue de 27,7%. También Balakier *et al.*, 2009, aportan datos de gestación múltiple tanto en el grupo estudio (43,8%) como el grupo control (22,2%) aunque en este estudio la edad de la población menores de 35 años y no en edad materna avanzada que es nuestro grupo de estudio. Ghannani *et al.*, 2010, aporta una tasa similar de gestación gemelar de 5,3% en el grupo control vs 5,4%.

Nuestro estudio registra los datos globales de gestación gemelar sin obtener diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos, 6,5% en el grupo control (No-AZPL) y 15,5% en el grupo estudio (AZPL) pero cabe resaltar que ninguno de los casos fue gemelar monozigótico.

Desde el punto de vista del origen de los ovocitos, no se encuentran estudios

publicados relacionados con el AZPL. La posibilidad de obtener pre-embriones a partir de ovocitos vitrificados y ovocitos obtenidos el mismo día de la punción folicular es una posibilidad dentro del laboratorio de FIV. En nuestro estudio incluimos este dato, dado que a partir de Noviembre de 2007 en la Comunidad autónoma de la región de Murcia se permitió la vitrificación (aunque la ley española de reproducción asistida lo permitió desde el 2006). Los casos en los cuales se transfirieron pre-embriones generados a partir de ovocitos vitrificados fueron 19 (6,2%), de los cuales 8 pertenecen al grupo de No-AZPL y los 11 restantes al grupo de estudio (AZPL) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables analizadas. En este grupo de pacientes no encontramos gestaciones gemelares.

Respecto a la técnica de inseminación utilizada, es decir, la FIV o la ICSI, Ghabara *et al.*, 2006, Frydman *et al.*, 2006 y Balakier *et al.*, 2009, teniendo en cuenta que en esta última publicación la edad de las pacientes era menor de 37 años, refieren que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos respecto a las técnicas de FIV e ICSI al realizar o no la técnica AZPL. Hay que resaltar que la mayoría de artículos publicados solo utilizan la técnica de la ICSI.

De las 308 pacientes incluidas en este estudio, 30 pacientes (9,7%) fueron sometidos a tratamiento de la FIV convencional, mientras que en 273 (88,6%) se les practicó la ICSI a los embriones y los 5 casos restantes (1,6%) fueron inseminados con FIV-ICSI.

En el 88,6% de las pacientes que se incluyeron en este estudio, el tratamiento de reproducción asistida fue la ICSI, donde 133 pacientes (48,7%) pertenecen al grupo control y 140 (51,2%) participaron en el grupo de estudio. En los datos globales, las tasas de gestación, implantación, aborto, RNV y gestación gemelar no se observaron diferencias significativas entre el grupo No-AZPL y AZPL: 31,6%, 21,0%, 23,8%, 25,6% y 7,1% vs 37,9%, 27,1%, 34,0%, 31,0% y 15,0%, respectivamente, pero al analizar los resultados de implantación en el grupo 38-39 años, estos fueron mayores cuando la técnica de AZPL fue aplicada comparada con el grupo control: 34,2% vs 22,0% ( $p=0,017$ ), respectivamente. Estas observaciones permiten sugerir que tanto la técnica de FIV convencional como la ICSI, no afectan los resultados en este grupo de pacientes respecto al AZPL.

Las tasas de gestación, implantación y aborto cuando las pacientes ( $n=4$ ), fueron sometidas a FIV, en el grupo de 38-39 años No-AZPL, fueron de 35,7%, 18,2%,

40,0%, mientras que en el grupo AZPL las tasas fueron: 57,1%, 45,5% y 0%. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas puede observarse claramente que las tasas del grupo de AZPL son el doble en cuanto a gestación e implantación y que no se obtienen abortos en el grupo de AZPL. Esta no diferencia estadísticamente significativa puede explicarse debido al bajo número de pacientes incluidas en este grupo. También encontramos la misma tendencia (40,0% vs 71,4%) en la variable de RNV a favor del grupo de estudio ( $p=0,058$ ).

La definición de ZP gruesa aparece en la publicación de Cohen *et al.*, 1992, donde establece que una ZP pre-embionaria se considera gruesa cuando el promedio de tres o cuatro medidas son mayores o iguales a  $15\mu\text{m}$  y, con esta hipótesis, evidencia que las mujeres mayores de 35 años, con pobre pronóstico reproductivo, se benefician de la técnica de EA cuando los pre-embiones mantienen este tipo de grosor, obteniendo una tasas de gestación e implantación (64% y 48%, respectivamente) mejores que las del grupo control (51% y 36%, respectivamente) obteniendo diferencias estadísticamente significativas en las dos variables ( $p<0,05$ ), en un total de 163 pacientes estudiadas.

La bibliografía actual no dispone de estudios donde se relacionen el grosor de la ZP pre-embionaria y el afinamiento de la misma por tecnología láser en transferencias realizadas, en fresco, en mujeres de edad avanzada diferenciando 2 subgrupos de edad avanzada: 38-39 años y  $\geq 40$  años.

Nuestro estudio analiza no solamente el impacto del AZPL en ciclos de FIV/ICSI, sino que también mide el grosor de la ZP pre-embionaria estableciendo una mejor relación entre este y el efecto del AZPL cuando la técnica es aplicada. Con los resultados obtenidos podemos demostrar que sí que hay un beneficio para las pacientes cuando los pre-embiones a transferir son sometidos a la técnica del AZPL cuando el grosor de la ZP pre-embionaria es mayor de  $14\mu\text{m}$ . Esto está en concordancia con lo publicado por Cohen *et al.*, 1992, aunque la metodología utilizada es diferente ya que en este estudio, para realizar el afinamiento de la ZP, se utiliza el láser y no se realiza la EAT por medio del ácido tyrode.

Debido al pequeño tamaño muestral en los procedimientos de FIV, no podemos concluir si realmente existe un efecto beneficioso cuando se aplica el AZPL en pacientes que se someten a este tipo de procedimiento en TRA. La misma situación se presenta cuando los ovocitos están vitrificados-desvitrificados.

De las 181 pacientes sometidas a la ICSI con edades entre 38-39 años, 120 de tenían las ZPs pre-embionarias un grosor mayor de 14µm. Los resultados de las pacientes cuyos pre-embiones fueron sometidos a la técnica de AZPL (55), presentaron tasas de gestación, implantación y RNV de 49,1%, 36,6%, 47,3% respectivamente, vs el grupo control (29,2%, 21,2%, 30,7% respectivamente) siendo estadísticamente significativas las tasas de gestación e implantación a favor del grupo AZPL:

En los resultados globales, la incidencia de las tasas de gestación gemelares no presenta diferencias estadísticamente significativa en el grupo de estudio al compararlo con el grupo control (15,5% vs 6,5%). Los resultados globales de pacientes con ZP pre-embionarias mayores de 14µm, en términos de gestación gemelar, es de 20,5% para las pacientes con pre-embiones sometidos al afinamiento de las zonas pelúcidas, mientras que el grupo control aporta un resultado global de 9,1%, incrementándose en el grupo de 38-39 años en el grupo estudio (20,0%) pero sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas. Existe cierta preocupación por el aumento constante de las gestaciones múltiples después de emplear metodologías para el afinamiento o ruptura total de la ZP pre-embionaria, pero la actualización realizada por la revisión Cochrane, (2012), ha demostrado que la EA no parece ofrecer un aumento significativo en gestaciones gemelares y la tasa de RNV no se ve incrementada cuando la EA es realizada. La mayoría de los estudios publicados no reportan tasas de gestación gemelar. El otro factor de confusión que puede influir en el incremento de gestación múltiple es el número de pre-embiones transferidos. Con respecto a este punto, se encuentran variaciones en los estudios relacionados con EA y más específicamente con el afinamiento de la ZP.

Nuestro estudio reporta 77 RNV sanos, libres de malformaciones congénitas y defectos cardíacos.

Con los resultados obtenidos se ha demostrado que el AZPL es una técnica efectiva para que el pre-embrión pueda eclosionar en el útero materno e implantar. Después de utilizar el AZPL, en pacientes de 38-39 años, la tasa de implantación fue significativamente mayor al compararla con el grupo No-AZPL (35,0% vs 20,8%  $p=0,033$ , respectivamente) apoyando la idea que esta metodología es eficiente básicamente en el subgrupo de pacientes de edad entre 38-39 años cuando el grosor de la ZP es mayor de 14µm.

## **6. CONCLUSIONES**

En pacientes de 38-39 años:

- 1- Las tasas de gestación e implantación obtenidas son significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) cuando se realiza el AZPL, en ovocitos frescos cuyas ZPs son  $\geq 15\mu\text{m}$ , al compararlas con pacientes en las que no se ha aplicado el AZPL a sus pre-embryones antes de la transferencia.
- 2- La tasa de aborto no se ve afectada cuando se aplica el AZPL a los embryones antes de la transferencia.
- 3- La tasa de RNV obtenida es significativamente superior ( $p < 0,05$ ) cuando se realiza el AZPL, en ovocitos frescos cuyas ZPs son  $\geq 15\mu\text{m}$  al compararlas con pacientes en las que no se ha aplicado el AZPL a sus pre-embryones antes de la transferencia.
- 4- Las tasas de aborto obtenidas de la transferencia pre-embryonaria en pacientes con edades entre 38 y 39 años no se ven afectadas en ninguno de los tratamientos de reproducción asistida empleados, ni en el origen de los ovocitos cuando se aplica la técnica del afinamiento de la zona pelúcida mediante metodología láser.
- 5- No hay diferencias estadísticamente significativas en las tasas de gestación gemelar obtenidas en los subgrupos de este grupo de edad.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## A

Aktan E, Demiroglu AM, Bozkurt B, Ozer D, Gurgan T. The effect of zona thinning size on implantation and pregnancy rates of ICSI-ET patients with advanced woman age. *Middle East Fertility Society Journal* 2006; 11:191-195.

Aktas R, Altunkaynak M, Tunali G, Arat N, Sofuoglu K, Cogendez K, Kutlu T, Devranoglu B, Ankarali H. Effects of laser zona thinning on pregnancy rates in patients with implantation failure. *Maltepe Medical Journal* 2014; 6:1-7.

Alikani M, Noyes N, Cohen J, Rosenwaks Z. Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture *Human Reproduction* 1994; 9:1318-1321.

Alikani M, Cekleniak N, Walters E, Cohen J. Monozygotic twinning following assisted conception: an analysis of 81 consecutive cases *Human Reproduction* 2003;18: 1937-1943.

Antinori S, Selman H.A, Caffa B, Panci C, Dani GL, Versaci C. Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. *Human Reprod* 1996; 11:2488-2492 (a).

Antinori S, Panci C, Selman HA, Caffa B, Dani GL, Versaci C. Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. *Human Reprod* 1996; 11; 3:590-594 (b).

Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa MJ, Herrero R, Moreno JM, Ortiz A, Prados F, Rodríguez L, Santaló J, De los Santos MJ, Ten J, Torelló MJ. II Cuaderno de embriología clínica. Criterios de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: ASEBIR; 2007.

Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Reineke A, Harjete M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987; 2:695-700.

Aston K, Peterson CM, Carrell DT. Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. *Reproduction* 2008; 136: 377-386.

Austin CR. Cortical granules in hamster eggs. *Exp Cell Res* 1956; 10:533 -540.

## B

Balaban B, Bulent U, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Human Reprod* 2002; 17:1239 -1243.

Balakier H, Mandel M, Sojecki A, Motamedi G, Zaver S, Clifford L. Laser zona thinning in women aged  $\leq 37$  years: a randomized study *Fertil Steril* 2009;91:1479 -1482.

Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y. Clinical parameters influencing human zona pellucida thickness. *Fertil Steril* 1996; 66:408 - 411.

Bertrand E, Van Den Bergh M, Englert Y. Fertilization and early embryology: Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Human Reprod* 1995; 10:1189-1193.

Bedford JM. Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anat Rec* 1977; 188:477- 487.

Behr B, Fisch JD, Racowsky C, Miller K, Pool TB, Milki AA. Blastocyst-et and monozygotic twinning. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2000; 17: 349 -351.

Bider D, Livshits A, Yonish M, Yemini Z, Mashiah S, Dor J. Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age. *Human Reprod* 1997; 12:317-320.

Blake DA, Forsberg AS, Johanssib BR, Wikland M. Laser zona pellucida thinning: an alternative approach to assisted hatching. *Human Reprod* 2001; 16:1959 -1964.

Bleil J, Wassarman P. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Cell Biology* 1980; 77:1029 -1033.

Blickstein I. Zygotic-Splitting rates after single-embryo transfers in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2003; 348:881-882.

## C

Calderón G, Prados N, Caligara C, Mantrana E, Navarro J, Pellicer A, Remohí J. Calidad embrionaria. *Reproducción humana 2º ed. Madrid: MacGraw-Hill Interamericana* 2002; 463 - 468.

Cariño C, Díaz L, Méndez I. Antígenos de la zona pelúcida en el ovocito humano: su importancia en las estrategias anticonceptivas. *La Revista de Investigación Clínica* 2001; 53:174 -180.

Chamberlin ME, Ringuette MJ, Philpott CC, Chamow SM, Dean J. Molecular genetics of the mouse zona pellucida. *The Mammalian Egg Coat*. 1987; 1-17

Cohen J. Assisted hatching of human embryos. *J. In Vitro Fert Embryo Transf* 1991; 8:179 -190.

Cohen J, Elsner C, Kort H. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Human Reprod* 1990; 5:7-13.

Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wright G. Video cinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 51:820 - 827.

Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992; 7:685-691.

Cohen J, Alikani M, Liu H, Rosenwaks Z. Rescue of human embryos by micromanipulation. *Bailliere's Clin Obstet Gynaecol* 1994; 8:95 -116

Conner SJ, Lefie L, Hughes DC, Barratt CLR. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Human Reprod* 2005; 20:1148 -1152.

Chung S. The thickness and Volume change of the zona pellucida following ovulation and fertilization. *Yonsei Medical Journal* 1971; 12:28 - 33.

**D**

Das S, Blake D, Farquhar C, Seif MM. Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI), Cochrane data base of systematic reviews, 2009 issue 2. Art. No.:CD001894. DOI: 10.1002/14651858.CD001894.pub4.

Dean J. Biology of Mammalian Fertilization: Role of the Zona Pellucida. *The Journal of Clinical Investigation, Inc* 1992; 89:1055 -1059.

Del Río MJ, Godoy A, Toro A, Orellana R, Cortés M, Moreno R, Vigil V. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Rev Int Androl* 2007; 5:368 - 373.

Derom C, Vlietinck R, Derom R, Van Den Berghe H, Thiery M. Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction. *Lancet* 1978; 1:1236 -238

DeMeestere I, Barlow P, Leroy F. Hardening of zona pellucida of mouse oocytes and embryos in vivo and in vitro. *J. Fertil Women Med* 1997; 42:219-222.

Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S, Wilkins B. The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6:331-347.

**E**

Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der Merwe L, Donner P. Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res* 2001; 303: 277-287.

Edirisinghe W, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, Suwajanakorn S, Pruksananonda K, Chinpilas V, Virutamasen P. A Study failing to determine significant benefits from assisted hatching: patients selected for advanced age, zonal thickness of embryos, and previous failed attempts. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 294-301.

Elizur SE, Levron J, Shrim A, Sivan E, Dor J, Shulman A. Monozygotic twinning is not associated with zona pellucida micromanipulation procedures but increases with high-order multiple pregnancies. *Fertil Steril* 2004; 82: 500-501.

Evans JP, Florman HM. The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol* 2002; Suppl: 57- 63.

Edi-Osaghie E, Hooper L, Seif M. The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systemic review. *Human Reprod* 2003; 18:1828 -1835.

Escudero E, Bosch E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Comparison of two different starting multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols in a selected group of in vitro fertilization–embryo transfer patients. *Fertil Steril* 2004; 81:562-566.

## F

Familiari G, Nottola S, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, Motta P. Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol Reprod Dev* 1992; 32:51-61.

Fang C, Li T, Miao BY, Zhuang GL Zhou C. Mechanically expanding the zona pellucida of human frozen thawed embryos: a new method of assisted hatching. *Fertil Steril* 2010; 94:1302-1306.

Fong CY, Bongso A, Ng S, Kumar J, Trounson A, Ratnam S. Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving in vitro fertilization and understanding implantation *Human Reprod* 1998; 13:2926-2932.

Frydman N, Madoux S, Hesters L, Duvernoy C, Feyereisen E, Ledu A, Frydman R, Fanchin R. A randomized double- blind controlled study on the efficacy of laser zona pellucida thinning on live birth rates in cases of advanced age. *Human Reprod* 2006; 21: 2130-2135.

## G

Ghannadi A, Kazerooni M, Jamalzadeh F, Amiri S, Rostami P, Absalan, F. The effects of laser assisted hatching on pregnancy rates. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2011; 9: 95-98,

Gabrielsen A, Linderberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Human Reprod* 2001; 16:2166-2170.

Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, Feldinger B, Linderberg S, Feeder J. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Human Reprod* 2004; 19:2258-2262.

Garside WT, Loret de Mola JR, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: correlation with embryo quality, age, and implantation. *Mol Reprod Dev* 1997; 47:99 -104.

Germond M, Rink K, Nocera D, Delacretaz G, Senn Alfred, Fakan S. Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48  $\mu\text{m}$  diodo laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril* 1995; 64:604 - 611.

Ghobara TS, Cahill DJ, Ford TS, Ford WCL, Collyer HM, Wilson PE, Al-Nuaim L, Jenkins J. Effects of assisted hatching method and age on implantation rates of IVF and ICSI. *Reproductive Biomedicine Online* 2006; 13:261- 267.

Gordon JW, Dapunt U. A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 1993; 59:1296-1301.

Green D. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction* 1997; 2:147-156.

Gupta SK, Yurewicz EC, Sacco AG, Kaul R, Jethanandani P, Govind CK. Human zona pellucida glycoproteins: characterization using antibodies against recombinant non-human primate ZP1, ZP2 and ZP3. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:1058-1064.

## H

Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. K. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:119-128.

Hellebaut S, De Sutter P, Dozortsev D, Onghena A, Qian C, Dhont M. Does assisted hatching improve implantation rates after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in all patients? A prospective randomized study. *J. Assisted Reprod Genet* 1996; 13:19-22.

Hershlag A, Feng HL. Effect of prefreeze assisted hatching on post thaw survival of mouse embryos. *Fertil Steril* 2005; 84:1752-1754.

Hershlag A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril* 1999; 71:144-1446.

Hsieh Y, Huang C, Cheng T, Chang C, Horng-Der T, Lee M. Laser- assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. *Fertil Steril* 2002; 78:179-182.

Horng S, Chang C, Wu H, Wang C, Huang H, Wang H, Soong Y. Laser-assisted hatching of embryos in women of advanced age after in vitro fertilization: A preliminary report. *Chang Gung. Med J* 2002; 25: 531-536.

Host E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2002; 77: 511–515.

## K

Khalifa E, Tucker MJ, Hunt P. Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992; 7:532-536.

Kissin D, Kawwass J, Monsour M, Boulet S, Donna R, Jamieson D. Assisted hatching: trends and pregnancy outcomes, United States, 2000–2010. *Fertil Steril* 2014; 102:795-801.

Kojima F, Fujil S, Fukuhara R, Nakamura R, Kimura H, Yamaguchi E, Fukui A, Mizunuma H. The usefulness of the measurement of the zona pellucida thickness in the



morphological evaluation of human morula. *Journal of mammalian ova research*.2005; 22:321-235.

Kutlu P, Atvar O, Faruk O. Laser assisted zona thinning technique has no beneficial effect on the ART outcomes of two different maternal age groups. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27:457- 461.

## L

Lee V, Dunbar BS. Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Dev Biol* 1993; 155:371-382.

Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reprod* 2004; 19:1580-1586.

Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z. Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 1993; 60:871-875.

Llanos M, Vigil P, Salgado M, Morales P. Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1993; 97:173-178.

Loret R, Garside W, Bucci J, Tureck R, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: Correlation with Diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:332-336.

## M

Magli C, Gianaroli L, Ferraretti A M.C.Magli, Fortini D, Aicardi G, Montanaro N. Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Human Reprod* 1998; 13:1331-1335.

Maneiro E, Ron-Corzo Angel, Julve J, Goyanes V. Surface area/volume ratio and growth equation of the human early embryo. *J.Dev.Biol* 1991; 35:139 -143.

Makrakis A, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril* 2006; 86:1596-600.

Mercader A, Simón C, Galán A, Herrero R, Albert C, Remohí J, Pellicer A. An Analysis of Spontaneous Hatching in a Human Endometrial Epithelial Coculture System: Is Assisted Hatching Justified? *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:315-319.

Mercader A, Buendía P, Gámiz P, Albert C. Valoración morfológica del blastocisto. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana 3ª ed. Madrid: MacGraw-Hill Interamericana 2007; 231-236.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hillgase KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reprod* 2011; 10:2658-2671.

Mantoudis E, Podsiadly B, Gorgy A, Venkat, Craft I. A comparison between quarter, partial and total laser assisted hatching in selected infertility patients. *Human Reprod* 2001; 10:2182-2186.

Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM. Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertil Steril* 2003; 79:503-506.

Modlinski J. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *Embryol Exp. Morph* 1970; 23: 539-547.

Mondéjar I, Martínez I, Avilés M, Coy P. Identification of potential oviductal factors responsible for zona pellucida hardening and monospermy during fertilization in mammals. *Biology of Reprod* 2013; 89:1-8.

Monné M, Jovine L. Structural view of egg coat architecture and function in fertilization. *Biology of Reproduction* 2011; 85:661-669.

**N**

Nawroth F, Müller P, Wolf C, Sudik R. Is the zona pellucida thickness of metaphase-II oocytes in an IVF/ICSI program influenced by the patient's age? *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52:55-59.

Nakayama T, Hiroshi F, Shigetoshi Y, Tastumi K, Testuro H, Shingo F. Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo-micromanipulator for morphologically low-quality embryos in poor-prognosis infertile patients. *Fertil Steril* 1999; 71:1014-1018.

Nikas G, Ao A, Winston R, Handyside AH. Comparison and surface polarity in the human embryos in vitro. *Biology of Reproduction* 1996; 55:32-37.

Nikas G, Paraschos T, Psychoyos A, Handyside AH. The zona reaction in human oocytes as seen with scanning electron microscopy. *Hum Reprod* 1994; 9:2135-2138.

Ng EHY, Lau EYL, Yeung WSB, Cheung MC, Tang OS, Chunget P. Randomized double-blind comparison of laser zona pellucid thinning and breaching in frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Fertil Steril* 2007; 89; 1147-1153.

**P**

Palmstierna M, Murkes D, Csemiczky, G, Andersson O, Wramsby H. Zona pellucida thickness variation and occurrence of visible mononucleated blastomeres in pre-embryos are associated with a high pregnancy rate in IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:71-75.

Papi M, Brunelli R, Sylla L, Parasassi T, Monaci M, Maulucci G, Missori M, Arcovito G, Ursini F, De Spirito M. Mechanical properties of zona pellucida hardening. *Eur Biophys J* 2010; 39:987- 992.

Payne D, P.Flaherty S, F.Barry M. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography *Human Reprod* 1997;12:532-541.

Pelletier C, B.A, Keefe D, Trimarchi J. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril* 2004; 81:850-856.

Petersen C, Mauri A, Baruffi R, Pongtes A, Franco J. Zona thinning with a noncontact diode laser in ICSI embryos from women of advanced age. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19:512-516.

Petersen C, Mauri A, Baruffi R, Oliveira JBA, Massaro FC, Elder Km Franco Jr. Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning. *RBMOnline* 2005; 10; 224-229.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Role of assisted hatching in vitro fertilization: a guideline. *Fertil Steril* 2014; 102:48-51.

Primi M, Senn A, Montag M, Van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A, Barri P, Germond M. A European multicenter prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Human Reprod* 2004; 19: 2325–2333

Phillips D, Shalgi R. Surface properties of the zona pellucida. *J Exp Zool* 1980; 213:1-8.

Plachot M, Junca AM, Mandelbaum J, Cohen J, Salat-Baroux J, Da Lage C. Timing of in-vitro fertilization of cumulus-free and cumulus-enclosed human oocytes. *Hum Reprod* 1986; 1:237-42.

## R

Raz T, Skutelsky E, Shalgi R. Post-fertilization changes in the zona pellucida glycoproteins of rat eggs. *Histochem Cell Biol* 1996; 106:395-403.

## S

Saito H, Tsutsumi O, Noda Y, Ibuki Y, Hiroi M. Do assisted reproductive technologies have effects on the demography of mozigotic twinning? *Fertil Steril* 2000; 74:178-179.

Schachter M, Raziel A, Friedler S, Strassburger D, Bern, Ron-El L. Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation. *Human Reproduction* 2001; 16:1264-1269.

Schoolcraft W, Jones, G, Schlenker T, Jones, G, Gee M. Assisted hatching in the treatment in poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil Steril* 1994; 62:551-554.

Schoolcraft W, Schlenker T, Jones, G, Jones H. In vitro fertilization in women age 40 and older: the impact of assisted hatching. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:581-584.

Shabanowitz R, O'Rand M. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J.Reprod Fert* 1988; 82:151-161.

Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, Martin-Pont B, Bottero J, Porcher R, Cedrin-Durnerin, Hugues JN, Wolf P. A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Human Reprod* 2006; 21:2384-2389.

Simón C. Herrer R. La implantación embrionaria. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 1997; 3:41-54.

Sinowatz F, Köllea S, Töpfer-Petersen E. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* 2001; 168:24-35.

Schiewe MC, Araujo E Jr, Asch RH, Balmaceda JP. Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *J Assist Reprod Genet* 1995a; 12:2-7.

Schiewe MC, Neev J, Hazeleger NL, Balmaceda JP, Berns MW, Tadir Y. Developmental competence of mouse embryos following zona drilling using a non-contact holmium:yttrium scandium gallium garnet (Ho:YSGG) laser system. *Hum Reprod* 1995b; 10:1821-4.

Stein A, Pinkas H, Rufas O, Pinkas H, Ovadia J, Amit S, Fish B. Assisted hatching by partial zona dissection of human pre- embryos in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 63:838-841.

Strohmer H, Feichtinger W. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992; 58:212-214.

Sun S, Choi J, Son J, Joo J, Ko G, Lee K. The effect of long zona dissection using ICSI pipettes for mechanical assisted hatching in vitrified-thawed blastocyst transfers. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:1431-1434.

Sun QY. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 342-348.

Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet* 2005; 258-262.

## T

Tadir Y, Wright WH, Vafa O, Liaw LH, Asch R, Berns M. Micromanipulation of gametes using laser microbeams. *Human Reprod* 1991; 6:1011-1016.

Takahashi I, Hatori A, Nakano H. The usefulness of partial thinning of zona pellucida using a laser-assisted hatching system in ICSI. *Journal of Mammalian Ova Research* 2013; 30:49-52.

Tarlatzis B, Qublan H, Sanopoulou T, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Increase in the monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer *Fertil Steril* 2002; 77:196 -198.

Tucker MJ, Luecke NM, Wiker SR, Wright G. Chemical removal of the outside of the zona pellucida of day 3 human embryos has no impact on implantation rate. *Assist Reprod Genet* 1993; 10:187-191.

**W**

Wassarman P. Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 1988; 57: 415-442.

Wassarman P, Liu C, Chen J, Qi H, Litscher E. Ovarian development in mice bearing homozygous or heterozygous null mutations in zona pellucida glycoprotein gene *mZP3*. *Histol Histopathology* 1998; 13:293-300.

Wassarman P, Mortillo S. Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int Rev Cytol* 1991; 130:85-110.

Wassarman P, Litscher E. Influence of the zona pellucida of the mouse egg on folliculogenesis and fertility. *Int. J. Dev. Biol* 2012; 56: 833-839

**V**

Visconti P, Kopf G. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biology of Reprod* 1998; 59:1-6

**Y**

Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994; 2:371-372.

Yanaihara A, Yorimitsu T, Motoyama H, Watanabe H, Kawamura T. Monozygotic multiple gestation following in vitro fertilization: analysis of seven cases from japan. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 2007; 4:1-4.

**Z**

Zhao L, Heather B, Shi X, Li L, Reim K, Miler D. Complexin is requires for mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol.* 2007; 15:236-244.

## **8. ABREVIATURAS**



**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**AZPL:** Afinamiento de la zona pelúcida mediante láser

**B:** Blastocisto

**BC:** Blastocisto cavitado

**BE:** Blastocisto expandido

**BH:** Blastocisto eclosionado

**BHi:** Blastocisto eclosionando

**BT:** Blastocisto temprano

**CCCO:** Complejo cúmulos-corona-ovocito

**CCO:** Cúmulos-corona-ovocito

**D:** Día

**EA:** Eclosión asistida

**EAL:** Eclosión asistida mediante láser (siglas en inglés: Laser assisted hatching)

**EATL:** Eclosión asistida total mediante láser

**EAPL:** Eclosión asistida parcial mediante láser

**AH:** Eclosión asistida (siglas en inglés: Assisted hatching)

**G:** Gestación

**FIV:** Fecundación in vitro

**FSH:** Hormona folículo estimulante (siglas en inglés: follicular stimulation hormone)

**I:** Implantación

**ICSI:** Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (siglas en inglés: ICSI)

**kDa:** kilo Dalton

**Lab:** Laboratorio

**MAE:** Membrana acrosomal externa

**MCI:** Masa celular interna

**MP:** Membrana plasmática

**NA:** No aplica

**NS:** No significativo

**OVPG1:** Glicoproteína específica del oviducto (siglas en inglés: specific glycoprotein)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PZD:** Disección Parcial de la Zona Pelúcida

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**RA:** Reproducción Asistida

**RNV:** Recién Nacido Vivo

**DPZ:** Disección parcial de la zona (siglas en inglés: LZD)

**T.:** Tasa

**TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida

**SP:** Segmento principal

**SDS±PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (siglas en inglés: sodium dodecyl sulphate ± polyacrylamide gel electrophoresis)

**Vs:** versus

**ZP:** Zona pelúcida

**ZPs:** Zonas pelúcidas

**ZPTV:** Variación del grosor de la zona pelúcida (siglas en inglés: Zona pellucida thickness variation)

**°C:** Grados centígrados

**H:** hora

**µm:** Micra

## **9. AGRADECIMIENTOS**

-A quién será sino a Juan Luis y a Alejandro por permitirme realizar este apasionante trabajo, gracias por tanta paciencia!!, gracias, mil gracias!

-Agradezco a mis padres, por su sabiduría y apoyo incondicional brindado a través de la distancia.

-A mis hermanos y familiares por entenderme y animarme en esta ardua tarea a pesar de los kilómetros que nos separan.

-A los doctores Antonio Pellicer y José Remohí por haberme brindado la oportunidad de aprender el mundo de la reproducción asistida.

-A Amparo Ruiz, M. José De los Santos, M. Carmen Rubio, Yolanda Mínguez, Amparo Mercader, Pep Romero por enseñarme los inicios de la fecundación in vitro en Valencia.

-A Emilio Gómez por sugerirme desarrollar la técnica de la eclosión asistida.

-Al doctor José Landeras porque creyó en este proyecto desde los inicios.

-A Gloria Calderón por todo su apoyo y decirme una frase....disfruta la tesis.... y es lo que he hecho.

-A las doctoras María Nicolás, Laura Fernández, Pilar Albero, por facilitar el desarrollo de este trabajo y que tuviera un buen final, gracias!

-A Marta Mollá por su colaboración en todo este tiempo.

-De nuevo a Amparo Mercader, por su eterna disponibilidad, como siempre, gracias Amparo!

-Al personal del FIV por haber tenido en cuenta el protocolo a seguir en la realización del estudio: Ana Sánchez, Julián Marcos y David Gumbao.

-Al personal del IVI Murcia por las palabras de ánimo, sobre todo de Eva Manresa, Lucía Martínez, M. Carmen Sánchez y Marisol, mil gracias!!

-A Inma Díaz, María Cánovas, Jose Sánchez y Paul por su colaboración en los últimos momentos!!

- A Marga Esbert, por su valiosa colaboración en la elaboración de esta tesis.

- A Juan Carlos Martínez y Nicolás Garrido por haberme asesorado en la elaboración de los protocolos de estudio para su presentación ante la Unidad de apoyo y gestión de investigación (UAGI) de la fundación IVI y a Mireia Florencia y Manuel Fernández del Comité de investigación (COI) IVI Sevilla por su colaboración en las sugerencias de los proyectos de este trabajo y su presentación ante el comité ético del hospital Morales Meseguer de Murcia.

-A Raquel Romar, Pilar Coy, Salvador Ruiz, Joaquín Gadea, Fran García y todo el equipo del departamento de Fisiología de la facultad de Veterinaria de la U. de Murcia por brindarme su apoyo durante todo este periodo de tiempo.

-A Rebeca López por sus acertadas y oportunas explicaciones.

-A José Bartret por facilitarme toda la bibliografía solicitada.

-A Alfredo Navarro, técnico en exportación de datos de la Fundación IVI por los datos estadísticos.

-A Martha Bolívar, por haberme dado tanto ánimo a pesar de la distancia, gracias amiga!

-A Juan Diego, Chona, Gustavo, Juani, Francesco, Trini, Merche por haberme entendido en las frecuentes ausencias y haberme dado tanta energía positiva.

A todas las personas, las de mi Colombia querida y las de España, mi segunda tierra, mil y mil gracias por haber hecho realidad este tan anhelado sueño, pues ha sido el resultado de mucho esfuerzo, dedicación y más aún, a esta edad....