

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto de la no renovación del medio *Global® total®*
durante el cultivo *in vitro* de embriones humanos

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en
Biología

Fernando Daniel Peña Espinoza

Asesor: Hugo Mauricio Gonzáles Molfino

Lima, Perú

2019

DEDICATORIA

A Fernando por ser la inspiración, luz y guía en mi vida.

A Virleta y Erika por su cariño, esfuerzo y sacrificio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alvaro Ascenzo Aparicio, por permitirme realizar ésta investigación en el laboratorio de reproducción asistida de la Clínica Miraflores.

Al Mg. Mauricio Gonzales Molfino, por su asesoría y consejos durante la elaboración de la presente investigación.

A la Blga. Rocío Dávalos, por su gran amistad, innumerables consejos y gentil apoyo en la puesta en marcha de la investigación.

A los miembros del laboratorio de la Clínica Miraflores; Vannia Salazar, Jonathan Vázquez, Alessandra Ascenzo, Belén Gramaglia y Milagros Revolledo; por su apoyo constante durante los procedimientos que formaron parte de la presente investigación.

A Claudia Monge, por mantenerse a mi lado, brindarme su cariño, alegría y apoyo emocional durante la elaboración de la tesis.

TERMINOS Y ABREVIATURAS

CR	Cultivos con renovación de medio GT
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
GFF	Global ® for Fertilization Total (LifeGlobal®)
GH	<i>Global ® w/hepes total</i> (LifeGlobal)
GnRH	Hormona liberadora de la Gonadotropina
GT	Global ® Total (LifeGlobal®)
hCG	Gonadotropina coriónica humana
ICSI	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
MII	Metafase II
SR	Cultivos sin renovación de medio GT

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEORICO	11
2.1. Fecundación	11
2.2. Desarrollo embrionario y formación del blastocisto Embrionario	12
2.3. Medios de cultivo	13
2.3.1 Componentes de los medios de cultivo	13
2.3.2 Tipos de medios de cultivo	16
2.4. Incubadoras	16
2.4.1 Incubadoras <i>time-lapse</i>	17
III. ANTECEDENTES	19
IV. MATERIALES Y METODOS	24
4.1. Lugar de ejecución	24
4.2. Tipo de investigación	24
4.3. Variables	24
4.4. Muestreo	24
4.5. Procedimiento	24
4.6. Preparación del endometrio de las receptoras	29
4.7. Procesamiento de la información	29
4.8 Análisis Estadístico	30
V. RESULTADOS	31
VI. DISCUSIÓN	32
VII. CONCLUSIONES	36
IX. REFERENCIAS CITADAS	37
X. ANEXOS	43

RESUMEN

Un aspecto importante a la hora de cultivar embriones humanos, es disminuir la exposición de estos a condiciones ajenas a un desarrollo fisiológicamente normal. Para ello los medio de cultivo evolucionaron hasta llegar a un medio único que soporta el desarrollo embrionario desde su inseminación hasta la transferencia. Sin embargo, algunos protocolos de trabajo aún renuevan el medio único en el tercer día de cultivo para mantener al embrión, libre de sustancias o elementos tóxicos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de cultivar embriones hasta el estadio de blastocistos sin renovar el medio de cultivo único en el día 3. El estudio se realizó en el Laboratorio de la Clínica Miraflores durante el periodo de abril a diciembre del 2016. Se obtuvieron 589 embriones de 82 parejas sometidas a un tratamiento FIV/ICSI con ovocitos donados. Todas las parejas fueron divididas en dos grupos: Cultivos con renovación de medio y cultivos sin renovación de medio. El grupo sin renovación obtuvo una mejor tasa de embarazo positivo respecto al grupo con renovación (68.18 vs 63.16); la tasa de embarazo clínico fue mayor para el grupo sin renovación (65.91 vs 57.90). No se observó diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, el método planteado no generó ninguna disminución en la calidad del cultivo embrionario *in vitro* o las tasas de éxito del tratamiento FIV, por el contrario, podría incluso llegar a prevenir cualquier daño o alteración del desarrollo embrionario por consecuencia de la manipulación innecesaria.

Palabras clave: Embriones humanos, FIV, ICSI, medio de cultivo.

ABSTRACT

An important aspect in the human embryo culture is to decrease the exposure to physiologically abnormal developmental conditions. In order to do this, the media culture evolved until arriving at a unique media that supports the embryonic development from its insemination until the transference. However, some protocols of work still renew the unique medium on the third day of culture to keep the embryo, for free of toxic substances or elements. The aim of this research was based on the effect of the effect of growing embryos to the stage of blastocysts without renewing the unique culture medium on day 3. The study was conducted at the Laboratory of the *Clínica Miraflores* during the period from april to december 2016. 589 embryos were obtained from 82 couples undergoing IVF / ICSI treatment with donated oocytes. All the couples were divided into two groups: Cultures with medium renewal and cultures without medium renewal. The group without renewal had a better positive pregnancy rate than the group with renewal (68.18 vs 63.16); the clinical pregnancy rate was higher for the non-renewal group (65.91 vs. 57.90). No statistically significant differences were observed for any of the parameters evaluated. However, the raised method did not generate any decrease in embryo culture quality *in vitro* or the success rates of IVF treatment, on the contrary it may even come to prevent any damage or alteration of embryonic development by the consequence of unnecessary manipulation.

Keywords: Human embryos, IVF, ICSI, culture medium.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los puntos clave dentro de un programa de fecundación *in vitro*, es el momento de seleccionar al mejor embrión para transferir, generalmente todo el cultivo converge en este momento. Pero para poder llegar a éste punto la cohorte embrionaria tiene que pasar por una serie de situaciones que pueden comprometer su desarrollo e incluso su viabilidad. Una de las más destacables son las condiciones ambientales a las que estarán sometidos durante los días que dure el cultivo embrionario. Para seleccionar al mejor embrión los biólogos suelen hacer un seguimiento diario de estos, y es que la evaluación morfológica es la principal herramienta que poseen para llevar a cabo esta selección, no obstante esta serie de actividades implican remover al embrión de su ambiente controlado en las incubadoras y exponerlos por breves periodos de tiempo a condiciones incompatibles con su desarrollo.

Los medios de cultivo han ido evolucionando desde el cultivo de células somáticas hasta su adaptación para cultivos embrionarios humanos con medios secuenciales y más recientemente el medio de cultivo único. Los medios secuenciales se basan en que el embrión tiene diferentes requerimientos para su metabolismo antes y después de la activación de su genoma, por ello estos medios en su gran mayoría comerciales están diseñados para ser renovados en el día 3 de cultivo momento de la compactación del embrión. A diferencia de los medios secuenciales los cultivos de medio único fueron diseñados para que el embrión pueda tomar lo que necesita del medio independientemente del momento o estadio en que se encuentre, esto supone que el medio contiene todos los elementos requeridos por el embrión desde el primer hasta el último día de cultivo. Los laboratorios hoy en día buscan extender los cultivos hasta el estadio de blastocisto, ya que estos suelen estar relacionados con un mayor potencial de implantación, debido a la sincronía que existe entre el blastocisto y el endometrio.

A pesar del éxito de los cultivos de medio único muchos laboratorios continúan haciendo renovación del medio en el día 3 para evitar la exposición a las

sustancias tóxicas para los embriones como los amonios, producto de la descomposición de aminoácidos o compuestos volátiles atmosféricos. Sumada a la renovación en el día 3 se expone a los embriones a condiciones ambientales que no están acorde con el desarrollo natural del embrión, con la finalidad de valorar su calidad morfológica.

En general, hay estudios que demuestran que evitar estos cambios ambientales a los embriones suele tener efectos positivos dentro del tratamiento de reproducción asistida, específicamente en la tasa de desarrollo a blastocisto y la tasa de embarazo, pero en su mayoría están vinculados a tecnologías muy costosas como el cultivo embrionario en incubadoras con la tecnología *time-lapse*, que nos ofrece una evaluación morfocinética desde el inicio del cultivo embrionario hasta el momento de la transferencia sin retirar la placa de cultivo de la incubadora. Probar que esta forma de trabajo puede ser imitada con incubadoras tradicionales y darnos resultados próximos o similares representaría un gran aporte a los laboratorios de reproducción asistida que, con un gasto menor, podrían brindar mejores resultados a los pacientes que se someten a un tratamiento de reproducción asistida. Por ello, el presente estudio tiene como propósito el evaluar el efecto de cultivar embriones hasta el estadio de blastocistos sin renovar el medio de cultivo único en el día 3.

II. MARCO TEORICO

2.1. FECUNDACIÓN

La fecundación en la especie humana se produce en la región ampullar de la trompa de Falopio. Una vez fecundado, el ovocito es transportado a través de la trompa hasta el útero tardando en llegar entre 3 a 5 días. Durante éstos días el embrión se nutre de sus propias células del complejo cumulo-corona y de secreciones tubáricas procedentes del epitelio tubárico. La Fecundación *in vitro* promueve el estudio de éstos procesos embrionarios tempranos. Aunque parece que lo que ocurre *in vitro* es muy similar a lo que sucede *in vivo*, la velocidad de desarrollo del embrión humano *in vitro* parece que es más lenta que *in vivo*, debido principalmente a las propias condiciones *in vitro*. También se sabe que un gran número de embriones *in vitro* se bloquearán en el estadio de 4-8 células. Este bloqueo ocurre generalmente coincidiendo con la puesta en funcionamiento del propio mecanismo de activación del genoma embrionario (Calderón *et al*, 2002).

La capacitación espermática representa todos los cambios estructurales por los que tiene que pasar el espermatozoide antes de poder fecundar al ovocito. Para que este evento se lleve a cabo el espermatozoide debe estar libre de plasma seminal, lo que puede llevarse a cabo, bien *in vivo*, durante su paseo a través del tracto genital, o bien *in vitro* mediante la selección previa de los espermatozoides (*swing-up* o gradiente de *Percoll*) e incubación en un medio de cultivo apropiado con una concentración suficiente de iones de calcio (Yanagimachi y Usui, 1974) (Mortimer *et al*, 1989).

Durante la capacitación, la membrana sufre una serie de cambios importantes, tales como pérdida de proteínas o sustitución por otras de menor peso molecular, transformación de los fosfolípidos, disminución de la relación colesterol/fosfolípidos, cambios en los radicales glucídicos de las glucoproteínas o de los glucolípidos, pérdida de glúcidos complejos, y movilidad de los lípidos y proteínas (Fournier y Thibault, 1990). Estos cambios en la membrana plasmática van a permitir otras etapas fundamentales de la

fecundación como la Hiperactivación espermática, unión específica, penetración a la zona y fusión.

2.2. DESARROLLO EMBRIONARIO Y FORMACION DEL BLASTOCISTO

Una vez concluida la fertilización, el cigoto inicia su división mitótica, la cual concluye aproximadamente 24 horas después. Como resultado de esta división se obtienen dos células, denominadas blastómeras, cada una de aproximadamente la mitad de tamaño del cigoto; estos dos blastómeros se encuentran aun dentro de la zona pelúcida. Sin dar tiempo al crecimiento de los blastómeros, cada uno de ellos entra nuevamente en mitosis, aunque no forzosamente al mismo tiempo; esta segunda mitosis termina entre 36 y 40 horas después de la fertilización. 48 horas después empieza otra mitosis que termina con la formación de 8 blastómeras (Arteaga y García, 2013).

Al principio del estadio de ocho células, los embriones de los mamíferos placentarios entran en una fase llamada de compactación, en cuyo desarrollo las blastómeras más externas se adhieren íntimamente entre sí mediante uniones en hendidura o nexos y uniones estrechas, perdiendo su identidad individual cuando se las observa desde la superficie. La compactación está mediada por la concentración de moléculas de adhesión celular activadas por el calcio (Ca^{++}), como la E-Cadherina, en un anillo alrededor de la superficie apical de las blastómeras. La actividad de un sistema de transporte de sodio (Na^+) basado en la Na^+ , K^+ -adenosina trifosfatasa (ATPasa) permite que el Na^+ y el agua (H_2O) atraviesen las blastómeras externas que constituyen una especie de epitelio y se acumulen en los espacios que dejan las blastómeras internas. Este proceso, que tiene lugar unos 4 días después de la fecundación, se llama cavitación, y el espacio lleno de líquido recibe el nombre de blastocele. En esta fase, el embrión en conjunto se denomina blastocisto (Carlson, 2014). La compactación es un signo de activación del genoma embrionario (Gardner, 1989).

En el período de blastocisto, el embrión, que aún está rodeado de la membrana pelúcida, consta de dos tipos de células: una capa epitelial externa

(el trofoblasto), que rodea a un pequeño grupo interno llamado masa celular interna. Las células de la masa interna darán origen al cuerpo mismo del embrión y además a varias estructuras extraembrionarias, mientras que las células del trofoblasto sólo formarán estructuras extraembrionarias, incluidas las capas más externas de la placenta (Carlson, 2014).

Mientras el embrión se está moviendo a través de la trompa de Falopio hacia el útero, el blastocisto se expande dentro de la zona pelúcida. Durante este tiempo, la zona pelúcida evita que el blastocisto se adhiera a las paredes de la trompa. Sin embargo, cuando el embrión alcanza el útero debe eclosionar desde la zona pelúcida de modo tal que pueda adherirse a la pared uterina. Una vez fuera de la zona, el blastocisto puede hacer contacto directo con el útero (Gilbert, 2003).

2.3. MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1 Componentes de los medios de cultivo

- **Glucosa**

Los estudios sobre el ratón, el hámster, el ovino y el humano han demostrado que un alto nivel de glucosa en el cultivo es responsable del retraso o detención del desarrollo de embriones en clivaje. Sin embargo, estas observaciones parecen contradecir la situación in vivo donde la glucosa está presente en el tracto reproductivo y el ovocito y el embrión tienen transportadores de glucosa en todas las etapas de desarrollo. Esta aparente toxicidad de la glucosa parece manifestarse en los medios que contienen fosfato y típicamente carecen de aminoácidos. Los embriones cultivados en presencia de altos niveles de glucosa y fosfato tenían capacidad respiratoria reducida, y la función mitocondrial disminuida. Esta reducción en el control metabólico culminó en la pérdida de la producción de ATP y, por tanto, en la detención del desarrollo. Posteriormente, se han diseñado varios medios de cultivo para soportar el embrión en etapa de clivaje, en el que tanto la glucosa

sola como la glucosa y el fosfato se eliminaron de la formulación (Lane y Gardner, 2007).

Varios estudios han demostrado que los efectos producidos por la glucosa en presencia de fosfato pueden mitigarse por la adición de aminoácidos, EDTA o vitaminas (Gardner y Lane, 1996). La adición de estos elementos al medio de cultivo que contiene Glucosa y Fosfato ayudan a prevenir la pérdida de la respiración y control metabólico, por lo tanto, los embriones pueden mantener un metabolismo más normal y una producción de ATP adecuada para el desarrollo embrionario. Además, se determinó que la falta de glucosa en los medios para el estadio de post-compactación resultó en un desarrollo alterado hacia el estadio de blastocisto y una pérdida de viabilidad (Gardner y Lane, 1996) (Martin y Leese, 1995). Parece ser que el efecto inhibitorio de la glucosa es un artefacto propio del cultivo *in vitro* por falta de otros reguladores importantes en el medio.

- **Aminoácidos**

El oviducto y los fluidos uterinos contienen niveles significativos de aminoácidos libres (Miller y Schultz, 1987), mientras que los ovocitos y embriones poseen sistemas de transporte específicos para mantener la estabilidad endógena de los aminoácidos (Schultz *et al*, 1981). Se sabe que, los aminoácidos son absorbidos y metabolizados fácilmente por los embriones y que este proceso fisiológico es sumamente importante para el desarrollo pre y perimplantacional del embrión. Los aminoácidos tienen muchos papeles importantes en los medios de cultivo, incluyendo quelantes, osmolitos, buffer de pH, antioxidantes, reguladores de metabolismo energético, precursores biosintéticos y sustratos energéticos (Gardner y Lane, 1997).

La utilización de aminoácidos durante el desarrollo embrionario cambia desde la etapa pre-compactación hasta la etapa post-compactación. Después que el embrión alcanza el estadio de 8 células, la presencia de aminoácidos aumenta (esenciales y no esenciales) en el fluido del oviducto, incrementando las tasas de clivaje y viabilidad (Lane y Gardner, 1997) (Steeves y Garner,

1999). El incremento, de aminoácidos no esenciales, promueve la formación de blastocele y la eclosión, mientras que los aminoácidos clasificados como aminoácidos esenciales son necesarios para el desarrollo y la viabilidad de la masa celular interna (Lane y Gardner, 1994).

- **Amonio**

Una de las consecuencias de tener aminoácidos, particularmente glutamina, en el medio de cultivo es que se descomponen a 37°C para producir amonio, los cuales pueden ser inhibidores del desarrollo embrionario (Lane y Gardner, 2003) (Gardner y Lane, 1993). La presencia de amonio en el medio de cultivo puede afectar la viabilidad de blastómeras y la formación de los blastocistos, incluso la presencia moderada de niveles de amonio (300uM) afectan directamente la capacidad implantatoria de los embriones (Zander *et al*, 2006) (Gardner y Lane, 1993) (Lane y Gardner, 2003). Para contrarrestar la acumulación problemática de amonio en los medios de cultivo, se ha sustituido el aminoácido glutamina por alanil-Glutamina o glicil-glutamina, ya que el uso de medios que contienen glutamina da como resultado niveles significativos de acumulación de amonio, aun cuando el medio se cambia cada 24 horas (Lane y Gardner, 2007).

- **EDTA**

La adición de EDTA, como agente quelante, a los medios de cultivo ha demostrado tener importancia en el desarrollo embrionario, específicamente en las etapas pre-compactación, ya que hay reportes que indican que los embriones post-compactación cultivados en 10uM de EDTA reducen el desarrollo de la masa celular interna y desarrollo fetal después de la transferencia (Gardner y Lane, 2000) (Gardner y Lane, 1996). Una posible explicación del efecto bifásico de la EDTA puede ser debido a sus efectos en la inhibición de quinasas citosólicas como la 3-fosfoglicerato quinasa, que en concentraciones menores a 10mM de EDTA puede impedir la glucólisis. La masa celular interna del blastocisto usa la glucólisis como fuente energética.

Es por este motivo que los medios diseñados para cultivos post-compactación omitieron la presencia de EDTA en su formulación (Behr *et al*, 1999).

2.3.2. Tipos de medio de cultivo

Existen dos propuestas que han sido utilizadas para determinar las concentraciones de los medios de cultivo: El principio “de regreso a lo natural” y el principio “dejar que el embrión elija” (Summers y Biggers, 2003). El primero refiere a los cultivos secuenciales (dos pasos), donde los cigotos son cultivados hasta el estadio de clivaje en día 3, para luego ser transferidos a un medio distinto hasta el estadio de blastocisto. La composición de cada medio secuencial toma como referencia la asunción que los embriones están naturalmente expuestos a diferentes nutrientes en la trompa uterina y en el útero, por lo tanto son necesarios distintos componentes y concentraciones para su desarrollo. El segundo principio representa el medio único o también llamado monocultivo, el cual permite cultivar los embriones en un solo medio (un paso) desde el estadio de cigoto hasta blastocisto, de forma ininterrumpida o cambiando aun medio fresco del mismo tipo en el día 3 (Noriega *et al*. 2013).

Los argumentos a favor de los medios secuenciales se han centrado en cuatro áreas: El requerimiento energético diferencial del embrión post-compactación y el efecto inhibitorio de la glucosa en los estadios de clivaje, el efecto inhibitorio de la EDTA sobre el desarrollo de la masa celular interna del blastocisto, la acumulación de amonio producto de la Glutamina y el rol de los aminoácidos en el desarrollo embrionario (Noriega *et al*. 2013). Por otro lado, el medio único también tiene sus limitaciones, ya que si los bioensayos fueran realizados a diferentes dosis entre cada componente, se necesitaría un numero enorme de pruebas para encontrar las mejores condiciones para el desarrollo embrionario (Summers y Biggers, 2003).

2.4. INCUBADORAS

El objetivo de las incubadoras es mantener un ambiente con calidad de aire y una concentración de gases óptimo, manteniendo así un pH y temperatura adecuados para asegurar el correcto desarrollo embrionario. Normalmente la

temperatura durante un cultivo se encuentra alrededor de 37°C; sin embargo, se ha demostrado que mantener una temperatura menor a 37°C es mejor para las tasas de embarazo (Higdon *et al*, 2008).

El pH de los medios de cultivo es mantenido por medio del tampón Bicarbonato; de tal manera que funciona por el balance entre el anión de bicarbonato del medio y el ácido carbónico obtenido del CO₂ que se inyecta en forma de gas. Por esta razón, la concentración de este gas debe ser controlada para asegurar una presión parcial de CO₂ adecuada. El balance de pH en cultivos embrionarios debe mantenerse entre 7.20 - 7.40 (Quinn, 2012) (Swain, 2012).

2.4.1. Incubadoras *Time-Lapse*

Este tipo de incubadoras de además de tener los beneficios de las tradicionales, poseen un método de monitorización del desarrollo embrionario en tiempo real, mediante el uso de técnicas de fotografía a intervalos de tiempo de 5 minutos, formando un video con la totalidad de las imágenes tomadas (*time-lapse*). Cultivar con este sistema brinda una vigilancia permanente no invasiva, ya que no requiere manipulación de ningún tipo al embrión por parte del biólogo. De esta manera, si el laboratorio utiliza un medio único, podría dejarlo en cultivo sin necesidad de cambiarlo durante los 3 o 5 días de cultivo. Así, las perturbaciones serán mínimas, no se experimentan cambios de pH ni de temperatura en el medio, lo que beneficiaría el desarrollo embrionario (Noriega *et al.* 2013).

A partir de la observación continua de los embriones, se han logrado determinar tres momentos clave en el desarrollo embrionario que ocurren antes del día 3 y que permitirían predecir que embriones tienen 93% de probabilidades de llegar a blastocisto. El primer punto es el tiempo de la primera citocinesis, la que debe durar 15 minutos. El segundo punto es el tiempo entre la primera y segunda división mitótica (aparición de la tercera blastómera), que tomaría 11 horas. El último punto es el tiempo entre la segunda y tercera mitosis (aparición de la cuarta blastómera), que debe ocurrir

en una hora (Wong *et al*, 2010). Esta evaluación en tiempo real de los estadios tempranos del desarrollo permitirían realizar la transferencia embrionaria en día 3, ya que se podría predecir cuál es el mejor embrión, sin necesidad de llevar el cultivo a blastocisto (Noriega *et al*. 2013).

III. ANTECEDENTES

Cohen et al. (1997) demostró que existen ciertos elementos como compuestos volátiles orgánicos dentro y algunos alcoholes que pueden ser absorbidos por el medio de cultivo a través del aceite mineral, lo cual afecta y compromete directamente el desarrollo embrionario. Esto puede ser controlado instalando filtros de permanganato de potasio y filtros HEPA dentro y fuera de las incubador.

Gardner *et al.* (1998) determinó que transferir embriones en día 5, cultivándolos en medios secuenciales, resulta en un incremento de la tasa de implantación cuando es comparada con embriones transferidos en día 3. De esta manera demostró que era posible obtener blastocistos humanos viables en medios de cultivo secuencial, permitiendo altas tasas de implantación con menos embriones transferidos, minimizando el riesgo de gestación múltiple.

Milki *et al.* (2000) también comparo las tasas de implantación y embarazo logradas con transferencias de blastocistos y embriones en clivaje, siendo el grupo de las pacientes transferidas en estadio de blastocitos las que mostraron mejores tasas de implantación y embarazo, ya que hace mención que estos resultados son posibles gracias a la sincronía que existe entre el blastocisto y el endometrio.

Blake *et al.* (2007) realizo transferencias embrionarias con el fin de evaluar si estas afectan la tasa de nacidos vivos cuando se comparan con las transferencias de embriones en estado de clivaje. Su revisión muestra que existe una diferencia significativa en las tasas de embarazo y nacidos vivos a favor de la transferencia de blastocistos (29.4% versus 36%), su estudio fue realizado con pacientes de buen pronóstico para evitar cualquier posible factor intrínseco que pudiera sesgar los resultados.

Sepulveda *et al.* (2011) comprobó que extender el cultivo embrionario a blastocisto puede ser implementado en un programa de reproducción asistida, a fin de incrementar la probabilidad de embarazo en pacientes, ya que de esta

forma se hace una selección natural durante el cultivo embrionario, debido a que, los embriones menos capaces no alcanzaran el estadio de blastocisto y detendrán su desarrollo. Todo su desarrollo lo hizo con un medio único de cultivo (Global ® médium) y renovando el medio en día 3.

Macklon *et al.* (2002) evaluó 2 tipos de sistemas de cultivo, los secuenciales y los monocultivo o cultivos únicos. Estos medios fueron desarrollados en función a la naturaleza dinámica del metabolismo embrionario y puestos a disposición del mercado para su uso en laboratorios de reproducción. Los resultados obtenidos de su estudio muestran que no existe ninguna diferencia significativa para los dos sistemas de cultivo embrionario cuando se evaluó tasas de desarrollo a blastocisto, implantación o embarazo.

Hardy *et al.* (1989b) esclarece que los medios secuenciales se basan en el consumo energético de los embriones en sus diferentes etapas de desarrollo. Para esto el diseño va, del Piruvato para embriones en clivaje cuando el consumo de oxígeno es bajo, a la glucosa para satisfacer las grandes necesidades energéticas que implica el desarrollo hasta la etapa de blastocisto.

El cultivo con un medio único se basa en que las necesidades del embrión deben ser manejadas por estos, para ello todos los nutrientes necesarios para su desarrollo se encuentran incluidos en el medio. Este tipo de cultivos han mostrado resultados favorables respecto a los medios secuenciales, no solo mostrando mejoras sobre las tasas de embarazo sino también sobre la calidad y cantidad de los Blastocistos obtenidos (Sepúlveda *et al.*, 2009; Biggers y Racowsky, 2002; Macklon *et al.*, 2002).

Dieamant *et al.* (2016) realizó un meta análisis donde comparó 5 ensayos controlados aleatorios con la intención de buscar cual es el mejor medio de cultivo entre estos dos tipos (secuencial y medio único) y llegó a la conclusión de que no había ninguna ventaja o mejora significativa de los cultivos con medio único sobre los medios de cultivo secuenciales. No obstante, también concluye que existen escasos estudios sobre este tema.

Vermilyea *et al.* (2011) utilizó medios únicos para el cultivo embrionario y planteo la opción de no renovar el medio en día 3 manteniéndolo hasta el día 5 o 6 de desarrollo. Esto mostro resultados favorables para el cultivo extendido a blastocitos con respecto a los medios secuenciales mejorando la tasa de desarrollo a blastocisto.

Vermilyea *et al.* (2012) comprobó que la tasas de embarazo clínico por transferencia de embriones cultivados en medio único fue mayor que los obtenidos en cultivos secuenciales. Además, encontró que la tasa de transferencias en estadio de blastocisto y formación de blastocistos fue significativamente mayor en medios únicos, refutando la creencia que los sistemas de cultivo secuenciales son mejores para el desarrollo a blastocisto.

Reed *et al.* (2009) cultivó 890 embriones humanos provenientes de 80 ciclos de Fecundación *in vitro* para comprobar si existía alguna diferencia en los sistemas de cultivo ininterrumpido y secuencial. Sus resultados no encontraron diferencias significativas entre estos sistemas para la calidad del embrión. Sin embargo, para la transferencia de embriones en día 5 se dispuso de un mayor número de blastocistos en el grupo cultivado en medio único sin renovación. Tampoco encontró significancia para las tasas de embarazo.

Meseguer *et al.* (2012) Observó que los cultivos únicos sin renovación favorecen el potencial implantatorio de los embriones cultivados en incubadoras con el sistema de monitoreo Time-lapse, los cuales no necesitan ser retirados del incubador para valorar su morfología, debido a que el mismo incubadora toma fotografías en intervalos de tiempo predeterminados, permitiendo hacer una evaluación morfocinética de los embriones a lo largo de su desarrollo. Singh *et al.* (2012) realizó un estudio similar en incubadoras tradicionales, encontrando solo un efecto positivo sobre la tasa de desarrollo a blastocisto.

El monitoreo continuo por Time-lapse supone una herramienta novedosa para los tratamientos de reproducción asistida, ya que existen parámetros morfológicos durante el desarrollo embrionario que aún no están siendo

estudiados y que pueden ser usados como marcadores de calidad embrionaria que no se observaban antes en las evaluaciones estáticas que hacían los biólogos al retirar las placas de cultivo del incubador (Kirkegaard *et al.*, 2012).

Rambhia y Desai (2014) realizaron un estudio en el cual compararon dos métodos de cultivo, con y sin renovación de medio único, en incubadoras Embryoscope®, los cuales incorporado el sistema de monitoreo time-lapse. Este estudio no encontró diferencias significativas para ninguno de sus parámetros evaluados como tasa de embarazo e implantación. Sin embargo, la tasa de blastulación fue significativamente mayor en cultivos sin renovación.

Costa-Borges *et al.* (2016) utilizando la incubadoras con la tecnología time-lapse determinó que es posible cultivar embriones humanos de manera continua del día 0 al 5 o 6 sin renovar el medio. Esta estrategia no afectó la morfogénesis embrionaria o desarrollo a blastocisto, ofreciendo condiciones de cultivo más estables, así como ventajas prácticas y costos reducidos para el laboratorio.

Singh *et al.* (2012) observó que mediante la eliminación de la renovación del medio único en día 3 minimiza significativamente el riesgo de accidentes o errores en la manipulación de embriones, exposición a fluctuaciones de temperatura y pH y contaminación del medio de cultivo.

Bronet y Agudo (2017) sugieren que para tener una mayor cantidad de blastocistos disponibles en el cultivo es mejor no revisar los embriones durante los días que dure éste, dando una mayor posibilidad a la paciente de quedar embarazada, ya que tendrá más embriones disponibles para seleccionar el más apto. Lógicamente para esto el laboratorio debería estar en la facultad llevar sus cultivos hasta el estadio de blastocisto.

Xie *et al.* (2007) observó que el pipeteado de los embriones, procedimiento necesario para trasplantar los embriones de una placa de cultivo a otra, genera estrés por cizallamiento, el cual está reportado induce la fosforilación de la

proteína quinasa, que una vez activada por estrés, es causal de apoptosis en las células embrionarias.

Velez de la Calle *et al.* (2013) concluye en su estudio que la tasas de formación de blastocistos disponibles para la transferencia y vitrificación usando un sistema de cultivo sin renovación es mejor que cultivando los embriones en medios de cultivo secuencial, aunque las tasas de embarazo clínico no muestra diferentes significativas. También menciona que evitar la manipulación de embriones podría reducir el riesgo potencial de alteraciones epigenéticas.

Respecto al ambiente, De los Santos (2001) esclarea que un buen laboratorio de reproducción asistida debería tener controles de calidad bastante minuciosos, sugiriendo que las comprobaciones del correcto funcionamiento de equipos no solo se deben reducir a sus calibraciones sino también a sus verificaciones y registros diarios, y así poder reconocer cualquier alteración o problema que pueda surgir durante el funcionamiento del laboratorio. Ramstorp M (2016), plantea el uso de los sistemas *cleanroom* para obtener un sistema de purificación de aire óptimo, minimizando la contaminación dentro del laboratorio y evitando el ingreso de partículas aplicando presión positiva a través del túnel de ventilación.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Lugar de ejecución

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Reproducción Asistida (Andrología y Embriología) de la Clínica Miraflores SAC en coordinación con el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma (anexo n°1: autorización de la clínica).

4.2. Tipo de investigación

La investigación es de naturaleza correlacional. Para la determinación del efecto de cultivar embriones sin renovación de medio de cultivo único en día 3 se comparó con el grupo al que si se le realizo renovación de medio.

4.3. Variables

Las variables independientes son los dos tipos de grupos con renovación y sin renovación de medio de cultivo único en día 3. Las variables dependientes serán las tasas de: embarazo bioquímico, embarazo clínico y tasa de desarrollo a blastocisto.

4.4. Muestreo

Se utilizó un total de 589 embriones humanos los cuales fueron obtenidos de 82 parejas sometidas a un tratamiento FIV/ICSI con ovocitos donados. Todos los embriones fueron cultivados en incubadoras *K-Systems G185*® (*CooperSurgical*® *Fertility Companies*) (anexo n°2: consentimiento informado de la investigación; anexo n°3: consentimiento de ovodonación, anexo n°4 consentimiento de aceptación de óvulos donados)

4.5. Procedimiento

- **Preparación de la muestra espermática**

Todas las muestras espermáticas fueron emitidas por masturbación con una abstinencia sexual no mayor a 5 días. Una vez obtenidas las muestras se

llevaron al laboratorio de andrología de la Clínica Miraflores donde fueron procesadas para eliminar el plasma seminal y separar los espermatozoides móviles de los inmóviles y muertos. Se tomó toda la muestra espermática y se realizó una capacitación espermática centrifugando la muestra a través de la técnica de gradiente de densidad (percoll 95% y 45%) durante 20 minutos a 1200rpm. El pellet obtenido se resuspendió en *Global® for Fertilization Total* LifeGlobal® (GFF) y se envió al laboratorio de embriología.

- **Estimulación ovárica y obtención de ovocitos**

Para la estimulación ovárica se utilizó una dosis de 150 a 300 UI/día de FSH y/o HMG, durante los primeros 2 a 5 días del ciclo, de acuerdo a la edad, índice de masa corporal y respuesta a las estimulaciones previas. Cada dosis fue ajustada según la evaluación por ultrasonido, realizada a intervalos de 2 a 3 días. Por otro lado, recibieron antagonistas de la GnRH y la estimulación continuó hasta que los folículos principales alcanzaron 18 mm de diámetro. Para desencadenar la ovulación se administró gonadotropina coriónica humana (hCG) o una agonista de la GnRH, luego de 36 horas se realizó la punción ovárica. Cada receptora recibió en promedio 8 ovocitos donados.

- **Día anterior a la punción ovárica**

Un día antes de la punción ovárica, se dejó en la estufa un tubo con 5 ml de *Global® w/hepes total* LifeGlobal® (GH) y un tubo con 5 ml aceite mineral *FertiCult®* (FertiPro) a 37°C.

Se preparó una placa de mantenimiento (Falcon® 3037) con 0.8ml de GFF en el pozo central cubierto con aceite mineral y 3.0ml de GFF también cubierto con aceite mineral en la periferia de la placa.

Las placas de crecimiento o cultivo embrionario (Falcon® 3036) fueron preparadas con 10 gotas de µL de *Global® total* LifeGlobal® (GT) y cubiertas con 10 ml de aceite mineral. En estas placas los ovocitos fecundados permanecieron del día 0 al día 3 para el grupo con renovación (CR) donde posteriormente fueron traspasados a otra placa con las mismas

características para continuar su desarrollo hasta el día 5 de cultivo. El grupo que se cultivó sin renovación (SR) de medio de GT permaneció desde el día 0 al 5 sin renovación de medio en día 3. Estas placas de cultivo embrionario fueron mantenidas a 37°C, 5.5% de CO₂ y 5% de O₂.

- **Recepción de ovocitos**

El día de la aspiración se colocó a precalentar (37°C), al menos 15 minutos antes, placas de aspiración (Falcon ® 1029) y 1 placa para la recepción de los ovocitos capturados (Falcon ® 1007). Además se precalentó tubos (Falcon ® 2057) para la aspiración del líquido folicular, la cantidad de estos fue dependiente del número de folículos con los que llegó la donante.

En la placa de recepción de ovocitos se colocó 5 ml de GH y sobre éste 5 ml de aceite mineral. Al recibir los tubos con el líquido folicular, estos fueron vertidos sobre las placas de aspiración en busca del complejo Cumulo-corona-ovocito. Los ovocitos recuperados fueron trasladados a la placa de recepción hasta el final de la punción ovárica.

Una vez terminada la punción ovárica se cortaron los cúmulos que tenían remanentes de sangre o tejidos con ayuda de dos jeringas de tuberculina y una vez cortados se colocaron en la placa de mantenimiento y se esperó de 4 a 5 horas dentro de la incubadora a 37°C, 5.5% de CO₂ y 5% de O₂ antes de su inseminación por FIV o ICSI.

- **Fecundación *in vitro* convencional**

Los ovocitos fueron inseminados a las 5 horas post-punción con la muestra preparada en el laboratorio de andrología. Para la inseminación, se ajustó la concentración espermática en el medio de cultivo utilizando la siguiente fórmula (Remohí J., *et al.* 2008):

$$X_{\mu L} = \frac{(Volumen\ final) \left(90 - 100 \times 10^4 \frac{esp.\ moviles}{ml} \right) \text{ valores de interes}}{\frac{esp.\ móviles}{ml} \text{ en la muestra procesada}}$$

El resultado obtenido X μ L será el volumen que tomaremos de la muestra preparada en el laboratorio de andrología. La concentración utilizada fue entre 90-100 mil espermatozoides por mililitro. Una vez que los ovocitos fueron inseminados se colocaron dentro de la incubadora a 37°C, 5.5% de CO₂ y 5% de O₂ hasta la evaluación de la fecundación alrededor de la hora 17 post-inseminación.

- **Inyección intra-citoplasmática del espermatozoide (ICSI)**

Alrededor de la 4ta hora de cultivo, post-punción, se preparó una placa de desnudación de ovocitos con 3 gotas de 100 μ L de GH y 2 gotas de 50 μ L de *Hialuronidasa* (FertiPro®) cubiertas con 9ml de aceite mineral. Esta placa fue colocada sobre una superficie platina calefactora para que se mantenga a 37°C.

Una vez transcurridos los 20 minutos de precalentado de la placa de desnudación de ovocitos, estos se colocaron dentro de la gota de hialuronidasa por no más de 10 segundos, y luego fueron pasados a las gotas de GH utilizando pipetas de calibres progresivamente menores hasta llegar a un diámetro de 140 μ m.

Los ovocitos desnudados, fueron clasificados según su grado de maduración. Todos los ovocitos en Metafase II (MII) fueron guardados en la placa de mantenimiento dentro de la incubadora 37°C, 5.5% de CO₂ y 5% de O₂ hasta el momento de la inyección.

La inyección se realizó a las 5 horas post-punción. Para esto se preparó 15 minutos antes una placa para la microinyección (Falcon® 1006) con una gota de 5 μ l de PVP (Origio®) y alrededor de esta gota se colocó 4 gotas de 5 μ l de GH, todo esto cubierto con 4ml de aceite mineral.

Se colocó las micropipetas en los brazos de los micromanipuladores (*Integra 3*® Research Instrument) acoplados en el microscopio invertido (*Nikon Ti-u*, *Nikon TE-300*). Una micropipeta para microinyectar (MIC-SLM-35 Origio®) y

otra para sujetar el ovocito durante la microinyección (K-HPIP-3330 COOK Medical®).

Los ovocitos en MII fueron colocados en las gotas de GH y en otra de las gotas se colocó la muestra preparada en el laboratorio de andrología. Una vez fueron capturados e inmovilizados, se les fracturó la cola con ayuda de la micropipeta ICSI y fueron microinyectados dentro de los ovocitos. Al final de la ICSI los ovocitos fueron colocados en una placa de crecimiento o cultivo.

- **Evaluación de fecundación**

La fecundación fue revisada a las 17-20 horas post-inseminación. Se consideraron para el estudio los ovocitos fecundados con dos pronúcleos. Los ovocitos que presentaban 1, 3 o más pronúcleos fueron excluidos del estudio.

- **Valoración de los embriones en clivaje**

Los embriones que fueron valorados en el tercer día de cultivo (grupo CR) se clasificaron según sus aspectos morfológicos, que incluían: número de blastómeros, grado de fragmentación y simetría entre blastómeras. Para llevar a cabo este procedimiento fueron retirados de la incubadora por breves segundos.

- **Valoración de blastocistos y transferencia intrauterina**

La selección del embrión se realizó en función al blastocisto que estaba evolutivamente más avanzado dentro de la cohorte embrionaria. Se utilizó el criterio de valoración embrionaria del *Cuaderno de Embriología Clínica de Asebir* (Hurtado de Mendoza, M.V. y Ten J., 2015). No se transfirieron más de 2 embriones por paciente. Los blastocistos restantes, que no mostraron signos de detención o mala calidad, fueron vitrificados.

Los blastocistos seleccionados para ser transferidos fueron cargados en una cánula de transferencia (*Labotech* ®) y depositados dentro del útero de la receptora.

4.6. Preparación del endometrio de las receptoras

Todas las pacientes fueron tratadas con terapia hormonal de reemplazo el ciclo anterior a la transferencia. A partir del día 15 se adicionó a la terapia 3.75mg de Acetato de Leuprolide vía intramuscular. Al 2do día del ciclo de la transferencia se comenzó a administrar 6mg diarios de Valerato de estradiol vía oral. Para el soporte lúteo se administró 800 mg/día de progesterona micronizada vía vaginal.

4.7. Procesamiento de la información

- **Evaluación del resultado del procedimiento**

Luego de 12 días de la transferencia embrionaria la paciente se realizó una prueba de β -hCG para evaluar si el resultado del procedimiento *in vitro* había sido positivo. Los resultados por debajo de 5 unidades de β -hCG fueron considerados como embarazo negativo. La prueba se repitió a los 3 días para verificar si el embarazo mantiene un ritmo normal. El resultado positivo de esta prueba fue llamado embarazo bioquímico o embarazo positivo.

A las 5 semanas de la transferencia embrionaria se verificó la presencia de saco gestacional con actividad cardiaca, considerándose desde este momento como un embarazo clínico.

- **Criterios de exclusión**

Todos los casos fueron realizados con ovocitos donados. Se consideró como criterio de exclusión cuando la muestra espermática presentaba los siguientes parámetros alterados: movilidad, concentración y morfología. Además, se excluyeron de la investigación todas las muestras que habían sido congeladas previamente.

Todas las parejas que presentaban enfermedades infecciosas fueron excluidas de la investigación (VIH, Hepatitis C, Hepatitis B, VDRL).

4.8. Análisis Estadístico

Para el análisis de proporciones, no paramétricas, se usó la prueba *chi-cuadrado* y para la comparación de cantidades, con distribución normal, se usó la prueba *t-student*. Se consideró estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$. Para el análisis e interpretación de datos se usó el *Statistical Package for the Social Sciences 24.0* (SPSS Inc.) para Windows 10 home © 2018 *Microsoft corporation*.

V. RESULTADOS

Un total de 689 ovocitos en Metafase II procedentes de 82 parejas fueron utilizados para este estudio. Las parejas habían sido previamente divididas en dos grupos, los que serían cultivados CR (N=38) y los cultivados SR (N=44) de medio de cultivo único en día 3. No se observó diferencias significativas ($p=0.901$) entre la cantidad de ovocitos para cada grupo de la investigación; obteniendo un total de 318 ovocitos para el grupo con renovación y 371 para el grupo sin renovación (tabla N°1).

Se obtuvo un total de 589 cigotos después de la inseminación de los ovocitos, 264 en el grupo CR y 325 en el grupo SR, dando una tasa de fecundación de 82.89 ± 18.86 vs 87.00 ± 11.97 , respectivamente. 348 embriones alcanzaron el estadio de blastocisto, siendo el grupo CR el que obtuvo mayor tasa de desarrollo a blastocisto (60.79 ± 24.67 vs 58.92 ± 21.82). La tasa de desarrollo a blastocisto se obtuvo teniendo en cuenta la cantidad de cigotos conseguidos el día 1 de cultivo. Ninguno de los parámetros evaluados alcanzó significancia estadística; tasa de fecundación $p=0.256$ y tasa de desarrollo a blastocisto $p=0.269$ (tabla N° 2).

Se transfirió un total de 159 blastocistos entre ambos grupos, dando como resultado una tasa de embarazo positivo (β -hCG) de 63.16% vs 68%18% para el grupo CR y SR, respectivamente. La tasa de embarazo clínico fue de 57.89% para el grupo CR y 65.91% para el grupo SR. La cantidad de sacos gestacionales obtenidos luego de la evaluación por ultrasonografía de las pacientes embarazadas mostro un total de 36 sacos para el grupo CR y 43 sacos para el grupo SR. Con este resultado se obtuvo la tasa de implantación (teniendo en cuenta la cantidad de embriones transferidos): 47.81% vs 50.38%, para los grupos CR y SR, respectivamente. Ninguno de los parámetros evaluados mostro significancia estadística (tabla N°2).

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado con el propósito de comprobar si cultivar embriones en medio único sin renovación en día 3 ofrece mayores ventajas tanto prácticas como fisiológicas sobre el cultivo de medio único con renovación como lo descrito por Costa-Borges *et al*, (2016) y Biggers y Summers (2008). Las condiciones del laboratorio de FIV fueron mejoradas para poder controlar y extender los cultivos a blastocisto, actualizando los requerimientos básicos que menciona Cohen *et al*. (1997) que permitían manejar las condiciones artificiales a las que se ve sometido el cultivo *in vitro*, como variaciones de temperatura, luz o presión de O₂ y CO₂ y regular las sustancias ajenas a un desarrollo natural del embrión como partículas de polvo, compuestos volátiles orgánicos y desinfectantes.

Los ovocitos en estadio MII fueron evaluados con la finalidad de comparar si existía alguna diferencia entre los grupos a estudiar, al igual que lo hizo Ramphia y Desari (2014), quienes iniciaron el análisis de su estudio verificando que no existía diferencias entre la cantidad de ovocitos y cigotos (SR=318 vs CR=371) . La importancia de nuestro análisis reside en buscar si existió equidad numérica entre ambos grupos, ya que hasta ese punto, el día 0 (ICSI/FIV) y día 1 (evaluación de fecundación), no se introduce variaciones en el método de cultivo *in vitro*, sino hasta el día 3. El resultado de este análisis no mostro ninguna diferencia estadística.

La tasa de embarazo positivo y embarazo clínico obtenida en la presente investigación demostró que no existe diferencias significativas entre los grupos estudiados cuando se renovó o no el medio de cultivo único en día 3, sin embargo se pudo observar que existe una tendencia favorable hacia el grupo donde no se renovó el medio de cultivo, estos resultados guardan mucha relación con lo encontrado por Ramphia y Desai (2014) quienes compararon dos métodos de cultivo, CR y SR, en incubadores *time-lapse* y no encontraron significancia estadística para las tasas de embarazo y embarazo clínico.

Esta inclinación desfavorable del método de cultivo CR puede estar relacionado con el estrés celular generado por la manipulación de los embriones durante el pipeteo de embriones, como lo describe Xie *et al.* (2007) quienes mencionan que cuando se realiza el pipeteo de los embriones, este proceso produce la fosforilación de la enzima MAPK8/9, la cual es responsable de los niveles de estrés en cultivos de células somáticas, células placentarias y la pre-implantación del embrión. El pipeteo de los embriones es un proceso necesario al momento de pasar estos de una placa de cultivo a otra, cuando el método usado es CR.

En contraste con nuestros resultados cuando evaluamos las tasas de embarazo y embarazo clínico, Costa-Borges *et al.* (2016) no obtuvo esta misma tendencia en favor de los cultivos SR, sin embargo, en condiciones controladas y un buen sistema de purificación de aire en el laboratorio el cultivo ininterrumpido de embriones puede ser llevado a cabo con resultados exitosos. Esto nos indica que el método SR de medio de cultivo en día 3 puede ser tan bueno o mejor que el método con renovación cuando las condiciones de cultivo son correctamente controlada, como bien lo ratifica Bigger y Summer (2008) y Singh *et al.* (2012).

Cabe destacar que, a pesar de no contar con la tecnología de las incubadoras *time-lapse* en esta investigación, los resultados obtenidos respecto a la tasa de embarazo clínico, 65.91% sin renovación de medio en día 3, son similares a los obtenidos por Costa-Borges *et al.* (2016); y no muy distintos a los observados por Rambhia y Desai (2014), 69% con renovación y 76% sin renovación. Esto evidencia que los resultados alcanzados cultivando sin renovación de medio en la presente investigación se acercan a los obtenidos con la tecnología *time-lapse*, eliminando así el fuerte factor económico que implica incorporar estas incubadoras a los centros de reproducción asistida.

La tasa de desarrollo a blastocisto demostró que no existen diferencias significativas para ambos grupos estudiados, siendo ésta mayor en los casos que se realizó renovación del medio de cultivo en día 3, 60.79 vs 58.92, lo cual

difiere con los resultados obtenidos por Reed *et al* (2009) y Vermilyear *et al* (2012), en los que no sólo se exhibe un incremento en los blastocistos disponibles para transferencia, sino que también en la tasa de embarazo clínico cuando no se realiza renovación del medio de cultivo; incluso los autores como Rambhia y Desai (2014) que no encuentran diferencias significativas en las tasas de embarazo, entre ambos métodos de cultivo, si concuerdan en que la tasa de formación de blastocistos es significativamente mayor en un cultivo sin renovación de medio único sobre el cultivo con renovación en día 3. A pesar de que, los resultados obtenidos en esta investigación, respecto a la tasa de desarrollo a blastocisto, no demuestran significancia a favor de los cultivos sin renovación, lo que guarda relación con lo obtenido por Macklon *et al.* (2002), si demuestran que este método de cultivo no genera una disminución en la calidad del cultivo embrionario, llegando incluso a mejorarla en otros parámetros evaluados.

Cuando evaluamos la tasa de formación de blastocisto y comparamos los grupos CR y SR, observamos que a pesar de haber pipeteado los embriones para el traspaso de placas a medio renovado, no existe una detención significativa de los embriones en desarrollo cuando son comparados con los embriones que no se manipularon en día 3. Esto no guarda relación con lo observado por Xie *et al.* (2007), quienes mencionan que cuando los embriones son pipeteados generan fosforilación de la MAPK14, responsable de efectos como proliferación lenta, detención del ciclo celular y apoptosis.

La presente investigación no realizó evaluaciones para corroborar la introducción de elementos o sustancias contaminantes y/o nocivas al cultivo, ya que como refiere Reed *et al.* (2009) aplicar el método sin renovación de medio en el día 3 previene estos eventos. Tampoco se realizó evaluaciones para medir el nivel de estrés que se genera al pipetear los embriones durante el recambio de medio de cultivo de una placa a otra, como sí lo hicieron Xie *et al.* (2007), quienes encontraron que al realizar el pipeteado de los embriones induce la activación por estrés de proteínas Jun quinasa (MAPK8/9 y MAPK14). A pesar que, la presente investigación omite de estas

evaluaciones, ya que podrían considerarse implícitas debido a la relación que existe entre los eventos descritos con los controles de calidad en el laboratorio y la manipulación de embriones, se obtuvieron mejores resultados con el grupo sin renovación, y esto puede ser debido a que no se realiza manipulación o exposiciones innecesarias de los embriones, evitando así cualquier riesgo de generar alteraciones epigenéticas (Velez de la Calle *et al.*, 2013).

En esta investigación se pudo determinar que existen otros factores que se ven beneficiados con este método de cultivo, como: el factor económico y el de las horas trabajadas por el personal del laboratorio (biólogos), este beneficio significó un ahorro del 7% del precio/costo del tratamiento, en un centro como Clínica Miraflores este ahorro puede traducirse en cifras que ascienden de 100,000.00 a 150,000.00 soles al año. Además, disminuir el tiempo de trabajo del personal disminuye la contaminación en el laboratorio, ya que se sabe que el nivel de partículas suspendidas de polvo en el ambiente del laboratorio está relacionada con el nivel de actividad en el laboratorio durante los procedimientos de reproducción asistida (Ramstorp, 2016; De los Santos, 2001).

VII. CONCLUSIONES

- Las tasas de embarazo clínico y embarazo positivo, no presentan ninguna diferencia significativa entre los grupos estudiados.
- La tasa de desarrollo a blastocito, no presenta ninguna alteración significativa durante el cultivo embrionario.
- Evitar la renovación de medio Global ® Total durante el tercer día de cultivo *in vitro* de embriones humanos no genera ningún efecto negativo sobre las tasas de éxito del tratamiento de reproducción asistida.
- El cultivo ininterrumpido de embriones humanos es una alternativa notable para la mejoría no sólo de las tasas de embarazo e implantación, sino que también para la economía del laboratorio de reproducción asistida.

IX. REFERENCIAS CITADAS

1. Arteaga S; Garcia M. (2013). Cap. 7: Desarrollo embrionario presomitico: La primera semana. En: Embriología Humana y Biología del desarrollo. Editorial Medica Panamericana. Pp: 83-91.
2. Behr B, Pool TB, Milki AA (1999). Preliminary clinical experience with human blastocyst development *in vitro* without co-culture. Hum Reprod; 14; pp: 454-457.
3. Biggers JD, Racowsky C. (2002). The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? Reprod Biomed Online; 5; pp: 133–40.
4. Biggers JD, Summers MC (2008). Choosing a culture medium: making informed choices. Fertil Steril. 90; pp: 473–83.
5. Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M (2007). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. Cochrane Database Syst Rev 4: CD002118.
6. Bronet, F., & Agudo, D. (2017). Should we forget about embryos till day 5? CE: Alpana; GCO.
7. Calderón G., Prados N., Caligara C., Mantrana E., Navarro J., Pellicer A., Remohi J. (2002). Calidad embrionaria. Indicadores predictivos de vitalidad. En: Reproducción Humana, 2da edición. Editorial McGraw-Hill-interamericana. Pp: 463-468.
8. Carlson BM. (2014). Cap 3: Segmentación del cigoto e implantación del embrión. En: Embriología Humana y Biología del Desarrollo. Editorial Saunders Elsevier. Pp: 37-57
9. Cohen, J., Gilligan, A., Esposito, W., Schimmel, T., & Dale, B. (1997). Ambient air and its potential effects on conception *in vitro*. Human Reproduction, 12(8), 1742–1749.
10. Costa-Borges, N., Bellés, M., Meseguer, M., Galliano, D., Ballesteros, A., & Calderón, G. (2016). Blastocyst development in single medium

with or without renewal on day 3: A prospective cohort study on sibling donor oocytes in a time-lapse incubator. *Fertility and Sterility*, 105(3), 707–713.

11. De los Santos MJ (2001). Condiciones óptimas de trabajo en el laboratorio FIV. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, Vol. 18 - nº 4.
12. Dieamant, C.G. Petersen, A.L. Mauri, L.D. Vagnini, A. Renzi, G.R. Oliveira-Pelegri, J. Ricci, M. Cavagna, J.A. Oliveira, R.L. Baruffi, J.G. Franco Jr. (2016). Single versus sequential culture medium: what is the better choice to improve ongoing pregnancy rates? a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*. Volume 106, Issue 3, Supplement, Pp: 360–361
13. Fournier-Delpech S, Thibault C (1990). Acquisition de la fecondance des spermatozoides: maturation epididymaire, glandes annexes, capacitation. Dans: edite par C. Thibault et M.C. Levasseur. *La Reproduction chez les mamiferes et l homme*. Pp. 320-458.
14. Gardner RL (1989). Cell allocation and lineage in the early mouse embryo. *Ciba Found Symp*; 144:172-181; discussion 181-186, 208-211
15. Gardner DK & Lane M (1993). Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod*; 48: 377e385
16. Gardner DK & Lane M (1996). Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod*. 11; pp: 2703-2712.
17. Gardner DK & Lane M (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update*. 3; pp: 367-382.
18. Gardner DK, Lane M (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod* 3: 148–159.
19. Gardner DK, Lane MW & Lane M (2000). EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Mol Reprod Dev*. 57; pp: 256-261.

20. Gilbert S (2003). Cap 2: Desarrollo embrionario temprano. En: *Biología del Desarrollo*. 7a edición. Editorial Medica Panamericana. Pp: 394-395.
21. Hardy, K., Hooper, M.A., Handyside, A.H., Rutherford, A.J., Winston, R.M. and Leese, H.J. (1989b). Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, 4; pp: 188–191.
22. Higdon HL, Blackhurst DW, Boone WR (2008). Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertility and Sterility*. 3; pp: 703-10.
23. Hurtado de Mendoza, M. V., & Ten, J. (2015). Cuadernos de Embriología Clínica: Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos Y Blastocistos Humanos, 9–20.
24. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod*. 2012 May;27(5):1277-85.
25. Lane, M., & Gardner, D. K. (2007). Embryo culture medium: which is the best? *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 21(1), 83–100.
26. Lane M & Gardner DK (2003). Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod*. 69; pp: 1109-1117.
27. Lane M & Gardner DK (1997). Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Ferti.*; 109; pp: 153-164.
28. Lane M & Gardner DK (1994). Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil*. 102; pp: 305-312
29. Macklon, N. S., Pieters, M. H. E. C., Hassan, M. a, Jeucken, P. H. M., Eijkemans, M. J. C., & Fauser, B. C. J. M. (2002). A prospective

- randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Human Reproduction* (Oxford, England), 17(10); pp: 2700–2705.
30. Martin KL & Leese HJ (1995). Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev.* 40; pp: 436e443.
 31. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril.* 2012 Dec;98(6):1481-9.e10.
 32. Milki, A. a., Hinckley, M. D., Fisch, J. D., Dasig, D., & Behr, B. (2000). Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertility and Sterility.* 73(1); pp: 126–129.
 33. Miller JG & Schultz GA (1987). Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod.* 36; pp: 25-129.
 34. Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR, Tanaka S. (1989). The spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated *in vitro*. *Human reproduction.* 4; pp: 57-62.
 35. Noriega L, Llerena C, Prazak L (2013). Cap 31: Sistema de cultivo. En: *Tratado de Reproduccion Humana Asistida.* Grupo Pranor. Pp: 421-438.
 36. Quinn P (2012). Culture systems: sequential. En: Smith GD, Swain JE, Pool TB, *Embryo culture Methods and Protocols.* Humana press, pp: 211-30.
 37. Ramstorp M (2016). Cap 1: Whats a cleanroom?. En: *Cleanroom Technology in ART clinics.* Editorial CRC press.
 38. Rambhia, P., & Desai, N. (2014). Global Medium Is Effective as a Single One-step Medium for Uninterrupted Culture to Blastocyst in the Embryoscope: Preliminary Pregnancy and Clinical Outcome Data. *Fertility and Sterility,* 101(2); pp: 29.
 39. Reed, M. L., Hamic, A., Thompson, D. J., & Caperton, C. L. (2009). Continuous uninterrupted single medium culture without medium

- renewal versus sequential mediaculture: a sibling embryo study. *Fertility and Sterility*, 92(5); pp: 1783–1786.
40. Schultz GA, Kaye PL, McKay DJ (1981). Endogenous amino acid pool sizes in mouse eggs and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil.*; 61; pp: 387-393.
 41. Sepulveda S, Garcia J, Arriaga E, Diaz J, Noriega-Porella L, Noriega-Hoces L. (2009). *In vitro* development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or a sequential mediasystem. *Fertil Steril.* 91; pp: 1765–70.
 42. Sepúlveda, S. J., Portella, J. R., Noriega, L. P., Escudero, E. L., & Noriega, L. H. (2011). Extended culture up to the blastocyst stage: A strategy to avoid multiple pregnancies in assisted reproductive technologies. *Biological Research*, 44; pp: 195–199.
 43. Singh E, Johnston-MacAnanny T, Yalcinkaya A, Carrillo (2012). Blastocyst (blast) development of sibling embryos in a single continuous extended culture (CEC) vs. single culture media renewed on day3 (CMR. *Fertility and Sterility*, Volume 98, Issue 3, Supplement; pp: 106.
 44. Steeves TE & Gardner DK (1999). Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol Reprod.* 61; pp: 731-740.
 45. Summers MC, Biggers JD (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update.* 9; pp: 557-82.
 46. Swain J (2012). Media composition: pH and Buffers. En: Smith GD, Swain JE, Pool TB. *Embryo culture: methods and protocols*. Humana press, pp: 161-175.
 47. Velez de la Calle, J. F., Pfeffer, J., Taar, J. P., & Prigent, Y. (2013). Blastocyst outcomes after sequential mediaculture vs single step mediaculture in a human IVF program. *Fertility and Sterility*, 100(3), S253.
 48. Vermilyea, M. D., Graham, J. R., Anthony, J. T., Ignaszewski, A. D., & Tucker, M. J. (2011). Continuous Single Culture TM Comparison of

Clinical Outcomes using a Single- Step Uninterrupted Culture Medium Protocol Requiring No Medium Renewal vs a Traditional Three-Step Sequential Medium System.

49. Vermilyea, M., Anthony, J., Graham, J., & Tucker, M. (2012). Op-3 Clinical Outcomes from an Uninterrupted Culture Medium Protocol. *Reproductive BioMedicine Online*, 24, S2.
50. Wong C, Loeweke K, Bossert N, Behr B, De Jonge C, Baer T, Reijo Pera R (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology*. 28; pp: 1115-21.
51. Xie Y, Wang F, Puscheck EE, Rappolee DA (2007). Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*. 74; pp:1287–94.
52. Yanagimachi R, Usui N (1974). Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Experimental Cell Research*. 89; pp: 191-174.
53. Zander DL, Thompson JG & Lane M (2006). Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. *Biol Reprod*. 74; pp: 288-294.

Tabla 1: Resultados obtenidos de las parejas que realizaron un tratamiento de reproducción asistida cultivando sus embriones con renovación y sin renovación de medio en el día 3.

	Total	Con renovación	Sin renovación
# de parejas	82	38	44
# Ovocitos en metafase II	689	318*	371*
# Ovocitos fecundados	589	264	325
# total blastocistos formados	348	157	191
# Embriones transferidos	159	73	86
Sacos gestacionales	79	36	43
# Positivos β -hCG	54	24	30
# Embarazos Clínicos	51	22	29

*p=0.901

Tabla 2: Comparación de los resultados clínicos entre los grupos con y sin renovación del medio de cultivo en el día 3.

	Total (Medía± DS)	Con renovación (Medía± DS)	Sin renovación (Medía± DS)	Valor <i>p</i>
Resultados Clínicos				
Tasa de fecundación	85.09 ± 15.59	82.89 ± 18.86	87.00 ± 11.97	0.256
Tasa de desarrollo a blastocisto	59.79 ± 23.05	60.79 ± 24.67	58.92 ± 21.82	0.269
Tasa de embarazo positivo β -hCG	65.85 ± 47.71	63.16 ± 48.89	68.18 ± 47.12	0.632
Tasa de embarazo Clínico	62.20 ± 48.79	57.90 ± 50.03	65.91 ± 47.95	0.455
Tasa de implantación	49.19 ± 42.19	47.81 ± 45.05	50.38 ± 42.00	0.330

Anexo n°1



Clínica Miraflores

Ginecología y Fertilidad

J.A. Encinas 141 (Esq. Cdra. 18 Av. Benavides) - Miraflores - Lima - Perú
Telf.: 610-9696 / www.igf.com.pe / E-mail: ginefert@igf.com.pe

Lima 27 de septiembre del 2016

Estimado

Dr. Hugo Gonzales Figueroa

Jefe de la oficina de grados y títulos

Presente.

Por la presente manifestarle que el proyecto de tesis titulado "Efecto de la no renovación del medio Global® total® durante el cultivo In vitro de embriones humanos" presentado por el Sr. Fernando Daniel Peña Espinoza con DNI: 43670067 ha sido realizado en nuestro centro **Clínica Miraflores** en el laboratorio de reproducción asistida, teniendo en cuenta todas las consideraciones pertinentes para un tratamiento de reproducción asistida en nuestros pacientes.

El acceso a la base de datos del laboratorio de reproducción asistida será para uso único y exclusivo del proyecto de tesis "Efecto de la no renovación del medio Global® total® durante el cultivo in vitro de embriones humanos", siendo estos estrictamente confidenciales, sin develar la identidad de ninguno de los pacientes que participaron en esta investigación.

Sin otro particular, me despido.

Atentamente

Dr. Alvaro Ascenza Aparicio

Director Médico

Clínica Miraflores

Anexo n°2



Clínica Miraflores – Universidad Ricardo Palma

Consentimiento informado para proyecto de investigación



Título: Efecto de la no renovación del medio *Global*® total® durante el cultivo *in vitro* de embriones humanos

Financiador: Clínica Miraflores

Investigador principal: Fernando Daniel Peña Espinoza

Número telefónico: 6109696 anexo 206

Lugar: Clínica Miraflores – Calle José Antonio Encinas 141, Miraflores.

Estas hojas de consentimiento informado pueden contener palabras técnicas que usted podría no comprender. Por favor pregunte al investigador principal del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no haya comprendido. Usted puede llevarse una copia de este documento para evaluar la posición de participar en el estudio o para discutirlo con quien considere pertinente.

Introducción:

Ustedes han sido invitados a participar en un proyecto de investigación. Antes de que decidan participar en el proyecto por favor lea este consentimiento cuidadosamente. Hagan todas las preguntas que tengan, para asegurarse de que entiende los procedimientos del estudio.

Propósito del proyecto:

Este proyecto tiene como objeto evaluar cuál es el efecto que tiene el evitar renovar el medio cultivo en día 3 y además no evaluar a los embriones hasta el día de la transferencia (blastocisto).

Participantes del Estudio:

El proyecto es completamente voluntario, estando libres de participar o abandonar el proyecto en cualquier momento sin ser penalizado ni perder ningún beneficio.

Para este proyecto se incluirán pacientes que reciban óvulos de una mujer donante. La muestra espermática que se utilizará en el procedimiento de alta complejidad (FIV/ICSI) no debe presentar ningún tipo de patologías severas.

Procedimientos:

La rutina normal de un cultivo embrionario implica los siguientes pasos:

1. Aspiración folicular, para obtener los óvulos que se usaran en el procedimiento de alta complejidad (FIC/ICSI)
2. Inyección intracitoplasmática (ICSI) o fecundación *in vitro* convencional (FIV).
3. Día 1: evaluación de fecundación.
4. Día 3: Evaluación y renovación de medio de cultivo.
5. Día 5: Evaluación de Blastocistos y transferencia embrionaria.
6. Congelación de embriones viables y que no hayan sido transferidos en el día 5 o día 6.

La variación en la rutina se realizará excluyendo el punto 4. De esta forma se evitara manipularlos durante la renovación del medio de cultivo.

Riesgos e incomodidades:

Este proyecto no generará ningún riesgo e incomodidad en los participantes.

Beneficios:

Debe quedar claro que no se recibirá ningún beneficio económico por participar en este proyecto. Su participación es una contribución para el desarrollo de la ciencia y el conocimiento en el campo de la reproducción asistida humana. Así como mejora en los protocolos de trabajo en la Clínica Miraflores.

Privacidad y confidencialidad:

La información personal que ustedes brinden a la clínica y a los biólogos investigadores en el curso de este proyecto permanecerá en secreto y no será proporcionada a ninguna persona diferente a ustedes bajo ninguna circunstancia.

Los resultados de este proyecto de investigación pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en reuniones científicas, pero la identidad de los participantes jamás será divulgada.

La información puede ser revisada por un comité de Ética de las instituciones participantes (Clínica-Universidad), quienes realizarán una revisión independiente de la investigación para verificar si se respetan los parámetros éticos que regulan la investigación en humanos.

Derecho a retirarse del proyecto de investigación:

Ustedes pueden retirarse del proyecto en cualquier momento. Tanto antes, durante y después de terminado el procedimiento de alta complejidad, estando en total derecho a solicitar a los biólogos investigadores que retiren su información de la base de datos del proyecto. No obstante, sus datos aun continuaran formando parte de la base de datos de la Clínica Miraflores como parte del registro de pacientes que realizaron procedimientos de alta complejidad.

No firme este consentimiento a menos que hayan tenido la oportunidad de hacer preguntas y recibir contestaciones satisfactorias para todas sus preguntas.

Al firmar este documento aceptan participar en el estudio. Recibirán una copia del documento firmado.

Consentimiento

Nombre del paciente:

DNI / Pasaporte / CE:

Nombre de la paciente:

DNI / Pasaporte / CE:

Anexo nº3
CLÍNICA MIRAFLORES
INSTITUTO DE GINECOLOGÍA Y FERTILIDAD

**CONSENTIMIENTO INFORMADO Y AUTORIZACIÓN DE UTILIZACIÓN DE OVULOS
DONADOS**

NOMBRE DEL DONANTE :
NOMBRE DEL MÉDICO DE REFERENCIA :
DIRECCIÓN ACTUAL :
TELÉFONO :
FECHA :

Yo,.....declaro haber sido informado sobre los alcances y por ende autorizo para el uso de mis óvulos a la Clínica Miraflores – Instituto de Ginecología y Fertilidad bajo el concepto de donación.

Por lo tanto, concedo total autoridad a la Clínica Miraflores – Instituto de Ginecología y Fertilidad a criopreservar, descongelar, utilizar, fecundar y transferir mis óvulos donados para fines de inseminación *in vivo* o *in vitro* (utilizando las diversas técnicas de reproducción asistida que la institución desarrolla).

El proceso de donación de los óvulos donados por mi persona, ha sido llevado a cabo luego de realizar exámenes de laboratorio, que incluyen, HIV-1 + HIV-2, V.D.R.L. y Hepatitis B; para prevenir el contagio del SIDA, Enfermedades Venéreas y Hepatitis B.

El motivo de los análisis de laboratorio es para asegurar a la receptora de los óvulos donados no sea contagiada con enfermedades de la donante.

Tanto yo, como la Clínica Miraflores – Instituto de Ginecología y Fertilidad, nos comprometemos a no revelar mi identidad a ninguna persona que pueda tener contacto directo o indirecto con la o las pacientes involucradas en procedimientos de reproducción asistida que hayan utilizado el o los óvulos donados por mí a la Clínica.

Declaro lo redactado en este documento con entera libertad y bajo ningún tipo de presión.

Firma de la Donante :

En presencia de :

(testigo)

Fecha :

Anexo n°4
CLÍNICA MIRAFLORES
INSTITUTO DE GINECOLOGÍA Y FERTILIDAD

**ACEPTACIÓN DE TRANSFERENCIA DE OVOCITOS HUMANOS DONADOS
FECUNDADOS CON ESPERMATOZOIDES HOMOLOGOS**

NOMBRE DEL PACIENTE O INTERESADO :

NOMBRE DEL MÉDICO DE REFERENCIA :

DIRECCIÓN ACTUAL :

TELÉFONO :

FECHA :

Nosotros, yautorizamos a el (los) directores del Programa de Reproducción Asistida de la Clínica Miraflores – Instituto de Ginecología y Fertilidad y a sus profesionales a realizar la transferencia de los ovocitos donados y fecundados con el esperma de mi esposo, con un procedimiento de Reproducción Asistida realizado en la misma institución.

Si bien es cierto que el propósito del uso de ovocitos fecundados es lograr el embarazo, en muchas ocasiones el procedimiento en sí no lo garantiza. Sin embargo si es que se logra un embarazo, éste podría ser múltiple. Además, que el embarazo obtenido no garantiza el nacimiento del/los niño(a)/s, pudiendo ocurrir complicaciones obstétricas o ginecológicas como en cualquier embarazo logrado de manera natural.

Adicionalmente, entendemos, comprendemos y aceptamos que no estamos exentos del pequeño riesgo del nacimiento de niños con transtornos del desarrollo, sean estos genéticos (cromosómicos), mendelianos, poligénicos y/o embriopáticos.

NO FIRME ESTA ACEPTACION HASTA NO HABERLA LEIDO, COMPRENDIDO

Y ACEPTADO.

Firmamos voluntariamente en el lugar y fecha indicados,

.....

Sra. Esposa

Dirección actual :

Teléfono actual :

Documento de Identidad :

.....

Sr. Esposo

Dirección actual :

Teléfono actual :

Documento de Identidad :

Testigo :

Doctor :

Lugar y fecha :