

**ENTRENAMIENTO EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA
(TRHA) EN EL CENTRO DE REPRODUCCIÓN HUMANA FECUNDAR – CALI**

-Proyecto de Pasantía

GREACE ALEJANDRA ZAMBRANO ORDOÑEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2022**

**ENTRENAMIENTO EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA
(TRHA) EN EL CENTRO DE REPRODUCCIÓN HUMANA FECUNDAR – CALI**

-Proyecto de Pasantía-

**Trabajo de grado modalidad pasantía para optar al título de:
BIÓLOGA**

**Director
WILLIAN ORLANDO CASTILLO ORDOÑEZ, Ph. D en Genética
Profesor Universidad del Cauca**

**Codirector
JAIME SAAVEDRA SAAVEDRA Esp. Medicina Reproductiva**

**Asesora
MARIA ESTER ESTELA HOYOS, Esp. Reproducción Asistida Humana**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2022**

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. HISTORIA DE FECUNDAR.....	7
3.MISIÓN, VISIÓN Y VALORES.....	8
3.1 Misión.....	8
3.2 Visión.....	8
3.3 Valores.....	8
3.4 Organigrama.....	9
4.JUSTIFICACIÓN.....	10
5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	11
5.1 Objetivo General.....	11
5.2 Objetivos Específicos.....	11
6. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES.....	11
6.1 Técnicas de baja complejidad en reproducción asistida.....	14
6.2 Técnicas de alta complejidad en reproducción asistida.....	15
A. Espermograma.....	15
B. Capacitación espermática.....	15
C. Inseminación Artificial Intrauterina (IUI).....	16
D. Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	16
E. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	16
F. Estimulación ovárica.....	17
G. Recuperación de ovocitos.....	17
H. Denudacion o decumulacion de ovocitos.....	17
I. Transferencia embrionaria.....	18
7. MARCO METODOLOGICO.....	18
7.1. Primera fase (parte teórica).....	18
7.2. Segunda fase (parte práctica).....	20
7.2.1. Laboratorio de Andrología.....	20
7.2.2. Laboratorio FIV-ICSI.....	23
8. MARCO LEGAL.....	27
9.CONCLUSIONES.....	29
10.RECOMEDACIONES.....	30
10.1. A la universidad.....	33
10.2 A la organización.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana que han sido siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas. Siempre son mi mejor guía de vida. Su amor, apoyo y esfuerzo me ha permitido llegar a cumplir un sueño más; les dedico a ustedes este logro como una meta más. Orgullosa que hagan parte de mi vida y que estén a mi lado siempre.

Al doctor Willian Orlando Castillo por sus virtudes, su paciencia y constancia en este trabajo, por sus consejos que fueron siempre útiles. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Gracias por su orientación.

A el doctor Jaime Saveedra quien hizo que esta pasantía fuese posible, gracias por confiar y creer en mí, por abrirme las puertas de su tan apreciada clínica, llenándome de conocimientos y consejos. Muchas gracias por compartir sus frases sabias y aventuras de vida.

A la bióloga María Ester Estela, por confiar en mí, aportarme sus conocimientos, resolverme todas las dudas, guiándome con paciencia y consejos.

A todo el personal de fecundar, por apoyarme en todo momento.

A mis compañeros, amigos y familiares que fueron testigos de todo este proceso y que siempre estuvieron conmigo apoyándome, por su compañía, por cada risa, por cada momento compartido.

Gracias a todos por ser quienes son y por creer en mí.

1. INTRODUCCION

La pasantía en técnicas de reproducción asistida en la clínica Fecundar, fue una experiencia enriquecedora para mí, como estudiante de Biología, de manera tanto profesional como personal, ya que me ayudó a ampliar mis conocimientos y aumentar mi gusto por la embriología y biología del desarrollo, considerando que el milagro de la vida ha sido un evento que siempre ha llamado mi atención, logrando así, entender mecanismos, procedimientos y tratamientos que hoy me llenan de satisfacción. Como motivo personal para comenzar a consolidar la perspectiva de un posible posgrado, a través del cual, se busque dar respuestas a interrogantes que surgen desde la embriología.

Así mismo, en el ámbito laboral es una oportunidad, una vez que en países como Colombia la reproducción asistida es un tema relativamente nuevo, y poco explorado, del cual, aún no se tienen estudios específicos; a la vez, son pocos los centros de reproducción asistida, por ende, pocos biólogos que trabajen en el tema, considerando que, en la actualidad, la infertilidad es un problema de salud mundial que afecta a millones de personas en edad de procrear.

Los datos disponibles indican que entre 48 millones de parejas y 186 millones de personas tienen infertilidad en todo el mundo (OMS,2020). Definiendo a la infertilidad, según la OMS como una enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino que consistente en la imposibilidad de conseguir un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales habituales sin protección. La infertilidad puede afectar a ambos sexos, y a la vez estar asociada con enfermedades como el hipogonadismo, la hiperprolactinemia, los trastornos de la función ciliar, la fibrosis quística, infecciones, enfermedades sistémicas y factores relacionados con el estilo de vida, ambiente, genéticos y epigenéticos, o puede ser específica en la mujer por insuficiencia ovárica prematura, síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, fibromas uterinos y pólipos endometriales. La infertilidad masculina puede deberse a problemas testiculares, mala calidad seminal y la consanguinidad (Vander, 2018).

Considerando que las técnicas de reproducción asistida (TRHA) son todos los tipos de tratamiento que incluye la manipulación *in vitro* (en el laboratorio), durante alguna etapa del proceso reproductivo, para establecer un embarazo (Moura.et.al, 2009). Todas las TRHA implican la participación de los gametos masculinos y femeninos (Santamaría, 2000).

Considerando lo anterior, la pasantía se realizó en un transcurso de 6 meses presenciales en el Centro de Biomedicina Reproductiva del Valle- Fecundar, en donde se abarcó la reproducción asistida humana de una forma holística, tratando temas desde la gametogénesis hasta el desarrollo embrionario, además de una preparación teórico-práctico en todas las técnicas de reproducción humana asistida utilizadas en el centro (IUI - FIV - ICSI), incluyendo el análisis de espermogramas, recuperación ovocitaria por medio de punción folicular, transferencia embrionaria, vitrificación, desvitrificación y correcta manipulación de gametos y embriones. Además de diferentes actividades requeridas para el buen funcionamiento del laboratorio y de la clínica, como manejo e interpretación de historias clínicas, seguimientos, consentimientos de cada paciente, protocolos, y documentación correspondiente.

Así mismo, un alcance importante dentro de la realización de esta pasantía ha sido el establecimiento de conexiones y convenios para que otros estudiantes de la universidad del Cauca apasionados por el tema puedan realizar pasantías e investigación en conjunto.

2. HISTORIA DE FECUNDAR

El Centro de Biomedicina Reproductiva del Valle – Fecundar, fue constituido en marzo de 1995, iniciando su labor de ayuda a parejas con dificultades de fertilidad. En 1996 nació en Cali el primer bebé concebido a través de fecundación *In Vitro* (Bebé Probeta). En 1997 se da inicio el servicio de Laboratorio de Hormonas. En 1998 Fecundar cambia de sede con el fin de brindar más comodidad a sus usuarios y poder extender sus servicios. En 1999 se vincula el único médico especialista en Andrología (Salud Sexual y Reproductiva Masculina). En 2000 se obtiene certificación y acreditación por la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, gracias a su calidad tecnológica y a la excelencia de sus profesionales. En 2001 se implementa en Fecundar el procedimiento de ICSI (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides). En 2002 se da inicio al departamento de Psicología en Fecundar, con el fin de ofrecer atención integral a la pareja. En 2005 Fecundar es el primer centro de fecundidad en Colombia certificado por el ICONTEC, con su sistema de gestión de la calidad con la Norma ISO 9001 versión 2000. En 2006 Fecundar se convierte en el único centro en el país en ser importador de Gonadotropinas (medicamentos de estímulo para tratamientos de infertilidad). En 2008 Fecundar implementa el procedimiento de vitrificación; método que preserva los gametos o los embriones, para posteriores tratamientos de reproducción asistida. En 2009 se incluye la realización de la histeroscopia oficial. En 2010 Fecundar inaugura su laboratorio de inmunología y realiza el Primer taller práctico en vitrificación, dictado por Damián Castello, director de vitrificación del Instituto Valenciano de Fertilidad de España. En 2011 Fecundar inaugura sus nuevas instalaciones para comodidad de sus pacientes, y el laboratorio clínico en convenio con el laboratorio clínico especializado Nohemy Cruz. En 2013 se incluye el servicio corrección de la incontinencia urinaria, con equipo láser.



Figura 1. Instalaciones de la clínica de biomedicina reproductiva del valle Fecundar

3. VISIÓN MISIÓN Y VALORES.

3.1 Misión

Dar soluciones a los problemas de infertilidad mediante atención médica especializada y/o técnicas de reproducción asistida, contando con el apoyo de los colaboradores y proveedores para el cumplimiento de los servicios con calidad, responsabilidad y seguridad.

3.2 Visión

Fecundar será un centro de reproducción humana de referencia a nivel nacional por el entrenamiento y actualización de especialistas, servicios complementarios y altas tasa de embarazo, que permitan el crecimiento y sostenibilidad.

3.3 Valores.

Servicio: colocamos nuestro empeño y conocimiento a disposición del cumplimiento de las expectativas y necesidades de nuestros usuarios y demás grupos de interés.

Honestidad: es realizar nuestras actividades con transparencia, para que cada acción corresponda a la confianza de nuestros usuarios y demás grupos de interés.

Responsabilidad: cumplimiento de los deberes y funciones que desempeñemos, con el fin de contribuir a la calidad de la atención, logro de los objetivos estratégicos y un ambiente colaborativo y de eficacia organizacional.

Calidad: nos esforzamos por hacer las cosas bien desde el principio, con el fin de satisfacer los requisitos de los usuarios y de los demás grupos de interés, cumpliendo las propuestas pactadas de manera eficaz y eficiente.

Trabajo en Equipo: aportamos conocimientos, habilidades y experiencia, trabajando por el logro de las directrices institucionales, creando compromiso entre sus integrantes bajo la premisa que todos son más que uno.

3.4 Organigrama

Representación gráfica de la estructura del personal, con su respectiva función en el centro de reproducción asistida del Valle- Fecundar.

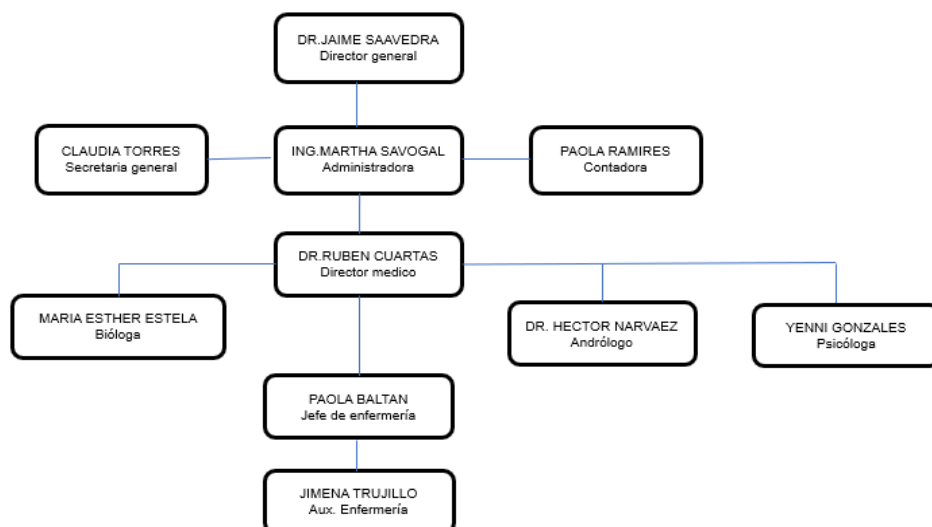


Figura 2. Organigrama Fecundar.

4. JUSTIFICACIÓN.

La pasantía se realizó principalmente por satisfacción personal. Como estudiante de biología siempre me llamó la atención cómo se genera la vida, y todo el campo de la embriología, no solo por la reproducción sino por todos los mecanismos que se ven involucrados tales como envejecimiento, enfermedades, cáncer y demás, generando una perspectiva a futuro de un posgrado en embriología; esta práctica fue la oportunidad perfecta para profundizar en conocimientos teóricos sobre biología de la reproducción humana y generar experiencia práctica en la realización de técnicas de reproducción asistida humana, además poner en práctica conocimientos adquiridos durante toda la carrera.

Es importante la formación de personal que trabaje y estudie el tema, dado que la infertilidad es un problema que ha venido amenazando la supervivencia y el mantenimiento de la sociedad (Frydman, 2018), la cual cada día va a ir aumentando ya que es una enfermedad que es modulada por diversos factores, entre ellos ambientales, genéticos, epigenéticos, sociales y culturales (Brugo.et.al, 2003), siendo un problema antiguo que no tiene una cura definitiva, pero sí se puede aportar desde la academia y la investigación para ayudar a personas a cumplir el sueño de lograr se padres.

Además, es una oportunidad para el desarrollo y creación de competencias científicas dirigidas a abrir campos de investigación y asociaciones a nivel regional y nacional para ayudar a suplir necesidades asociadas a la infertilidad.

5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

5.1 Objetivo General

Adquirir conocimientos teórico-prácticos en las distintas técnicas de reproducción humana asistida.

5.2 Objetivos Específicos

1. Participar en los abordajes teórico-prácticos de procedimientos del área de andrología.
2. Recibir entrenamiento teórico y práctico en procesos de laboratorio de fecundación in vitro (FIV).

6. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

Considerando que la infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo que impide lograr un embarazo clínico después de doce (12) meses o más de relaciones sexuales no protegidas (Rojas, 2011). Esta enfermedad ha acompañado al hombre desde su origen, dado la necesidad de concebir fue tan grande que los problemas de concepción se reportan desde hace más de 30 mil años. En las primeras civilizaciones, se rindió culto a la fertilidad, para asegurarla en las mujeres; siendo de igual manera en la Roma clásica y en la civilización egipcia, donde se creía que la culpable de no concebir era la mujer, y que era por causa de un castigo divino (Frydman,2018). Descripciones de patologías de infecundidad se han encontrado en los tratados de Hipócrates entre 460 y 377 a.C, (Sanz, 1988). Entre los años 382 – 332 a.C, por Aristóteles se llegó a una deducción de los requerimientos reproductivos quien sugirió la presencia de órganos especializados, edad y periodos de fertilidad. Medio milenio después (110 – 180 d.C) Rufus de Efeso hizo una descripción de manera formal de los genitales masculinos y femeninos como órganos reproductores; este legado anatómico-funcional persiste 1500 años en las

subsiguientes generaciones de médicos, para quienes la fertilidad continuaba centrada en la mujer (Barany, 2008).

A finales del siglo XV en el renacimiento ocurrió un gran salto en el desarrollo de nuevas tecnologías como la imprenta que ayudó a la divulgación científica, y el microscopio, que se convirtió en una importante herramienta para que el anatomista Regnier de Graff (1673) hallara los folículos ováricos y el microscopista Anton Van Leeuwenhoeck (1677) descubriera los espermatozoides, cambiando la concepción del mundo para siempre. Hasta que en 1776 Jhon Hunter realizó la primera inseminación a una mujer con semen de su esposo, sin embargo ignoraba el proceso de fecundación y fue tres años más tarde (1779) cuando Lazzaro Spallazani demostró la fecundación entre un huevo y un espermatozoide inseminados artificialmente a un canino de género femenino, y fue 87 años después que surgió la publicación de James Marion Sims, en 1866, en la que describió la supervivencia de los espermatozoides en el moco cervical (Barany, 2008).

Gracias al avance tecnológico, científico y de pensamiento; en 1891, Walter Heap transfirió exitosamente embriones de conejo; no obstante, durante mucho tiempo persistieron las dudas sobre los resultados exitosos de la fecundación *in vitro* en animales. La transferencia de embriones de animales más grandes (como ovejas y cabras) comenzó en 1930. Los estudios de Walter Heape, incentivaron a científicos en poder cultivar embriones en laboratorio, y poco a poco se fue perfeccionando el estudio del desarrollo embrionario temprano. En casi todos los medios de la época se utilizaba plasma sanguíneo, suero o fluidos biológicos no bien descritos. Hammond Jr. en 1949 reportó un medio complejo que permitió que un embrión de ratón de ocho células sobreviviera hasta ser blastocisto (Stern et al.,2016).

En 1944 John Rock realizó fecundación *in vitro* (FIV) en ovocitos humanos sin transferirlos al útero, años después, Austin y Chang en 1951 descubrieron el proceso de capacitación de espermatozoides (Barany, 2008).

La colecta de óvulos humanos lo suficientemente maduros para ser fecundados *in vitro* en el laboratorio ha sido un reto hasta que se demostró que la maduración ovular en mujeres a quienes se les administraba gonadotropina coriónica humana (HCG) ocurría de manera similar a un ciclo natural. (Barany, 2008). En 1970 se inició el uso de fármacos para la inducción de la maduración ovárica pronto se demostró que dicho procedimiento aumentaba las posibilidades de embarazo al aumentar el número de embriones. En 1973, Carl Wood y John Leeton realizan sin éxito la primera transferencia de un embrión humano *in vitro* (Lopez, 2012).

El primer embarazo humano mediante FIV fue en 1973, reportado por Carl Wood y John Leeton en Melbourne, Australia. Desafortunadamente, terminó en una muerte embrionaria temprana (menos de una semana). Durante esos años hubo mucha controversia y crítica sobre las transferencias de embriones humanos (Brinsden, 2009). Hasta que el 25 de julio de 1978 nace Louise Brown quien fue la primera “niña probeta” en Manchester, Gran Bretaña, concebida por Patrick Steptoe y Robert Edwards, quienes formaban el equipo idóneo, ya que el primero había desarrollado una manera de fertilizar óvulos en el laboratorio mientras que el segundo tenía el método para extraerlos; su método consistía en extraer un óvulo de la mujer, fertilizar en el laboratorio con el espermio del hombre, y una vez formado el embrión, introducirlo en el útero materno, donde se desarrollaría (Mata, 2019).

En 1983 se consigue la primera gestación de un embrión generado desde un óvulo donado a una mujer sin ovarios y nace el primer bebé, por embrión congelado (López, 2012). En 1985 comienza la donación de óvulos en Europa, y se crea el primer embrión con un blastocisto crioconservado. En 1988 nace el primer bebé por fecundación mediante la inyección directa del espermio bajo la zona pelúcida del óvulo. En 1989 se abre la puerta al diagnóstico genético previo a la implantación (DGP) con la obtención de una biopsia del embrión y amplificación del ADN para conocer su sexo. Para 1992 se da el primer embarazo por inyección intracitoplasmática al óvulo (ICSI). En 1994 comienza el uso de la extracción testicular de espermio. En 1999 la hermana de Louise (“niña probeta”), Natalie tuvo un hijo y se convirtió en la primera persona nacida gracias a la fecundación *in vitro*

que daba a luz a un hijo concebido de forma natural. En el 2000 nace el primer niño procedente de Oocitos y espermias congelados (Barany, 2008). En el 2001 nace un niño concebido con el espermia de un hombre moribundo. En el 2004 por primera vez se preserva la fertilidad de una mujer con cáncer, mediante vitrificación de los Oocitos. 2007 comienza a probarse la recogida de Oocitos sin estimulación ovárica y su maduración posterior para donación. En 2008 se da el nacimiento de gemelos después de la crioconservación de ovocitos y eliminación de ambos ovarios en una paciente de cáncer (López, 2012).

Cada vez estos avances sorprenden más, tanto por la calidad y eficacia de las técnicas como por la tecnología que se aplica; aumentando de forma considerable la tasa de éxito, provocando que cada vez más personas recurran a la reproducción asistida, que no solo beneficia a matrimonios con problemas de fertilidad; sino que también, brinda a madres solteras o parejas del mismo sexo, la opción de tener hijos (Mata, 2019). Con el paso del tiempo, la reproducción asistida ha sufrido numerosas modificaciones, las cuales incluyen, mejoramiento de los medios de cultivo para gametos, cigotos y fecundación, transferencia temprana de embriones, reducción en el número de espermatozoides utilizados para lograr la fecundación; y adelantos en el equipamiento (Stern et al., 2016). Gracias a esta serie de acontecimientos, hoy se puede recurrir a estos de una manera más segura y fácil, clasificándolos en dos técnicas las cuales se catalogan como: técnicas de baja y alta complejidad.

6.1 Técnicas de baja complejidad en Reproducción Asistida.

Abarca todos aquellos métodos en los que, independientemente de las manipulaciones a las que puedan verse sometidos los gametos, el proceso de fecundación o fertilización del óvulo u ovocito por el espermatozoide se efectúa en el interior del aparato reproductor femenino. Esto implica que, en este grupo de técnicas, el momento de la fecundación queda fuera del alcance de posibles intervenciones tecnológicas. Estas técnicas pueden clasificarse haciendo referencia al origen de los gametos en homólogas o heterólogas. Se entiende por técnica homóloga aquella en la que tanto el espermatozoide como el óvulo proceden de la pareja que se somete a la técnica correspondiente. Heteróloga es aquella en la que

ya sea uno de los gametos (óvulo o espermatozoide) o ambos, proceden de donantes ajenos a la pareja, donde las metodologías que se usan son: relaciones sexuales programadas e inseminación artificial intrauterina (IUI) (Levy,2008).

6.2 Técnicas de alta complejidad en Reproducción Asistida.

Son todas aquellas modalidades de reproducción asistida en las que la fecundación se produce en el exterior del tracto reproductor femenino, en estos métodos el embrión obtenido *in vitro* debe de ser posteriormente transferido al útero materno, existe la posibilidad de que esta transferencia no se lleve a cabo en el útero de la madre biológica sino en el de otra mujer (maternidad subrogada). Metodológicamente, las TRHA de alta complejidad se pueden clasificar como: fecundación *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)(Lerner,2008).

Para la realización de las anteriores técnicas mencionadas se hacen una serie de procesos y exámenes diagnóstico dependiendo del paciente y el tratamiento a realizar, estos procesos son:

A. Espermograma: brinda una visión más amplia de la capacidad reproductiva del varón. Es el examen de diagnóstico más importante y sencillo para iniciar el estudio de la fertilidad masculina. En él se evalúan los aspectos macroscópicos del semen, como el volumen, pH, licuefacción, viscosidad, color y los aspectos microscópicos como concentración, movilidad, morfología y vitalidad (Vásquez, 2007), siguiendo los parámetros del manual de OMS (laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, WHO, 2010) (Anexo 1).

B. Capacitación espermática: consiste en concentrar en un volumen reducido una población con un gran porcentaje de gametos morfológicamente normales y móviles, a su vez libres de detritos, células no espermáticas y espermatozoides muertos (Salazar, 2019). La capacitación espermática da lugar a una modificación en la movilidad flagelar que favorece la penetración del ovocito, la calidad del

procesado de las muestras de esperma es uno de los factores que determina el éxito de los procedimientos de reproducción asistida (Ombelet, 2003), *in vivo* ocurre únicamente después que el espermatozoide ha pasado un período de tiempo en el tracto reproductivo femenino es así como nos vemos obligados a reproducir parte del proceso biológico de la capacitación espermática en el laboratorio (Salazar, 2019). Lo anterior se realiza utilizando 2 técnicas principales para la capacitación: - gradientes de densidad y swin up.

C. Inseminación artificial intrauterina (IUI): es una técnica que consiste en la transferencia de espermatozoides previamente capacitado, en la cavidad uterina de la mujer (Mackennal et al., 2010). La suspensión de esperma se puede depositar en el cuello uterino, el útero, el peritoneo o la trompa de Falopio, proceso que se realiza con guía ecográfica y catéter, la inseminación se puede realizar en varios puntos de tiempo alrededor de la ovulación y se puede hacer una o varias veces. En la mayoría de los estudios publicados, la inseminación se realiza 32-36 horas después de administración de hormona Coriónica humana (hCG). Se supone que el momento de la inseminación en relación con la ovulación es crítico para una tasa de éxito óptima (ESHRE, 2009). En teoría, se pueden esperar mejores posibilidades de concepción cuando se realizan dos inseminaciones consecutivas, ya que la ovulación no ocurre en un patrón sincronizado sino en ondas de liberación después de la administración de hCG (Ombelet, 2008).

D. Fertilización *in vitro* (FIV): es la técnica mediante la cual se pone el óvulo en una gota de medio de cultivo con miles de espermatozoides, con el objetivo de que uno de los espermatozoides penetre el óvulo por sí solo, para que esto ocurra, el espermatozoide ha de tener cierta vitalidad y movimiento, pues debe acercarse hasta el óvulo y tener la capacidad de atravesar la zona pelúcida ovocitaria (Durand, 2013). Si el espermatozoide es de mala calidad, este proceso no ocurrirá y, por tanto, no se logrará obtener embriones (Corrêa, 2020).

E. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): esta técnica consiste en seleccionar al mejor espermatozoide, especialmente en relación a

movilidad y morfología, para introducirlo con ayuda de un microinyector en el interior del óvulo. De esta forma, con ICSI se da un paso más hacia la fecundación. No obstante, cabe destacar que el hecho de introducir el espermatozoide directamente en el óvulo no necesariamente implica que la fecundación vaya a producirse (Peultier, 2014). En el caso de la ICSI, no se requiere una elevada calidad espermática, ya que el espermatozoide va a tener una gran ayuda para fecundar al óvulo (Durand, 2013).

F. Estimulación ovárica: la estimulación ovárica controlada consiste en la administración de hormonas para lograr que los ovarios, en vez de producir un único ovocito, como hacen de forma natural cada mes, produzcan más ovocitos aptos para fertilización, y así poder llegar a obtener un mayor número de embriones. El tratamiento dura entre 10 y 20 días, según el protocolo empleado. Durante su transcurso se realizan controles clínicos consistentes en la valoración de los niveles sanguíneos hormonales y el control ecográfico del desarrollo folicular, para comprobar que el crecimiento y la evolución de los folículos es el adecuado (Corrêa, 2020).

G. Recuperación de ovocitos: la recuperación de ovocitos se realiza por el método de aspiración folicular guiada por ultrasonido transvaginal. Se lleva a cabo 34 a 36 horas después de la administración de hCG. Bajo directa visualización ecográfica y algún tipo de analgesia-anestesia (más comúnmente, Propofol intravenoso), una aguja se introduce secuencialmente en cada folículo y el contenido folicular es aspirado. Para la punción, la paciente ingresa ambulatoriamente, se realiza en el quirófano, donde al tiempo, el embriólogo identificará a través del microscopio los ovocitos obtenidos en la punción, después se aislarán y clasificarán en su estadio de madurez (Durand, 2013).

H. Denudación o decumulación de ovocitos: este es un proceso que se realiza a los óvulos antes de microinyectar los espermatozoides, cuando se va a emplear la técnica de ICSI. La denudación consiste en eliminar las células del

cúmulo que rodean al ovocito, para facilitar la introducción del espermatozoide en el mismo (Durand, 2013).

I. Transferencia embrionaria: consiste en introducir embriones viables, a través del cuello uterino, para depositarlos aproximadamente a 1,5 cm del fondo, para ello se utiliza un catéter específico de transferencia embrionaria. El número de embriones a transferir dependerá de la edad de la paciente, del número de intentos realizados previamente sin conseguir la gestación, y del criterio médico. La paciente no necesita anestesia alguna en este proceso, ya que el procedimiento es rápido e indoloro, pero se realizará en área quirúrgica próxima al laboratorio de reproducción (Corrêa, 2020).

7. MARCO METODOLÓGICO.

La pasantía se realizó de manera presencial durante 6 meses, en la clínica Fecundar Cali-Valle del cauca, el tiempo de la pasantía se dividió en 2 fases, así:

7.1 Primera fase: (Parte Teórica)

Fueron 2 meses totalmente teóricos en donde se abarcaron los siguientes temas, los cuales se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Temas abordados en la parte teórica, descripción y su respectiva bibliografía.

Temas	Descripción	Bibliografía
- Ovogénesis y control neuroendocrino del ciclo ovárico y endometrial. -Ovulación y Maduración del ovocito.	-Aparato reproductor femenino -Ovogénesis. -Foliculogénesis y su ciclo endocrino. -Ciclo ovárico y su ciclo endocrino. -Ciclo endometrial y su ciclo endocrino.	(Lonergan, 2016). (Baerwald, 2011). (Gershon, 2020). (Rimon et Al., 2016). (yang et al., 2019).

Espermatogénesis y su control neuroendocrino.	-Aparato reproductor masculino. -Espermatogénesis. -Ciclo endocrino de la espermatogénesis.	(Neto et al., 2016). (Chu et al., 2012). (Rajender, 2011).
Técnicas de reproducción asistida (FIV, ICSI, IUI).	-Clasificación de técnicas en reproducción asistida (alta y baja complejidad). -Caracterización de cada técnica (FIV, ICSI, IUI).	(Geyter, 2019). (Huang, 2014). (Zegers et al., 2019).
Alteraciones endocrinas e infertilidad.	-Infertilidad. -Enfermedades asociadas con la infertilidad. -Enfermedades endocrinas asociadas a infertilidad.	(Barratt et al., 2017). (Chu, 2012). (Krausz, 2018)
Cuerpo y fase lútea normal y anormal.	-Cuerpo lúteo normal y anormal. -Fase lútea normal y anormal. -Sostenimiento de fase lútea con progesterona.	(Lawrenz, 2019) (Yanushhpolsky, 2015). (Piltonen, 2019).
La fecundación humana y sus anomalías.	-Fecundación. -Proceso de fecundación. -Problemas de fecundación.	(Vásquez et al., 2016) (Yeste et al., 2017).
Implantación embrionaria.	-Mecanismos de implantación embrionaria normal. -Problemas en implantación embrionaria. -Factores que afectan la implantación embrionaria.	(Zhang et al., 2013). (Ashary, 2018). (Teh, 2016).
Clasificación según morfología de óvulos y embriones.	-Clasificación de óvulos con granulosa. -Clasificación de óvulos, de cumulos. -Clasificación de cigotos. -Clasificación de embriones. -Clasificación de blastocistos.	(Martinez et al., 2017) (Rocha et al., 2016). (Manna, 2013).

Cada uno de los temas fue abordado por la bióloga de Fecundar, a través de diapositivas, artículos y libros, según Cuadro 1. Al finalizar cada tema, se realizaron evaluaciones a través de exposiciones.

7.2 Segunda Fase: (Parte Práctica)

La fase práctica se realizó durante 4 meses donde el entrenamiento se dividió en 2 partes: laboratorio de andrología, y laboratorio de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y fertilización *in vitro* (FIV).

7.2.1. Laboratorio de Andrología. En el laboratorio de andrología inicialmente solo se realizó una participación y acompañamiento visual, en la realización de espermogramas, recuento de espermatozoides móviles (REM), capacitación espermática e inseminación artificial, cada proceso con su respectiva explicación (Cuadro 2), después me asignaron el espacio, materiales y equipos para poder realizarlos siendo monitoreada y evaluada en cada momento por la jefe de laboratorio. Los procesos realizados se hicieron siguiendo los pasos del manual de andrología de fecundar (Anexo 2), y basados en los criterios estadísticos de la OMS 2010 (Anexo 1).

Los procesos realizados en el laboratorio de andrología fueron lo reportados en el cuadro 2:

Cuadro 2. Procesos realizados en el área de andrología con su respectiva descripción.

Proceso.	Descripción.
Espermograma	Se analiza una muestra de semen, donde se tienen en consideración características macro y microscópicas, macroscópicas como: volumen, color, licuefacción, viscosidad, pH. Características microscópicas: conteo espermatozoides móviles rápidos, móviles lentos, progresivos, no progresivos, aglutinación, vitalidad (Figura 5), y morfología espermática

	(Figura 4). Todos estos parámetros se evalúan según los criterios estadísticos de la OMS 2010 (Anexo 1).
Espermograma más REM.	Se realiza un Espermograma normal con sus características macro y microscópicas, además se hace una capacitación espermática, por medio de técnica de Gradientes o Swin - up para poder hacer recuento de espermatozoides móviles (REM) (Figura 3).
Vitrificación - desvitrificación de semen.	Preservar muestras de semen por medio la vitrificación, para la cual primero se debe realizar un espermograma, si la muestra cumple con los parámetros requeridos se procede a precalentar el medio de vitrificación, y se vitrifica por medio del protocolo indicado (Anexo 2), al igual que la desvitrificación.
Inseminación Artificial.	Consiste en la introducción vía vaginal, de una muestra de semen previamente capacitada, por medio de técnica de Gradientes o Swin Up.

NOTA: todos los procesos mencionados en este cuadro se realizaron bajo el Manual de Andrología manejado en Fecundar (Anexo 2).



Figura 1. Preparación de una muestra de semen para espermograma + REM

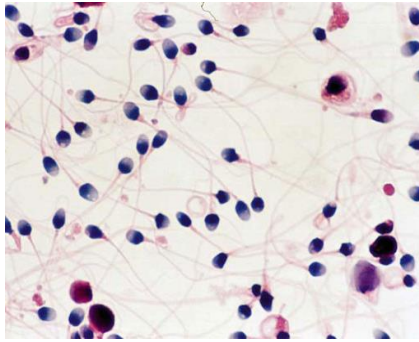


Figura 2. Morfología espermática, vista a través de microscopio de luz, con tinción Hemacolor. Poder de aumento 100x.

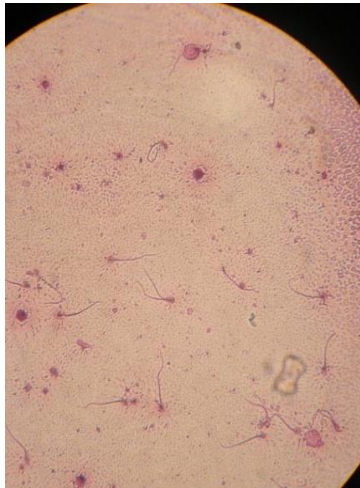


Figura 3. Vitalidad espermática, vista a través de de microscopio de luz, con tinción de Eosina. Poder de aumento 40x.

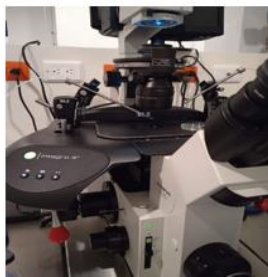
7.2.2. Laboratorio FIV-ICSI. En la segunda parte práctica, se hizo participación y observación de todos los procesos realizados en el laboratorio de FIV – ICSI que corresponden a: aspiración folicular, denudación de óvulos, fertilización *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia embrionaria, vitrificación y desvitrificación de óvulos y embriones, y seguimiento de embriones durante su desarrollo (Cuadro 3). Para la práctica de técnicas como ICSI, vitrificación, desvitrificación y transferencia embrionaria fue necesario el uso de gametos inmaduros o embriones que no continuaron su desarrollo, todos los procesos se realizaron siguiendo el manual de laboratorio FIV de fecundar (Anexo 3), y con acompañamiento y supervisión de la jefe de laboratorio.

Cuadro 3. Procesos realizados en el laboratorio de FIV con su respectiva descripción.

Proceso	Descripción
Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).	Se prepararon medios y cajas de cultivo, se capacitó y se realizó las debidas diluciones de espermatozoides, montaje de proceso de FIV, y seguimiento de sus resultados.
Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).	Preparación de medios y cajas de cultivo, decumulación y clasificación de óvulos, capacitación y dilución de espermatozoides, manejo de espermatozoides en PVP (polivinilpirrolidona), proceso de inyección intracitoplasmática usando micro manipulador y observación de fertilización (Figura 6).
Recuperación ovocitaria.	Preparación de medios de cultivo y sala de aspiración, recuperación de óvulos en líquido folicular, decumulación de granulosa en óvulos, almacenamiento y manipulación de óvulos (Figura 7).
Vitrificación - desvitrificación de óvulos.	Aclimatación de medio de vitri y desvitrificación, elección de óvulos de buena calidad, realización de estos procesos, siguiendo el manual (Anexo 3), manipulación nitrógeno líquido y manejo banco de gametos (Figura 8).

Vitrificación- desvitrificación de embriones.	Elección de embriones en buenas condiciones de desarrollo, aclimatación de medios de vitri y desvitrificación, realización de estos procesos siguiendo el manual (Anexo 3), manipulación nitrógeno líquido y manejo de banco de embriones (Figura 9).
Transferencia embrionaria.	Pre calentamiento de medio de transferencia, preparación de cajas de cultivo y sala de procedimientos, cargado, lavado y revisión de catéter Wallace (Figura 10).
Seguimiento embriones.	Manipulación adecuada de embriones, observación de fertilización, manipulación y cambio de medio de cultivo, y clasificación de embriones en día 3 y 5 (Figura 11).

NOTA: Todos los procesos mencionados en este cuadro se realizaron bajo el Manual de FIV - ICSI manejado en Fecundar (Anexo 3).



(A)



(B)

Figura 6. (A) micro manipulador para la realización de ICSI en el centro médico Fecundar. (B) inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).



Figura 7. Gaseado y pre calentamiento de cajas Petri con medio de cultivo para mantener su temperatura y pH.

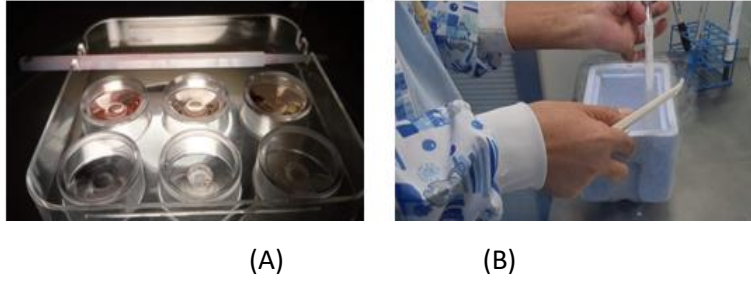


Figura 8. (A) Medios de cultivo para vitrificación embrionaria, con su respectiva pajuela. (B) Rotulación y almacenamiento de pajuelas en escalerillas para ser almacenadas en tanques de Nitrógeno líquido.

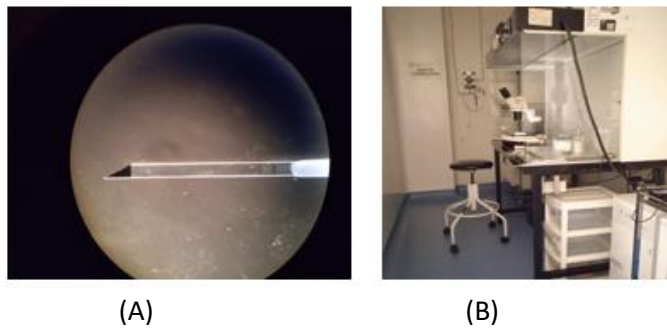


Figura 9. (A) pajuela de vitrificación con un embrión, foto tomada en lente de Estereoscopio. (B) Lugar de trabajo para vitrificación y desvitrificación de óvulos y embriones.



Figura 10. Cajas Petri y catéter Wallace listos para transferencia embrionaria.



Figura 11. fotografía de embriones en día 3 y día 5 de desarrollo respectivamente.

Además se participó en la preparación y manejo de los medios de cultivo antes de cada procedimiento, como se indica en el manual (Anexo 3):organizar el lugar de trabajo e incorporar implementos requeridos para los procesos a realizar en el laboratorio y sala de procedimiento (aspiración folicular y transferencia embrionaria) (Figura 12), además de la realización de consentimientos, actas y demás documentación requerida tanto por la clínica como por el Invima y el Ministerio de Salud para los centros de reproducción asistida en Colombia .



Figura 12. Fotografía con uniforme e implementos mínimos necesarios para ingresar al laboratorio de FIV-ICSI.

Poniendo en práctica matrices y bases de datos para las respectivas estadísticas de gestión de calidad de la empresa, y documentos exigidos por la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, como datos de tasa de embarazo, porcentaje de donantes, número de casos, número de embarazos múltiples o sencillos, organización de lista de donantes y banco de gametos.

Siendo parte importante de las actividades el monitoreo diario del laboratorio, como el reporte diario de gases, temperatura, humedad, en todas las áreas (área de andrología, laboratorio FIV-ICSI, sala de procedimientos y Vestier). El buen funcionamiento de los equipos como incubadoras, microscopio, cabinas de flujo laminar, platinas de calentamiento, aire acondicionado, equipos para

procedimientos como el ecógrafo, carro de paro y reanimador antes de cada procedimiento.

También con la participación semanal en la reunión del equipo de trabajo en el seguimiento de casos en cada paciente, mejoras institucionales y club de revistas (Figura 13).



Figura 13. Equipo médico Fecundar, Dr. Alejandro Saavedra, Dra. Beatriz Velásquez, Dr. Marco Velásquez, Dr. Jaime Saavedra, Dr. Rubén Cuartas, Dr. Héctor Narváez (nombrados de izquierda a derecha).

8. MARCO LEGAL.

El Centro de Biomedicina Reproductiva del Valle – Fecundar se rige por el Decreto 1546 de 1998; por el cual, se reglamentan parcialmente la ley 9ª de 1979 y la Ley 73 de 1988 en cuanto a la obtención, donación, preservación, almacenamiento, transporte, destino y disposición final de componentes anatómicos y procedimientos para trasplante de los mismos, en seres humanos, y se adoptan las condiciones mínimas para el funcionamiento de las unidades de biomedicina reproductiva, centros o similares. Considerando como componentes anatómicos a órganos, tejidos, células y en general, todas aquellas partes que constituyen a un organismo; y a unidades de biomedicina reproductiva, como todas aquellas que prestan servicios de estudio, asistencia, tratamiento e investigaciones en salud reproductiva.

En Colombia se implementó la Ley 1953 de 20 febrero 2019; por medio de la cual se establecen los lineamientos para el desarrollo de la política pública de prevención de la infertilidad y su tratamiento dentro de los parámetros de salud reproductiva. El Gobierno nacional a través del Ministerio de Salud y Protección Social adelantará la política pública de infertilidad con miras a garantizar el pleno ejercicio de las garantías sexuales y reproductivas y su protección a través del Sistema de Seguridad Social en Salud, en el término de seis meses. La política pública de infertilidad desarrollará los siguientes componentes: - Investigativo: fomento de la investigación científica, en los sectores público y privado, sobre las diversas causas de la infertilidad y los tratamientos que podrían coadyuvar a prevenirla, tratarla y curarla. - Preventivo: desarrollo integral e interdisciplinar de estrategias de promoción y prevención de la infertilidad y las enfermedades asociadas a la misma. - Educativo: la educación sexual y reproductiva incluirá la información sobre infertilidad y su abordaje terapéutico, en temas como: hábitos de vida saludables que actúan como factores protectores de la infertilidad; la relación entre las causas de la infertilidad y otras patologías asociadas; los programas y tratamientos de infertilidad; y otros temas relevantes para la atención integral de esta enfermedad. -Diagnóstico y tratamiento oportuno: establecimiento de esquemas de atención, diagnóstico y tratamiento oportuno frente a la patología infertilidad; así como fomento de la formación de profesionales de la salud en el área de la infertilidad, desde una perspectiva integral - Adopción. Establecimiento de lineamientos sociales y legales de priorización que permitan garantizar el derecho a formar una familia a partir de la adopción a las personas diagnosticadas como infértiles.

9. CONCLUSIONES.

- Fue un complemento indispensable para mi educación y formación como bióloga, al permitirme profundizar de forma teórico-práctica en técnicas de reproducción asistida humana, que significó el inicio de un crecimiento profesional lleno de experiencias enriquecedoras.

- Adquirir habilidad y destreza en el área de andrología espermogramas, espermogramas más REM, inseminaciones artificiales (IUI), vitrificación y desvitrificación de semen.

Respecto al laboratorio de FIV- ICSI se obtuvo un entrenamiento en todos los procesos como recuperación ovocitaria mediante punción folicular, transferencia embrionaria, fertilización *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) vitrificación, y desvitrificación, correcta manipulación y clasificación de óvulos y embriones.

- Se establecieron lazos y convenios que abrirán las puertas a otros estudiantes de la Universidad del Cauca.

- Finalmente, se cumplieron todas las expectativas logrando la ejecución de las actividades propuestas con el mayor entusiasmo y eficiencia. Dejando como resultado una serie de conocimientos y experiencias adquiridas, además de la satisfacción personal de haber dado lo mejor de mí.

10. RECOMENDACIONES.

10.1 A La Universidad.

- Luchar cada día por ofrecer una educación con más alternativas en electivas y en materias de profundización para el estudio de la embriología dirigida también a la parte humana.
- Ofrecer perspectivas más amplias a los estudiantes acerca del campo laboral, para poseer una base firme y adaptarse con facilidad a el ámbito del trabajo.
- Mantenerse a la vanguardia en cuanto a nuevas metodologías, implementando tendencias más actuales en investigación, equipos y personal.
- Brindar a los estudiantes más oportunidades y alternativas para electivas y pasantías, en temas más acordes a sus gustos personales.

10.2 A La Organización.

- Seguir ofreciendo oportunidades de pasantía e investigación para los demás estudiantes, llenando la organización de nuevas ideas jóvenes.
- Capacitación más frecuente de todo el personal en actualizaciones, y más constancia en reuniones del club científico y de revistas.
- Fortalecer el campo y métodos de investigación en la clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashary, N., Tiwari, A., & Modi, D. (2018). *Embryo Implantation: War in Times of Love. Endocrinology, 159(2), 1188–1198.* doi:10.1210/en.2017-03082
- Barany, A. (2008). Historia de la reproducción asistida en Venezuela. In panamericana (Ed.), *Fertilidad y reproducción asistida* (pp. 3-12). Urbina - Lerner Biber.
- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., De Jonge, C. J., Lamb, D. J., Osorio Martini, F., McLachlan, R., ... Tournaye, H. (2017). *The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. Human Reproduction Update, 23(6), 660–680.* doi:10.1093/humupd/dmx021
- Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2011). Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update, 18(1), 73–91.* doi:10.1093/humupd/dmr039
- Brinsden, Peter R.; Brinsden, Peter R. (2009). Thirty years of IVF: The legacy of Patrick Steptoe and Robert Edwards. *Human Fertility, 12(3), 137–143.* doi:10.1080/14647270903176773
- Brugo, et al. (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. vol.54 no.4 Bogotá.
- Corrêa MCDV. Assisted reproduction technology and reproductive landscapes in a global era. *JBRA Assist Reprod. 2020 Jan 30;24(1):1-2.* doi: 10.5935/1518-0557.20190072. PMID: 31997631; PMCID: PMC6993172.
- Chu, D. S., & Shakes, D. C. (2012). *Spermatogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology, 171–203.* doi:10.1007/978-1-4614-4015-4_7.
- Chu, K. Y., Patel, P., & Ramasamy, R. (2019). Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Current Opinion in Urology, 29(3), 267–271.* doi:10.1097/mou.0000000000000590.

- Durand, M., & Sifer, C. (2013). *Échecs complets de fécondation après FIV ou ICSI : peut-on les prédire ? Conduite à tenir ? Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 41(12), 727–734. doi:10.1016/j.gyobfe.2013.10.003.
- ESHRE. (2009). INTRAUTERINE INSEMINATION. *Human Reproduction Update*, Vol.15, No.3, PP. 265- 277.
- Frydman, René (2018). Development of assisted reproductive medicine in Europe. *Fertility and Sterility*, 110(1), 12–13. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.05.014.
- García-Vázquez, F., Gadea, J., Matás, C., & Holt, W. (2016). *Importance of sperm morphology during their transport and fertilization in mammals. Asian Journal of Andrology*, 0(0), 0. doi:10.4103/1008-682x.186880.
- Geyter, C. (2019). *Assisted reproductive technology: impact on society and need for surveillance. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. doi:10.1016/j.beem.2019.01.004.
- Gershon, E., & Dekel, N. (2020). *Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4565. doi:10.3390/ijms21124565.
- Huang, J. Y. J., & Rosenwaks, Z. (2014). *Assisted Reproductive Techniques. Human Fertility*, 171–231. doi:10.1007/978-1-4939-0659-8_8.
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). *Genetics of male infertility. Nature Reviews Urology*, 15(6), 369–384. doi:10.1038/s41585-018-0003-3.
- Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). *Spermatogenesis. Human Reproduction*, 13(suppl 1), 1–8. doi:10.1093/humrep/13.suppl_1.1.
- Lawrenz, B., Coughlan, C., & Fatemi, H. M. (2019). *Individualized luteal phase support. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 31(3), 177–182. doi:10.1097/gco.0000000000000530.
- Lerner, j. (2008). técnicas de reproducción asistida de alta complejidad. *Infertilidad y reproducción asistida* (pp. 393). Urbina - Lerner Biber.

- Levy, M., Ibarra, P., & Garcia, j. (2008). Técnicas de reproducción asistida de baja complejidad. In Panamericana (Ed.), *Fertilidad y Reproducción asistida* (pp. 353). Urbina - Lerner Biber.
- Lonergan, P., & Fair, T. (2016). *Maturation of Oocytes in Vitro. Annual Review of Animal Biosciences, 4(1), 255–268.* doi:10.1146/annurev-animal-022114-110822 .
- Lopez, N. (2012). El precio del «milagro» de los nacimientos por las técnicas de fecundación. En *cuadernos de bioetica* (paginas. 421-466).
- Mackenna, I., & Catalina Hitschfeld, B. (2010). *Inseminación intrauterina. Revista Médica Clínica Las Condes, 21(3), 433–439.* doi:10.1016/s0716-8640(10)70555-1.
- Manna, C., Nanni, L., Lumini, A., & Pappalardo, S. (2013). *Artificial intelligence techniques for embryo and oocyte classification. Reproductive BioMedicine Online, 26(1), 42–49.* doi:10.1016/j.rbmo.2012.09.015.
- Martínez-Granados, L., Serrano, M., González-Utor, A., Ortiz, N., Badajoz, V., ... Olaya, E. (2017). *Inter-laboratory agreement on embryo classification and clinical decision: Conventional morphological assessment vs. time lapse. PLOS ONE, 12(8), e0183328.* doi:10.1371/journal.pone.0183328.
- Mata-Miranda, Mónica Maribel, & Vázquez-Zapién, Gustavo Jesús. (2018). La fecundación in vitro: Louise Brown, a cuatro décadas de su nacimiento. *Revista de sanidad militar, 72(5-6), 363-365.* Epub 23 de agosto de 2019. de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301696X2018000400363&lng=es&tlng=es.
- Moura, Marisa Decat de, Souza, Maria do Carmo Borges de, & Scheffer, Bruno Brum. (2009). Reprodução assistida: Um pouco de história. *Revista da SBPH, 12(2), 23-42.* de http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-08582009000200004.

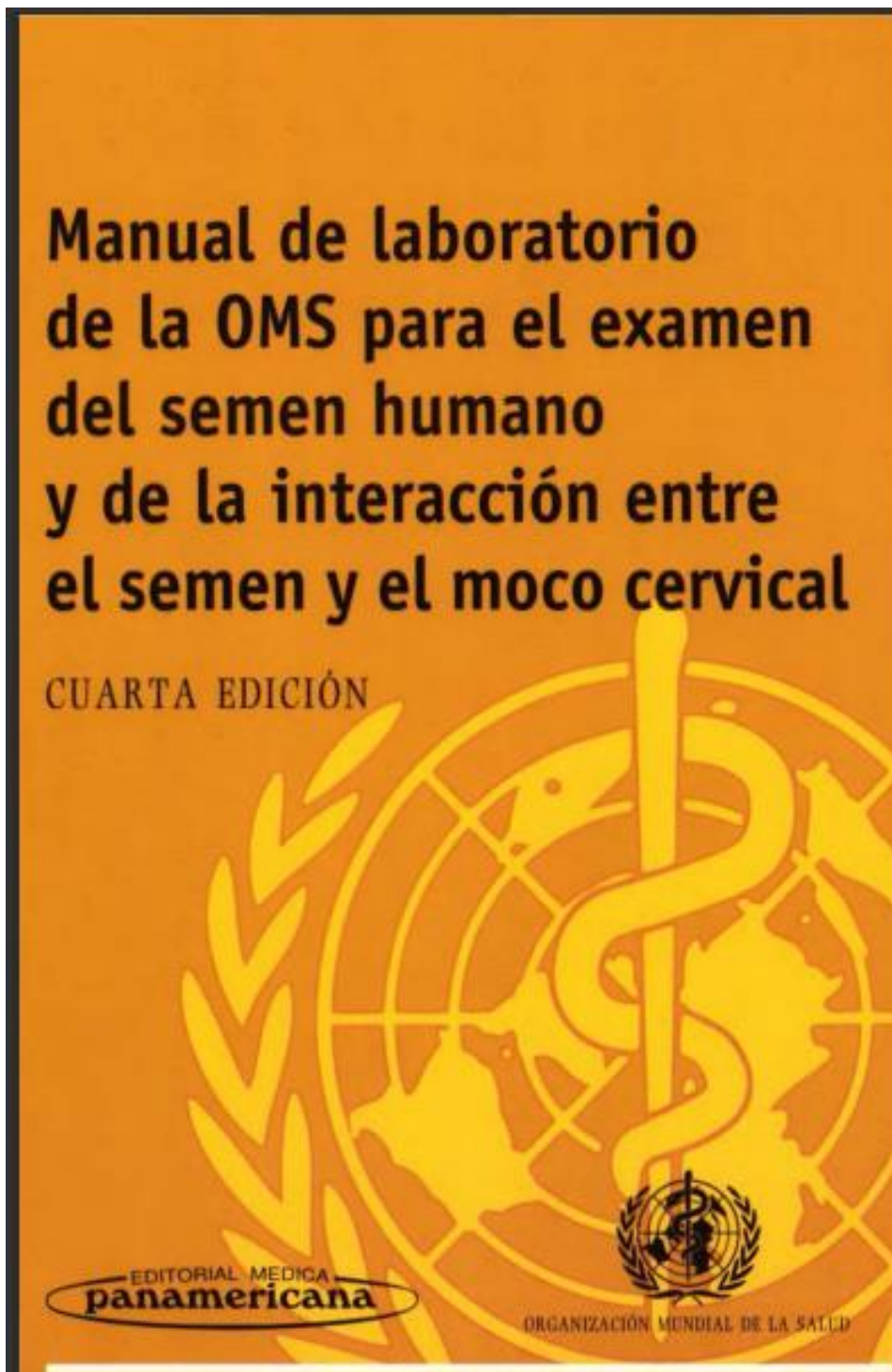
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). *Spermatogenesis in humans and its affecting factors*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 10–26. doi:10.1016/j.semcd.2016.04.009.
- Ombelet, W., Deblaere, K., Bosmans, E., Cox, A., Jacobs, P., Janssen, M., & Nijs, M. (2003). Semen quality and intrauterine insemination. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(4), 485–492. doi:10.1016/s1472-6483(10)61894-9 .
- Ombelet, W., Campo, R., Bosmans, E., & Nijs, M. (2008). *Intrauterine insemination (IUI) as a first-line treatment in developing countries and methodological aspects that might influence IUI success*. *ESHRE Monographs*, 2008(1), 64–72. doi:10.1093/humrep/den165.
- OMS. (14 de septiembre de 2020). Infertility. Obtenido de *World health organization*: <https://sochog.cl/wp-content/uploads/2020/10/Infertility.pdf>.
- Peultier, A.-S., Fréour, T., Cazenave, N., & Barrière, P. (2015). *Les échecs de fécondation en FIV et en ICSI*. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction*, 44(4), 380–386. doi:10.1016/j.jgyn.2014.07.010.
- Piltonen, T. T. (2019). *Luteal phase deficiency: are we chasing a ghost?* *Fertility and Sterility*, 112(2), 243–244. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.06
- Rajender, S., Avery, K., & Agarwal, A. (2011). *Epigenetics, spermatogenesis and male infertility*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 727(3), 62–71. doi:10.1016/j.mrrev.2011.04.002
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., & Dekel, N. (2016). *Ovarian Folliculogenesis*. *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*, 167–190. doi:10.1007/978-3-319-31973-5_7 .
- Rojas Quintana, Práxedes, Medina Tío, Dulce, & Torres Ajá, Lidia. (2011). Infertilidad. *MediSur*, 9(4), 340-350, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727897X2011000400012&lng=es&tlng=es.
- Rocha, J. C., Passalia, F., Matos, F. D., Maserati Júnior, M. P., Alves, M. F., Almeida, T. G. de, ... Nogueira, M. F. G. (2016). *Methods for assessing the*

quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? JBRA Assisted Reproduction, 20. doi:10.5935/1518-0557.20160033.

- Santamaría, L. (2000). TECNICAS DE REPRODUCCION ASISTIDA ASPECTOS BIOETICOS, Tomado de: <http://aebioetica.org/revistas/2000/1/41/37.pdf>.
- Shiraishi, K., & Matsuyama, H. (2017). *Gonadotropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders [Review]. Endocrine Journal, 64(2), 123–131.* doi:10.1507/endocrj.ej17-0001.
- Stern, Judy E.; McLain, Alexander C.; Buck Louis, Germaine M.; Luke, Barbara; Yeung, Edwina H. (2016). Accuracy of Self-Reported Survey Data on Assisted Reproductive Technology Treatment Parameters and Reproductive History. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, (), S0002937816002945–.* doi: 10.1016/j.ajog.2016.02.010.
- Teh, W.-T., McBain, J., & Rogers, P. (2016). *What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 33(11), 1419–1430.* doi:10.1007/s10815-016-0773-6.
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). *Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clinical Biochemistry.* doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.
- Vasquez, F., Echeverry D. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Salud Uninorte Barranquilla, Vol. 23 (2):* pp. 220-230.
- Yanushpolsky, E. (2015). *Luteal Phase Support in In Vitro Fertilization. Seminars in Reproductive Medicine, 33(02), 118–127.* doi:10.1055/s-0035-1545363.
- Yang, X., Gilman-Sachs, A., & Kwak-Kim, J. (2019). *Ovarian and endometrial immunity during the ovarian cycle. Journal of Reproductive Immunology.* doi:10.1016/j.jri.2019.04.001.
- Yeste, M., Jones, C., Amdani, S. N., & Coward, K. (2017). *Oocyte Activation and Fertilisation: Crucial Contributors from the Sperm and Oocyte. Signaling-Mediated Control of Cell Division, 213–239.* doi:10.1007/978-3-319-44820-6_8.

- Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). *Physiological and molecular determinants of embryo implantation*. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(5), 939–980. doi:10.1016/j.mam.2012.12.011.
- Zegers-Hochschild, F., Schwarze, J. E., Crosby, J. A., Musri, C., & Urbina, M. T. (2019). assisted reproductive techniques in latin america: the latin american registry, 2016. *Reproductive BioMedicine Online*. doi:10.1016/j.rbmo.2019.04.129.

Anexo 1.



Anexo 2

MANUAL DE LABORATORIO

ANDROLOGIA

ESPERMOGRAMA

PROCEDIMIENTO:

RECOGIDA DE LA MUESTRA

El método de recogida de la muestra y su transporte al laboratorio son de importancia vital para un estudio correcto de las características del semen. Así, se debe informar a los pacientes tanto como por escrito como de forma oral los siguientes aspectos:

- Se debe respetar un periodo de abstinencia sexual de 2 – 7 días.
- La muestra se ha de obtener por masturbación directamente en un envase plástico estéril, en las salas disponibles para ello en la clínica. Si no fuera posible, deberá ser entregada a laboratorio antes de la hora de recogida.
- En ningún caso se debe utilizar preservativos normales, ya que estos contienen lubricantes y espermicidas. En caso de paraplejia o dificultades de la erección se puede utilizar estimulaciones mecánicas como vibrador o incluso electro eyaculación.
- Tampoco se obtendrá la muestra mediante *coito interruptus*, ya que se puede perder la primera fracción del eyaculado que contiene la mayor concentración espermática. Además, se puede producir contaminación bacteriana y, por otro lado, el pH ácido del flujo vaginal afecta negativamente a la motilidad de los espermatozoides.
- El recipiente estará correctamente etiquetado con los datos del paciente, así como la fecha, la hora de recogida de la muestra y los días de abstinencia sexual.

INSTRUCCIONES PARA LA RECOGIDA DE LA MUESTRA SEMEN.

Antes de recoger la muestra es conveniente que lea atentamente las siguientes instrucciones para evitar el riesgo de contaminación de la muestra de semen durante el proceso de recogida.

1. Antes de proceder a la obtención de la muestra debe lavarse minuciosamente las manos con agua y jabón.
2. Abra la bolsa de plástico que envuelve el contenedor estéril donde se va a recoger la muestra de semen.
3. Desenrosque la tapa del contenedor, pero no lo deje abierto.
4. Retire el prepucio y lave la zona con agua y jabón.
5. Recoja la muestra de semen en el contenedor y ciérrelo.
6. Entregue la muestra de semen antes que hayan transcurrido de 30 a 45 minutos desde su obtención.

EXAMEN DEL SEMEN FRESCO.

El propósito fundamental del análisis de semen radica en evaluar los parámetros descriptivos clásicos de un eyaculado producido por masturbación. Aunque de los resultados de este análisis no es posible deducir si un varón puede llegar a ser padre biológico o no. Ya que no existen propiedades específicas que permitan valorar la capacidad fecundante de los espermatozoides que pueden llegar al lugar de la fecundación, un espermograma puede proporcionarnos información esencial del estado clínico del varón y puede, además ser de ayuda en la investigación de las posibles causas de la infertilidad, las características macroscópicas que se deben analizar en el examen de una muestra seminal en fresco son: el aspecto, la licuefacción, el pH y el volumen. En cuanto al examen microscópico se evalúa concentración, movilidad, vitalidad, presencia de detritos y otros elementos celulares del semen, la aglutinación entre espermatozoides y finalmente la morfología.

En 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) editó un manual de laboratorio (laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.WHO), para establecer las primeras directrices del estudio de muestras seminales y dictar los criterios de normalidad con el fin de evitar variaciones entre los diferentes análisis. Estos parámetros han sido revisados en diferentes ocasiones, la última de ellas en el 2010 (Cuadro 1).

	1999, 4 ^a edición ³	2010, 5 ^a edición ⁴
	Valor de referencia	Límite inferior de referencia, LRL
Licuefacción	Total a los 60 min	Total a los 60 min
pH	7,2-7,8	≥7,2
volumen	2,0 mL	1,5 mL (1,4-1,7)
Concentración espermática	20 x 10 ⁶ /mL	15 x 10 ⁶ /mL (12-15)
Concentración total	40 x 10 ⁶	39 x 10 ⁶ (33-46)
Motilidad total (progresivos + no progresivos)	No detallada	40% (38-42)
Motilidad progresiva	50%	32% (31-34)
Viabilidad	75%	58% (55-63)
Formas normales	15%	4% (3-4)
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ /mL	< 1 x 10 ⁶ /mL
Mar test	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas
"Immunobeads"	< 50 % esp. unidos a partículas	< 50 % esp. unidos a partículas

Cuadro 1. Valores de referencia (1999) y los nuevos (2010) del límite de referencia inferior (LRI) en espermograma-

EXAMEN MACROSCOPICO:

- **ASPECTO:** el aspecto del semen se valorará según su color, su opacidad o transparencia y la presencia de cuerpos mucosos o gelatinosos. El semen del varón es normalmente su líquido homogéneo opalescente de color blanquecino amarillento.

- **LICUEFACCION Y VISCOSIDAD:** una muestra de semen normal se licúa aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente, pero si al cabo de 60 minutos la muestra no ha completado la licuefacción, deberá hacerse constar esta circunstancia en el informe.

-**VOLUMEN:** el volumen del eyaculado debe medirse con un tubo graduado. No deben usarse jeringuillas de plástico que no estén testadas para uso con gametos o embriones, porque pueden afectar a la movilidad espermática y porque sus agujas no son seguras.

-**pH:** de la muestra licuada se mide normalmente con tiras de papel, con sensibilidad de 6,5 a 10,0. Se pone sobre la tira de papel una gota semen. Al cabo de 30 segundos, el color de la zona impregnada debe ser uniforme y se compara con la tira de calibración para leer pH.

EXAMEN MICROSCOPICO:

- **CONCENTRACION:** la determinación de la concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por mililitro de semen) y de su cantidad total en el líquido eyaculado (millones de espermatozoides por eyaculación) es muy importante, ambos parámetros se consideran fundamentales para evaluar la calidad del eyaculado.
- El método más exacto para determinar la concentración espermática es por medio de cámara Neubauer o de cámara Mackler, esta última consta de una cuadrícula de 1mm² dividida en 100 cuadros con una profundidad de 10microm, los espermatozoides contados en 10 de estos cuadros corresponden a una concentración de millones por mililitro, se debe llenar la muestra con una cantidad de 10 microlitros

Si en la observación inicial no se encuentran ningún espermatozoide, se debe centrifugar la muestra.

-MOVILIDAD: el análisis de la movilidad de los espermatozoides de la muestra de semen se hará contando solamente los espermatozoides libres y nunca los que estén agregados entre sí o a otras células, se llevará a cabo el recuento de los espermatozoides móviles e inmóviles en varios campos. Existen cuatro categorías de espermatozoides en función de movilidad que presentan:

- Tipo A:** móviles progresivos rápidos, se desplazan de forma rectilínea y rápida.
- Tipo B:** móviles progresivos lentos, se desplazan más lentamente, de forma rectilínea o en curvas.
- **Tipo C:** móviles no progresivos: se mueven, pero no se desplazan.
- Tipo D:** inmóviles, no se mueven en absoluto.

El resultado de movilidad se presentará como porcentajes.

- **VITALIDAD:** refleja los espermatozoides que están vivos, que no siempre coinciden con los que presentan movilidad, es muy importante no confundir astenozoospermia (espermatozoides inmóviles) total con necrozoospermia (espermatozoides muertos) total, para esto se puede utilizar el método de tinción con eosina.

TINCION VITAL CON EOSINA:

Esta técnica se basa en el principio en que las células muertas que presentan alteraciones de la membrana plasmática absorben determinadas tinciones como, por ejemplo, la de eosina, el protocolo de tinción es el siguiente:

- preparar una solución de eosina de 0.5% (5 g/l) en una solución acuosa al 0,9% (9 g/l).
- mezclar (1:1) el semen fresco con la solución de eosina.
- después de 1 o 10 minutos poner la mezcla en el portaobjetos y tapar con un cubreobjetos para observar la preparación a 40 aumentos con luz brillante o contraste de fases.
- Contar los espermatozoides no teñidos (vivos) y los no teñidos (muertos) expresados en porcentajes.

-MORFOLOGIA: la evaluación morfología del espermatozoide es uno de los parámetros del espermiograma habitual, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) ello implica el análisis de la normalidad estructural del espermatozoide, caracterizando sus 3 partes principales (cabeza, pieza media y cola) para leer la morfología se realiza el siguiente proceso:

- una vez licuada la muestra seminal en fresco, se toman 10 microlitros y se depositan en un portaobjetos perfectamente limpio.
- se realiza una extensión de la muestra con ayuda de otro portaobjetos
- se deja secar la placa al aire
- se tiñe para conservarla al microscopio óptico, con aceite de inmersión, con el objetivo de 100 aumentos.

La OMS recomienda como técnica de tinción de espermatozoides la de Papanicolau, pero dado que es muy laboriosa se recomienda usar en los laboratorios de andrología técnicas de tinción Diff-Quick (Hemacolor)

Tinción Hemacolor:

El protocolo de esta tinción es el siguiente:

- Preparar la placa como se mencionó anteriormente.
- Dejar placa 30 segundos en solución 1. Fijación.
- 15 segundos en solución 2. Eosina.
- 15 segundos en solución 3 Hematoxilina.

- Lavar con solución 4. Buffer.
- Lavar la placa con agua destilada.
- Dejar secar la placa al aire.

Se cuentan 2 veces 100 espermatozoides donde se analiza la estructura normal según el manual laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.WHO.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

En la preparación de las muestras de espermatozoides para la reproducción asistida se puede usar cualquiera de los medios para embriones suplementado con SSS o suero natural 7 o 10%.

Una vez obtenida la muestra de semen, por masturbación, se debe permitir la licuefacción por mínimo 30 minutos a 37° C. Si al cabo de este tiempo el semen permanece no licuado, se puede inducir su licuefacción haciéndolo pasar por una jeringa de una aguja No. 21, por una o más veces. Una vez obtenida la licuefacción, se deben valorar los diferentes parámetros espermáticos según los criterios de la OMS. Luego se procede a la separación espermática por diferentes técnicas, siendo las más usadas swim-up o gradientes de densidad.

A. SWIM-UP

Esta técnica debe ser usada cuando la muestra de semen tiene una valoración normal en sus parámetros espermáticos de acuerdo con el criterio de la OMS.

i) Materiales:

Medio de cultivo, (WASH)
Tubos Falcon
Pipetas Pasteur estériles o pipetas volumétricas de 1 ml

ii) Procedimiento:

1. En un tubo cónico depositar el semen licuado y agregar el medio de cultivo en un volumen 1:1 homogenizar y centrifugar.
2. Centrifugar por 10 minutos a 1000 rpm
3. Desechar sobrenadante. Cuidando de no alterar el pellet formado, depositar sobre éste 1 ml de medio y colocar el tubo en una gradilla, con una inclinación de 45° y dejar en incubadora por 30 o 60 minutos a 37°C.
4. Recoger el sobrenadante en otro tubo y evaluar la concentración, motilidad y morfología según el criterio de la OMS.
5. Hacer las diluciones respectivas hasta obtener la concentración deseada.

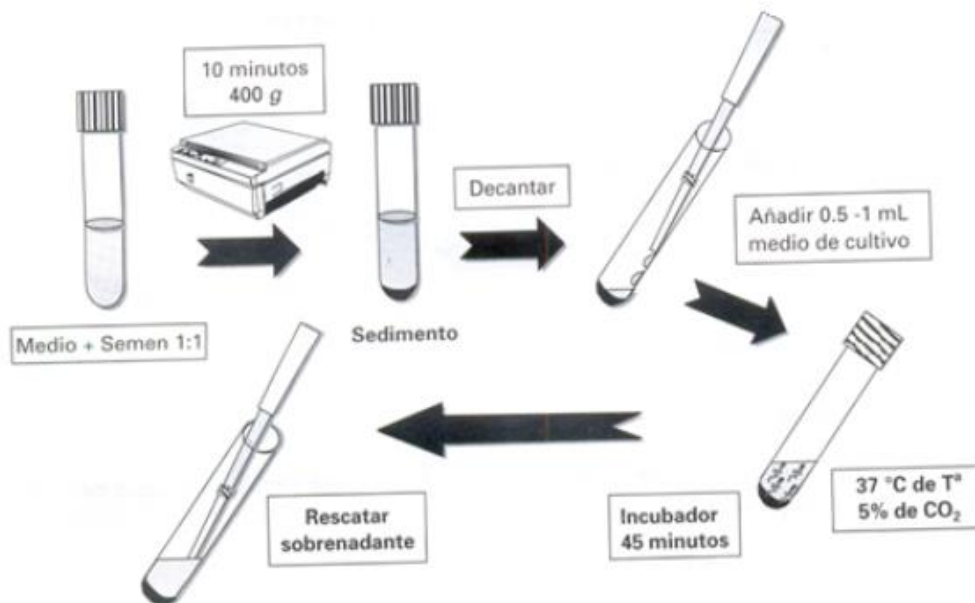


Figura 1. Procedimiento de la técnica de capacitación espermática swin up.

B. GRADIENTES DE DENSIDAD

Esta técnica se usa cuando la muestra de semen pertenece a pacientes oligospermicos.

i) Materiales:

Tubos cónicos Falcon.

Pipetas Pasteur estériles.

Pipetas volumétricas de 1 ml.

Medio de cultivo para gradientes.

ii) Procedimiento:

1. Realizar los gradientes de 90 y 45%.
2. Depositar en un tubo cónico en el fondo de este el gradiente de 90%, por las paredes del tubo sobre este depositar cuidadosamente el gradiente de 45%, de modo que los diferentes gradientes se vean separados por un menisco de interfase.
3. Depositar suavemente sobre el gradiente de menor concentración 1 ml de semen.
4. Centrifugar a 1000 rpm por 20 minutos.
5. Aspirar el pellet y parte del gradiente de mayor concentración con la ayuda de una pipeta Pasteur y re suspender en 5 ml de medio de cultivo.
6. Centrifugar por 10 minutos.
7. Desechar el sobrenadante y re suspender el pellet en 500µl.

8. Llevar a incubadora por 10 minutos, pasado este tiempo evaluar la concentración y motilidad.
9. Realizar las diluciones respectivas, y dejar en incubadora a 37°C hasta el momento de usar.

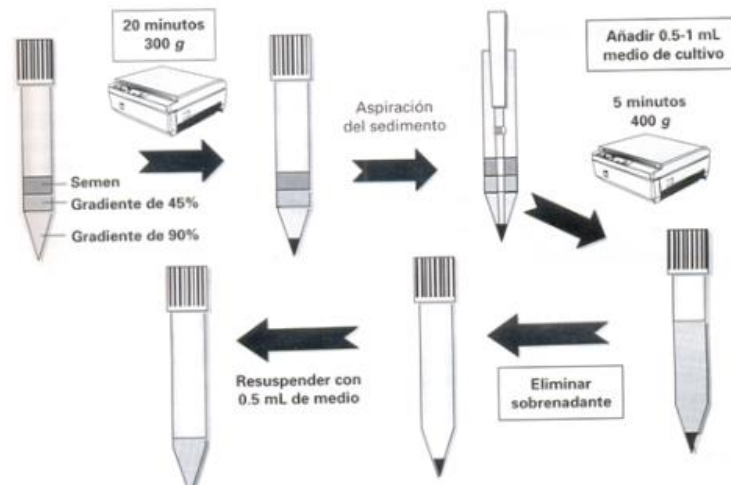


Figura 2. Procedimiento de la técnica de capacitación espermática Gradientes de densidad.

INSEMINACIONES INTRAUTERINAS

Para realizar las inseminaciones la muestra debe ser evaluada en cuanto a concentración, motilidad y volumen, posteriormente se le realiza la metodología de recuperación espermática (capacitación), este procedimiento es igual que el que se realiza para FIV, la muestra preparada se guarda en la incubadora hasta que la paciente esta lista para la inseminación.

CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Los procesos vitales requieren de cambios bioquímicos que se llevan a cabo a través del movimiento de moléculas en un medio acuoso. Si el agua dentro y fuera del citoplasma de una célula viva, es convertida en hielo a temperaturas suficientemente bajas para detener el movimiento molecular, y si el sistema

biológico puede ser recalentado sin daño, entonces la vida de la célula detenida en este estado de animación suspendida podrá ser preservada.

Aplicaciones de la Congelación de Semen.

1. Banco de semen
2. Pacientes oligoastenozoospermicos.
3. Tratamientos quirúrgicos o de quimioterapia.
4. Semen de pareja ausente.

Técnica.

CONGELACIÓN: Una vez obtenida la muestra en un recipiente estéril, se espera de 30 a 60 minutos a su licuefacción completa y se realiza un conteo espermático de control.

- A. Colocar a temperatura ambiente el crioprotector (Freezing Medium de Irvine Scientific) por 10 – 15 min. En un volumen igual al del semen.
- B. Añadir al semen por las paredes del tubo lentamente la solución crio protectora en una proporción 1:1 con respecto al semen
- C. Poner el semen el criotubes, previamente marcados (Nombre, cedula, fecha de congelación y código) se los coloca en la nevera por 30 minutos.
- D. Transcurrido este tiempo, se colocan en vapores de nitrógeno líquido (10 cms por arriba del nitrógeno) por 30 minutos.
- E. Posteriormente realizar la inmersión de los criotubes en el nitrógeno, y llevar al tanque de almacenamiento en sus respectivas canastillas.

-DESCONGELACIÓN:

- A. Retirar criotubes del tanque de almacenamiento, y dejarlos 5 minutos a temperatura ambiente
- B. Destapar los criotubes expulsar gases, y volver a tapar inmediatamente
- C. Dejar criotubes en incubadora a 37°C por 20 minutos, posteriormente se aconseja antes de usarlo realizar capacitación espermática.

Nota: Todos los procedimientos se ha adaptado según en manual, laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus intraction de la OMS Y el Manual práctico de esterilidad y reproducción humana de J. Remohi

ANEXO 3.

MANUAL DE LABORATORIO FIV-ICSI

MEDIOS DE CULTIVO.

LITEOIL Ref LGOL

Aceite mineral altamente purificado, de mediana viscosidad, sirve para mantener la estabilidad del medio y temperatura durante el cultivo embrionario

GLOBAL FOR FERTILIZATION Ref LGTF

Se utiliza para la cultivo y fertilización de ovocitos humanos

GLOBAL TOTAL Ref LGGT

Cultivo de embriones humanos desde cigoto a blastocisto y transferencia de embriones

GLOBAL TOTAL WASH / HEPES Ref LGTH

Medio con HSA, se usa para lavado y manipulación de ovocitos, incluido el ICSI

ASPIRACION FOLICULAR

DIA ANTERIOR A LA ASPIRACIÓN FOLICULAR

Se recomienda dejar preparadas las cajas de Petri previamente marcadas con el nombre de la paciente desde el día anterior (figura 1) con medio de cultivo Global Total for Fertilization, y llevar las cajas a la incubadora a 37°C y CO₂ 5%.

El número de cajas a preparar debe estar de acuerdo con el número de folículos que se espera aspirar en cada paciente.

También se debe dejar a aclimatar Aceite mineral, Y medio de cultivo Global Total W/HEPES la cantidad de aceite y medio depende de la cantidad de folículos a aspirar por paciente

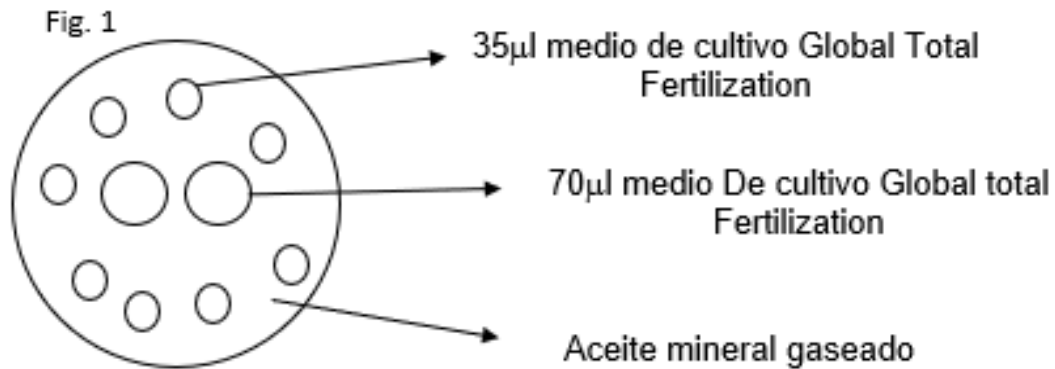


Figura 1. Caja de cultivo a preparar un día antes de la aspiración folicular.

DIA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR

Redondear puntas de pipetas Pasteur de 9' con la ayuda de un mechero, colocar en 1 tubo cónico 4ml de Global Total W/HEPES y pasarlo a la sala de procesos, para el lavado de la aguja de aspiración

Procedimiento:

1. Después de recibir el tubo con el líquido folicular, depositar el contenido del tubo en una caja de Petri grande.
2. Revisar bajo el Estereoscopio la presencia de 1 o más complejos de cúmulo-corona-ovocitos (CCO).
3. Ubicado un CCO, transferirlo con la ayuda de una pipeta Pasteur 9' redondeada a la caja de Petri lavar 2 a 3 veces.
4. Transferir el CCO lavado a caja de Petri que se preparó día anterior que contiene el medio de cultivo, hacer de 2 a 3 lavados en las gotas centrales, pasar a las gotas de alrededor y dejar estabilizarlo por lo menos una hora.
5. Evaluar la madurez de los CCO bajo el microscopio invertido, y clasificarlos de acuerdo con la morfología del cúmulo y corona.

CLASIFICACIÓN DE LA MADUREZ SOMÁTICA DEL CCO

La clasificación del CCO se realiza atendiendo al:

- a) Tamaño y filancia del cúmulo.
- b) Grado de dispersión de las células del cúmulo y de la corona

La base de estos criterios se puede realizar así:

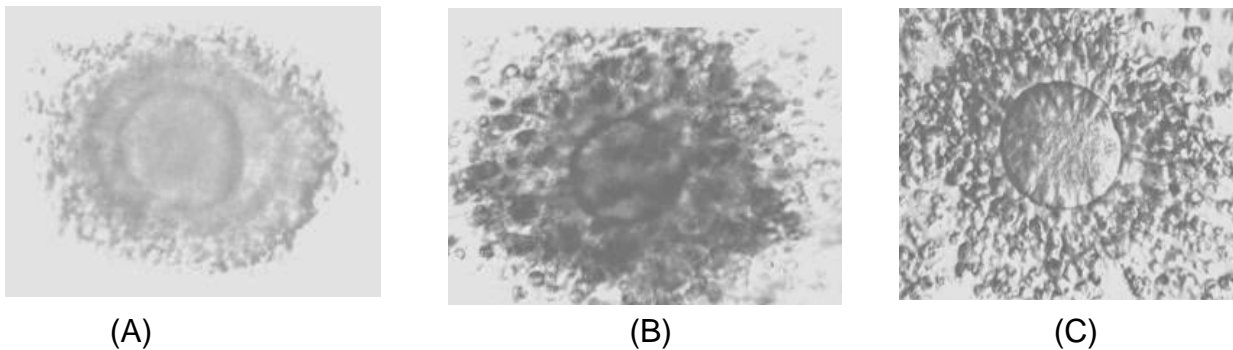


Figura 2. Clasificación de CCO. (A). Vesícula Germinativa – Profase. (B). Metafase I Intermedia (C). Metafase II – Maduro.

Vesícula Germinativa (VG) o Profase (Inmaduro): Cúmulo pequeño o grande, con poca filancia, corona compacta formando una capa densa alrededor del ovocito (Fig. 2. (A))

Metafase I (Intermedio): Cúmulo grande, disperso y filante. Corona con inicio de dispersión (con pequeños espacios entre sus células), pero aun formando una capa densa alrededor del ovocito. (Fig. 2. (B)).

Metafase II (Maduro): Cúmulo grande, disperso y filante, corona radiada característica, con espacios entre las células en forma de rayos, pudiendo observarse los límites del ovocito. (Fig. 2. (C)).

FIV (FERTILIZACION IN VITRO)

El número de espermatozoides que generalmente se usan para la fecundación *in vitro* varía entre 50.000 y 100.000 /ml. Sin embargo, concentraciones de 25.000 a 1'000.000 /ml también son usadas sin grandes diferencias en las tasas de fecundación.

1. Preparar las cajas Petri con gotas de 35 microlitros de medio Global Total for Fertilization. Preparar estas cajas por lo menos una hora antes de la inseminación con la finalidad de permitir que se equilibre la temperatura y tensión de CO₂ de la incubadora.
2. Con la ayuda de una micropipeta, inseminar con 50.000 o 100.000 espermatozoides en cada gota (añadir microlitros suficientes dependiendo de la concentración de la muestra) Es conveniente que el volumen que contenga los espermatozoides no sea mayor de 20µl.
3. Colocar uno ovulo en cada pozo para ser inseminados.
4. Dejar la caja de 15 – 18 horas en la incubadora. Este es el tiempo adecuado para observar los pronúcleos (PN) y comprobar la fecundación.

EVALUACION DE FECUNDACION.

1. Estirar con la ayuda del mechero aproximadamente 5 pipetas Pasteur de 9´ en diferentes diámetros.
2. Denudar los Ovocitos con las pipetas estiradas, succionando y botando repetidamente el ovocito hasta que la corona se desprenda.

3. Pasar los ovocitos a la caja de cultivo nueva con Global Total, primero lavarlos en las gotas superiores y luego dejar un ovocito en cada gota.
4. Evaluar la fecundación identificando la presencia de dos pronúcleos (PN) en el citoplasma del ovocito y de dos corpúsculos polares en el espacio peri vitelino
5. Observar los PN en el microscopio invertido y evaluarlos para su clasificación (según Scott y Smith)
6. Guardar en incubadora nuevamente, revisar desarrollo en día 3.

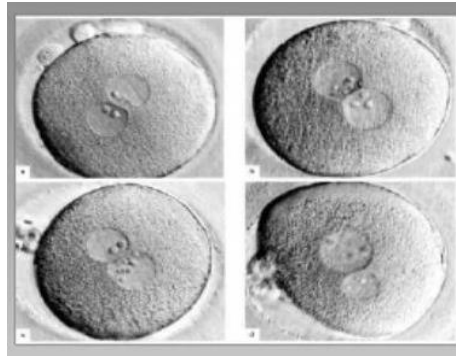


Figura 3 . Óvulos fecundados con 2 cuerpos polares y 2 pronúcleos.

Observar los PN en el microscopio invertido y evaluarlos para su clasificación (según Scott y Smith).

C1 : Nucleolos alineados e igual número

Halo positivo

Oposicionados en el centro

Citoplasma claro

Cuerpo Polar liso - redondo

C2 : Nucleolos no alineados e igual número

Citoplasma claro

Halo positivo
Oposicionados en el centro
Cuerpo polar alargado

C3 : Nucleolos no alineados diferente número - mezclados (pequeños - grandes)
Halo positivo y/o negativo
Oposicionados en el centro
Cuerpo polar fragmentado

C4: Nucleolos pequeños
Diferente número un PN alineado y el otro PN no alineado
Pronúcleos de tamaño desigual
Cuerpo polar grande o fragmentado

EVALUACION DE EMBRIONES DIA 3.

El criterio para evaluar la calidad embrionaria se realiza a las 48 h. Post-aspiración atendiendo el número y morfología de las blastómeras y la presencia de fragmentación celular. Con este criterio se puede realizar la siguiente clasificación de los embriones junto con la evaluación según Tesarik.

GRADO I: Embrión con blastómeras de igual tamaño (simétricos). Sin presencia de fragmentación y con citoplasma claro y homogéneo. (Fig. 4. A.) con un núcleo en cada una de sus blastómeras, clivaje de las 23 h - 28 h. Post - inseminación.

GRADO II: Embrión con blastómeras simétricas y con fragmentación de 10 - 20%. (Fig. 5. b), con por lo menos 3 núcleos en 3 de sus blastómeras, Singamia de las 23 h - 28 h. Post - inseminación.

GRADO III: Embrión con blastómeras asimétricas o con 20 - 50% de fragmentación. (Fig. 5.c), con dos ó un núcleo en dos ó una blastómera, en pronúcleos a las 23 h - 28 h. Post - inseminación.

GRADO IV: Embrión con clivaje asimétrico y fragmentación blastomera mayor de 50%. (Fig. 5.d), no se aprecian núcleos en sus blastómeras.

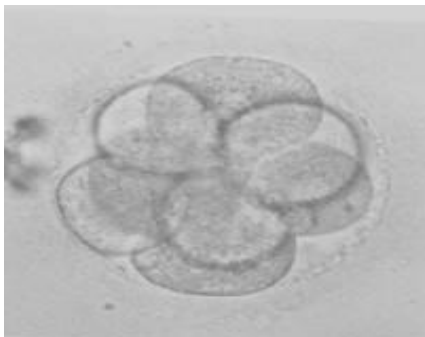


Figura 4. A. Embrión Grado I



Figura 4. B. Embrión Grado II

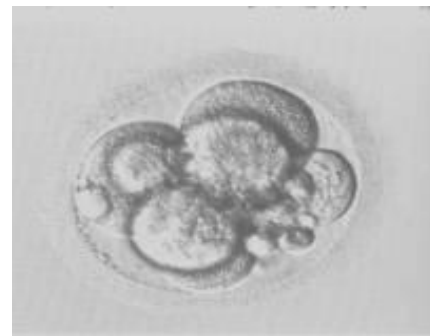
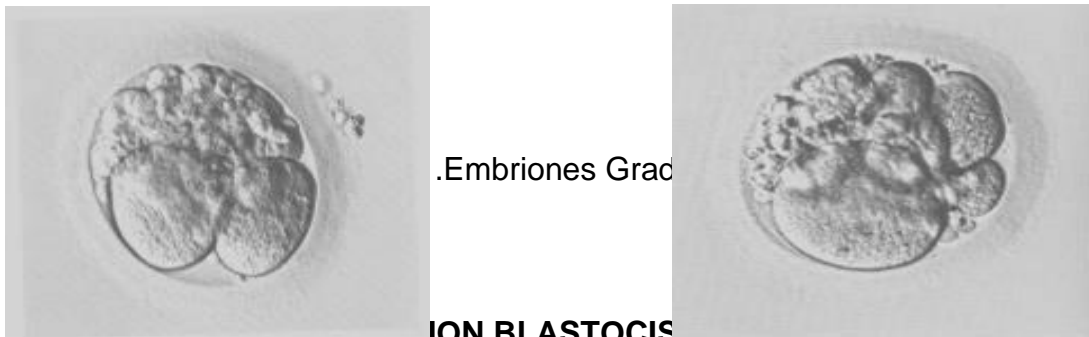


Figura 4. C. Embriones Grado III.



TIPOS DE BLASTOCISTOS:

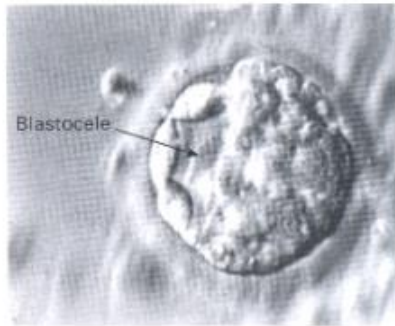
BT: BLASTOCISTO TEMPRANO: comienza a formarse la cavidad y empieza la diferenciación celular.

BC: BLASTOCISTO CAVITADO: el blastocele ocupa más del 50% del volumen del embrión.

BE: BLASTOCISTO EXPANDIDO: se observa el blastocele rodeado por una monocapa celular o Trofotodermo, que formará la placenta y una masa celular interna que dará lugar al embrión.

BHi: BLASTOCISTO EN ECLOSION O HATCHING: el blastocisto comienza a salir a través de la zona Pelucida.

BH: BLASTOCISTO ECLOSIONADO O HATCHED: el blastocisto está completamente fuera de la zona Pelucida.



Blastocisto Temprano



Blastocisto Cavitado



Blastocisto Expandido



Blastocisto comienza a salir

Figura 5. Tipos de blastocistos.

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

1. Dejar medio de cultivo Global Total mínimo una hora antes en incubadora a 37°C, para la posterior transferencia, hasta el momento de la transferencia.

La reposición de los embriones se puede realizar en las trompas o en el útero. La transferencia intrauterina (IU) de embriones por vía vaginal, es la empleada en el Centro de Biomedicina Reproductiva Fedundar

CARGADO DE CATETER WALLACE

TIPO SÁNDWICH

Al catéter que se va a emplear se le acopla una jeringuilla de insulina o Hamilton: Primero se aspira una pequeña cantidad de aire, que nos servirá al realizar la transferencia para vaciar completamente el catéter. A continuación se toman 5 ml de medio de cultivo y se deja un corto espacio de aire antes de aspirar los embriones con la menor cantidad de medio posible, enseguida debe quedar otro espacio de aire.

Por último, se aspira un poco más de medio (5 microlitros aproximadamente). Después de cargar los embriones en el catéter, quedan ubicados como se ilustra (Figura 6).

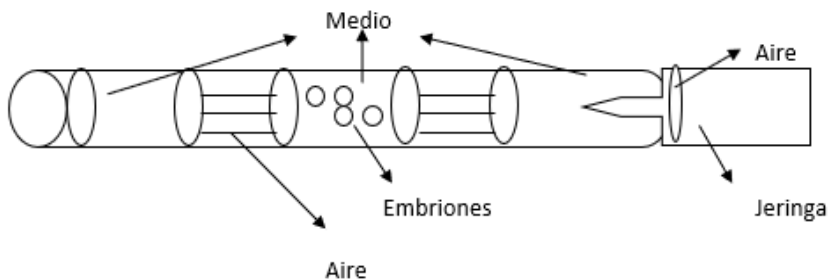


Figura 6. Método de carga de catéter de tipo sándwich.

TIPO COLUMNA

Al catéter que se va a emplear se le acopla una jeringuilla de insulina o Hamilton: Primero se aspira una cantidad de medio (aproximadamente 0.2 ml), se suelta la jeringa, se deja el catéter en posición horizontal se deja caer una gota del medio, se inserta nuevamente la jeringa la cual está previamente con un poco de aire (aproximadamente 0.01 ml), que nos servirá al realizar la transferencia para vaciar completamente el catéter. A continuación, se procede a cargar el catéter con medio más embriones una cantidad de 20 - 30 microlitros, quedan ubicados como se ilustra (Figura 7).



Figura 7. Método de carga de catéter de tipo columna.

Después de ubicar el orificio cervical, el catéter es introducido en el endocervix y los embriones son expulsados suavemente al interior de la cavidad uterina.

Finalizada la transferencia la Bióloga revisa el catéter sobre la caja de Petri de transferencia aspirando y soltando medio para verificar que no haya quedado ningún embrión adherido a las paredes del catéter. En caso de encontrar un embrión o más se procede a nuevamente a cargar el catéter y transferir a la cavidad uterina como se indicó anteriormente.

ICSI (FECUNDACIÓN ASISTIDA: INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES)

La metodología es igual que para FIV en el día antes de la aspiración folicular. Para el día de la aspiración folicular después de ser aspirados y dejar por lo menos dos tres horas dentro de la incubadora pasado este tiempo proceder a denudarlos.

1. Preparar una solución de Hialuronidasa en medio tamponado conteniendo UI/ml Este se obtiene agregando 1 ml de medio tamponado con Hepes al vial, luego alicuotar en tubos 10 μ l y dejar en nevera cubiertos con papel aluminio hasta el momento de usar y preparar una o varias cajas de Petri con las gotas superiores de hialuronidasa y las otras gotas con medio tamponado con Hepes.

2. Preparar desde el día anterior el doble de la cantidad de cajas por folículo aspirado, esto con el fin de que en la mitad de estas cajas se dejan en cultivo los ovocitos hasta ser denudados y la otra mitad de cajas es para recibir los ovocitos ya denudados y donde van a permanecer hasta el día siguiente después de microinyectados.

DENUDACIÓN DE OVOCITOS

1. Con la ayuda de pipetas estiradas al mechero y dejadas en diferentes diámetros pasar cada ovocito a la microgota que tiene hialuronidasa, hasta desprender un poco las células de granulosa más o menos 15 segundos.
2. Pasar a la primera gota donde está el medio tamponado y pasar sucesivamente en cada gota con las diferentes pipetas, hasta desprender totalmente las células de granulosa. Esto se hace con el fin de quedar el ovocito libre de estas células y poder ver con facilidad el cuerpo polar, el cual nos va a servir de orientación para la microinyección.
3. Observar en cada uno de los ovocitos denudados la presencia del primer corpúsculo polar (metafase II) y la morfología citoplasmática.

Seleccionar para ICSI sólo los ovocitos en Metafase II y con citoplasma normal y luego guardarlos en incubadora hasta el momento de la microinyección. Los ovocitos que no se encuentran en Metafase II se guardan en la incubadora y se pueden volver a examinar en el microscopio 3 o 4 horas más tarde para ver si han evolucionado hasta MII.

1. Preparar el PVP (polivinilpirrolidona) mínimo 20 minutos antes de ser usado
2. Purgar mangueras (vaciando todo el aceite del microinyector).
3. Llenar nuevamente el microinyector de aceite hasta la mitad.
4. Dejar los controladores de movimiento fino hidráulico en 5.

5. Verificar que el controlador de movimientos motorizado se mueva en todas sus direcciones ←↑→ arriba y abajo.
6. Colocar los manipuladores mecánicos en el ángulo necesario rotando el tornillo de ajuste para que las micropipetas sean ajustadas a esa medida.
7. Colocar la tapa de la caja Petri en la platina del microscopio invertido para enfocar las letras en todos sus aumentos.
8. Colocar las micropipetas (holding - ICSI) y enfocarlas.
9. Preparar la caja de Petri para microinyección (Figura 8)

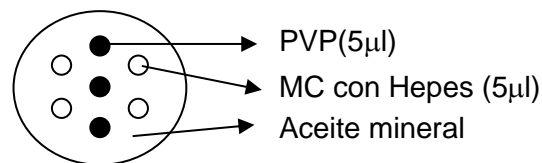


Figura 8. Preparación de caja Petri para ICSI.

10. En una gota de PVP con la ayuda de una micropipeta automática, colocar 1 μ l de la suspensión de espermatozoides. Las otras gotas de PVP son para purgar el aceite mineral de la pipeta de microinyección y/o para inmovilizar los espermatozoides (figura 8).
11. Colocar en las gotas de Global total un ovocito desnudo y llevar al microscopio invertido.
12. Bajar la pipeta de microinyección al PVP y purgar el aceite mineral aspirado por capilaridad y dejarla sumergida en esta gota.
13. Elevar levemente la pipeta de microinyección y llevarla a la gota de PVP que contiene los espermatozoides.
14. Aspirar suavemente un espermatozoide e inmovilizarlo por sucesivas pasadas por la punta de la micropipeta o por presión en la cola contra el fondo de la caja.
15. Aspirar por la cola al espermatozoide inmovilizado y llevarlo a la punta de la micropipeta hasta la gota que contiene el ovocito, e inmediatamente bajar la

- pipeta de sujeción del óvulo, dejando el corpúsculo polar en posición 12 o 6 horas.
16. Acercar a la hora 3 la micropipeta de inyección, con el espermatozoide muy cerca de la punta. Presionar suavemente la zona pelúcida hasta romperla y formar un embudo al presionar la membrana plasmática del ovocito.
 17. Aplicar suavemente, con el microinyector, una leve presión negativa hasta que se observe un pequeño salto hacia atrás del espermatozoide (lo que revela la ruptura de la membrana plasmática) y la entrada a la punta de la micropipeta de una pequeña cantidad de citoplasma del ovocito. Inmediatamente después de esto, aplicar una leve presión positiva hasta observar la llegada del espermatozoide al citoplasma del ovocito.
 18. Retirar con suavidad la micropipeta de inyección del ovocito, luego aplicar una presión positiva en la micropipeta inmovilizadora del ovocito.
 19. Los ovocitos microinyectados se lavan en medio de cultivo y luego son transferidos en medio de cultivo Global total y se llevan a incubadora.
 20. A las 14 o 18 horas de incubación examinar, en el microscopio invertido, los ovocitos microinyectados para verificar fertilización por la presencia de 2 PN y 2 corpúsculos polares. Y hacer su respectiva clasificación.
 21. La transferencia embrionaria se realiza desde las 26 a las 72 horas de cultivo, luego de realizar la clasificación embrionaria.

VITRIFICACION DE OVOCITOS Y EMBRIONES

Esta técnica busca minimizar o eludir los inconvenientes de la congelación por curva lenta como la formación de cristales de hielo intra y extracelulares, lesiones por enfriamiento, toxicidad de los crioprotectores, choque osmótico, lo cual ha sido demostrado con altas tasas de supervivencia y finalmente altas tasas de embarazo. Esta técnica facilita el almacenamiento a largo plazo de ovocitos de pacientes en peligro o riesgo de perder su función ovárica y permite una gran flexibilidad en los servicios de fertilidad, aliviando las preocupaciones éticas asociadas con la preservación de embriones.

VITRIFICACION: Es un proceso en ausencia de hielo en el cual más del 60 % del agua del interior de las células se sustituye por sustancias químicas protectoras.

SOLUCIONES DE VITRIFICACION

- Solución No. 1 ES (Solución de Equilibrio)
- Solución No. 2 VS (Solución de Vitrificación)

Preparación del Material

- El proceso de vitrificación se realiza con la campana a temperatura ambiente (25-27°C).
- Sacar los viales que contienen las soluciones de vitrificación y dejar que se aclimaten antes de su uso 30 minutos
- Agitar los viales
- Colocar 300 µl de ES en el pocillo No. 1
- Colocar 300 µl de VS1 en el pocillo No. 2
- Colocar 300 µl de VS2 en el pocillo No. 3
- Llenar el recipiente de Nitrógeno Líquido.
- Pipetas Pasteur.

PROCEDIMIENTO

Vitrificación de los ovocitos:

1. Después de realizar el equilibrio Aspirar los ovocitos con la pipeta Pasteur y transferirlos al centro de la superficie de VS1 dejarlos caer libremente y repetir este proceso 3 veces cambiándolos de sitio cada vez en el mismo pocillo.
2. Transferir los ovocitos a VS2 e igualmente cambiarlos de posición 2 veces con la pipeta Pasteur.
3. Colocar los ovocitos en la parte final del filamento del Cryotop, teniendo cuidado de no colocar demasiado medio de vitrificación en el filamento y posteriormente sumergir en N₂ líquido, todo este paso deberá hacerse en un tiempo máximo de 40 segundos.

Vitrificación de embriones

1. Colocar 300 µl de ES, VS1 y VS2 en el Reproplate.
2. Transferir los embriones al centro de la superficie del pocillo que contiene la solución ES durante 12 minutos. Aquí se puede observar cómo los embriones empiezan a contraerse de forma espontánea y poco a poco vuelven a su tamaño original con infiltración ES, lo que indica que el equilibrio se ha completado.
3. Después de realizar el equilibrio Aspirar los embriones con la pipeta Pasteur y transferirlos al centro de la superficie de VS1 dejarlos caer libremente y repetir este proceso 3 veces cambiándolos de sitio cada vez en el mismo pocillo.
4. Transferir los embriones a VS2 e igualmente cambiarlos de posición 2 veces con la pipeta Pasteur.

5. Colocar los embriones en la parte final del filamento del Cryotop. teniendo cuidado de no colocar demasiado medio de vitrificación en el filamento y posteriormente sumergir en N₂ líquido, todo este paso deberá hacerse en un tiempo máximo de 40 segundos. El Cryotop debe estar marcado previamente con el nombre y apellidos completos del paciente, número de identificación y fecha.

6. Guardar en el lugar asignado del banco de embriones que corresponda.

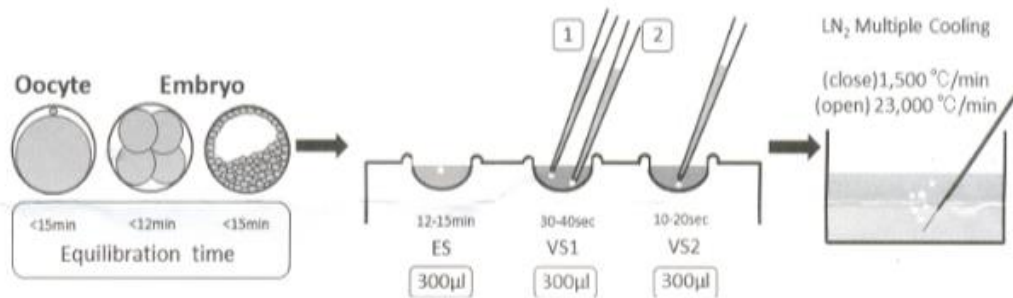


Figura 9. Proceso de vitrificación de óvulos y embriones por medio de Cryotech.

DESVITRIFICACION DE OVOCITOS Y EMBRIONES

Preparación del Material

- El proceso de desvitrificación se realiza con la campana a temperatura ambiente (25-27°C).
- Sacar los viales que contienen las soluciones de desvitrificación y dejar que se aclimaten antes de su uso.
- Agitar los viales
- Dejar atemperar la solución de TS por 90 minutos a 37 o C. en vial cerrado

- Colocar en el Reproplate 300 µl desolución de DS y dejarla a temperatura ambiente.
- Colocar en el Reproplate 300 µl de la solución de lavado WS 1
- Colocar en el Reproplate 300 µl de la solución de lavado WS 2

PROCEDIMIENTO:

- Preenfriar unas pinzas para sacar el Cryotop del Gobelet de la paciente sin sacar del N 2 líquido.
- Quitar la capucha del Cryotop con las pinzas preenfriadas dentro del N 2 líquido.
- Sacar rápidamente el Cryotop del N 2 líquido y sumergir el filamento del Cryotop sin capucha en la solución de desvitrificación a 37 o C (TS), los embriones deberán estar en la solución por máximo un minuto. (deberá tener cuidado que los embriones no se pierdan después que se desprendan del filamento del Cryotop dentro de la solución)
- Aspirar los ovocitos o embriones con la pipeta Pasteur y colocar suavemente en el fondo del pocillo que contiene DS por 3 minutos.
- Aspirar los ovocitos o embriones con la pipeta Pasteur y colocar suavemente en el fondo del pocillo que contiene la solución WS1 por 5 minutos.
- Aspirar los ovocitos o embriones con la pipeta Pasteur y colocar suavemente en la superficie del pocillo que contiene la solución WS2, dejar caer libremente al fondo del pocillo y repetir el procedimiento dos veces.
- Transferir los ovocitos o embriones al medio de cultivo y dejar en la incubadora para su completa recuperación.

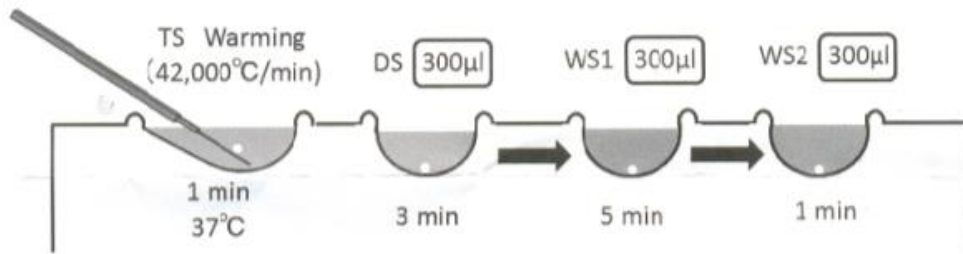


Figura 10. Desvitrificación de embriones y óvulos.

Nota: Todos los procedimientos se ha adaptado según en manual, laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus intraction de la OMS Y el Manual practico de esterilidad y reproducción humana de J. Remohi.