



**EFFECTOS DE LOS FACTORES EXTRÍNSECOS EN LA
TASA DE ANEUPLOIDÍA EMBRIONARIA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA DEL CARMEN NOGALES BARRIOS

Directores:

PROF. JUAN ANTONIO GARCÍA VELASCO

DR. FERNANDO BRONET CAMPOS

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

Madrid, 2022

Hay sueños que al comienzo nos parecen imposibles, luego improbables y si nos comprometemos seriamente, se vuelven inevitables.

Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido participes y me han ayudado a lo largo de estos años y que terminan en la presente tesis doctoral.

Gracias al Profesor Juan Antonio García Velasco, por su paciencia, por sus comentarios en mis hojas, por su tiempo y por ayudarme tanto en este camino. No ha sido nada fácil, pero ¡ LO HEMOS CONSEGUIDO!

Gracias a Fernando Bronet, por confiar y seguir confiando en mí desde hace ya 13 años.

Gracias a IVI Madrid por ayudarme en mi formación y hacer realidad este sueño.

Gracias a mis compañeras y amigas de diagnóstico genético preimplantacional de IVI Madrid; Eva Martínez, Marta Ariza, María Gaytán y Silvia de Frutos, por compartir conmigo tantos momentos buenos y malos en el laboratorio, por ayudarme en este viaje del doctorado, por apoyarme cada día y hacer que los días fuesen mejores. No sé qué hubiese hecho sin vosotras.

Gracias a Diana Santa-Cruz por entenderme y escucharme en los múltiples problemas burocráticos.

Gracias a mis padres, lo son todo para mí, son mi brújula y mi muro, todo lo bueno que tenga se lo debo a ellos.

Gracias a mi hermana Silvia, por su inteligencia, por su creatividad, por su música, que me acompaña cada día. Gracias por escucharme, apoyarme, ayudarme y quererme. Menos mal que llegaste, no me imagino la vida sin tu mano.

Gracias a Jesús, mi compañero de vida, medio doctorado es tuyo, sin ti no hubiese sido posible. Gracias por tus comentarios, por tu sabiduría, por leerte pacientemente cada día lo que iba escribiendo, por liberar nuestros ocupados momentos libres para que yo pudiese escribir. Esto es tuyo también.

Y gracias a Sara y a Elías, son mi luz, mi fuerza, mi motor y mi alegría,

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES DE LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA HUMANA...3

1.1. 2. Antecedentes de la Reproducción Asistida Humana en España.....7

1. 2. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.....8

1.2.1 Antecedentes del Diagnóstico Genético Preimplantacional. 8

1.2.2 Objetivo del DGP 9

1.2.3 Análisis en el DGP 10

1.2.4 Indicaciones Clínicas del DGP..... 14

1.2.5 Limitaciones del DGP..... 20

1.2.6. Error diagnóstico del DGP 21

1.3 FACTORES EXTRÍNSECOS.....23

1.3.1. Concentración de oxígeno..... 23

1.3.2 Estimulación..... 24

1.3.3 Vitricación 26

1.3.4 Factor humano. 27

1.4. FACTORES INTRINSECOS

1.4.1 Índice de masa corporal. 28

1.4.2. El grosor endometrial..... 30

1.4.3. Edad Materna 30

1.4.4 Edad Paterna..... 31

1.4.5 Abortos Previos 31

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....35

2.1HIPÓTESIS.....36

2.2OBJETIVOS.....36

| | |
|---|------------|
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 3.1 DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO..... | 39 |
| 3.1.1 Variables de estudio..... | 40 |
| 3.1.2 Grupos de estudio | 42 |
| 3. 2. METODOLOGÍA DE TRABAJO..... | 43 |
| 3.2.1 Estimulación y punción ovárica | 44 |
| 3.2.2 Cultivo embrionario..... | 45 |
| 3.2.3 Evaluación embrionaria. | 46 |
| 3.2.4 Biopsia Embrionaria de Trofoectodermo | 47 |
| 3.2.5 “Tubing” celular | 51 |
| 3.2.6 Identificación de muestras biológicas, análisis y conservación. | 54 |
| 3.2.7 Vitricación de Embriones | 55 |
| 3.2.8 Desvitrificación de embriones..... | 56 |
| 3.3 DEFINICIÓN DE LAS TASAS CLÍNICAS..... | 57 |
| 3.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS..... | 58 |
| 4. RESULTADOS..... | 61 |
| 4.1. CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO..... | 61 |
| 4.2 VITRIFICACIÓN..... | 64 |
| 4.3 ESTIMULACIÓN..... | 65 |
| 4.4 FACTOR HUMANO | 66 |
| 4.5 FACTORES INTRÍNSECOS QUE INFLUYEN EN EL ABORTO DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA DE UN EMBRIÓN EUPLOÍDE..... | 67 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 77 |
| 5.1 DE LOS FACTORES EXTRÍNSECOS..... | 78 |
| 5.2 DE LOS FACTORES INTRÍNSECOS..... | 80 |
| 6. CONCLUSION..... | 87 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 91 |
| 8. ANEXO..... | 115 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Tasas clínicas en los grupos de baja y alta concentración de oxígeno | 61 |
| Tabla 2. Tasas clínicas para la indicación de fallo de implantación en los grupos de baja y alta concentración de oxígeno. | 62 |
| Tabla 3. Tasas clínicas para la indicación de abortos de repetición. | 63 |
| Tabla 4. Tasas clínicas para la indicación de edad materna avanzada..... | 64 |
| Tabla 5. Tasas clínicas en ciclos con ovocitos frescos y ovocitos vitrificados. | 65 |
| Tabla 6. Tasa de embriones normales según concentración de FSH..... | 66 |
| Tabla 7. Tasas de embriones normales por embriólogo que realiza la biopsia. | 67 |
| Tabla 8. Tasas clínicas según la calidad embrionaria..... | 68 |
| Tabla 9. Variables incluidas en nuestro modelo de regresión comparando variables de laboratorio y clínicas versus aborto. | 69 |
| Tabla 10. Tasas clínicas según el índice de masa corporal. a, b, c y d indican la significación estadística ($p < 0.05$) entre los grupos en el análisis ANOVA post-hoc... | 70 |
| Tabla 11. Tipos de preparación endometrial y tasas clínicas. | 72 |
| Tabla 12. Tasas clínicas según el grosor endometrial..... | 73 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Núcleo euploide XY, analizado por FISH..... | 10 |
| Figura 2.Gráfica de arrays-CGH de un embrión 46,XX+7-10..... | 11 |
| Figura 3.Gráfica del resultado por NGS de un embrión aneuploide -10,+11,+16 | 13 |
| Figura 4.Concentración de Oxígeno en ovario, trompas y útero de distintos mamíferos | 23 |
| Figura 5. Las especies reactivas (ROS) pueden interrumpir la homeostasis celular | 24 |
| Figura 6.Eschema de un ciclo de estimulación ovárica controlada para FIV sin incluir los supresores hipofisarios (agonistas y antagonistas de GnRH) | 26 |
| Figura 7. Fotografías hechas con Oosight® Imagen System, del huso meiótico de un ovocito desvitrificado..... | 27 |
| Figura 8. Endometrio trilaminar..... | 30 |
| Figura 9. Endometrio lineal..... | 30 |
| Figura 10. Blastocisto expandido | 48 |
| Figura 11. Biopsia de trofoectodermo..... | 49 |
| Figura 12. Assited Hatching | 50 |
| Figura 13. Placa de biopsia..... | 51 |
| Figura 14. Preparación de la campana de tubing..... | 53 |
| Figura 15.Tubing de la muestra biopsiada | 53 |
| Figura 16.Proceso del tubing celular | 54 |
| Figura 17. Placa de vitrificación de embriones | 55 |
| Figura 18. Placa de desvitrificación de embriones | 56 |
| Figura 19. Tasas clínicas en los cuatro grupos de IMC. La tasa de embarazo y de recién nacido vivo fue estadísticamente significativo entre los grupos (*). La tasa de aborto fue también estadísticamente significativa en el grupo con alto IMC comparado con los otros tres grupos (**). | 71 |
| Figura 20. Porcentaje de embriones aneuploides, que va aumentando en función de la edad. Datos de IVI Madrid (2011-2016)..... | 77 |

GLOSARIO DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

aGnRH: agonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas.

antGnRH: antagonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas.

AH: hatching asistido.

Array: matriz.

a.m: ante meridiem.

ADO: alelo drop-out

C

CGH: hibridación genómica comparada.

Chip-seq: secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina

D

DGP: diagnóstico genético preimplantacional.

E

EOC: estimulación ovárica controlada

E₂: estradiol.

F

FIV: fecundación in vitro.

FSH: hormona estimulante del folículo.

FISH: hibridación in situ fluorescente.

G

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas.

GIEPH: grupo de investigación en embriones preimplantacional humanos.

H

H: horas.

HCG: coriogonadotrofina humana.

HCGr: coriogonadotrofina humana recombinante.

HMG: gonadotropina menopáusica humana purificada.

I

IAD: inseminación artificial de donante.

IVI: instituto valenciano de infertilidad.

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

IMC: índice de masa corporal.

K

Kg: kilogramo

L

LH: hormona luteinizante.

M

mcg: microgramo.

mg: miligramo.

mL: mililitro.

Microarrays: matriz que incorpora múltiples genes.

mm: milímetro.

m²: metro cuadrado.

microRNA:

MCI: masa celular interna.

N

ng: nanogramo

ns: no significativo.

NGS: Next Generation Sequencing.

O

O₂: oxígeno

OMS: organización mundial de la salud.

P

PGT-M: test genético preimplantacional para enfermedades monogénicas.

PGT-SR: test genético preimplantacional para enfermedades estructurales.

PGT-A: test genético preimplantacional para aneuploidías.

PBS: solución salina.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PZD: disección parcial de la zona pelúcida del ovocito.

PVP: Polivinilpirrolidona.

R

RNV: recién nacido vivo.

ROS: especie reactiva de oxígeno.

RNA-seq: secuenciación del ácido ribonucleico.

S

SOP: síndrome de ovario poliquístico

SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica.

SUZI: inserción subzonal del espermatozoide.

T

TRA: tratamiento de reproducción asistida.

TE: Trofoectodermo.

U

UI: unidades internacionales.

V

VIH: síndrome de inmunodeficiencia humana.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES DE LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA HUMANA

En el año 1784, el médico y sacerdote italiano Lázaro Spallanzani, realizó la primera inseminación en mamíferos con éxito. Esta inseminación se hizo en perros y la hembra tuvo tres cachorros (1).

En 1785 John Hunter, un médico escocés, realizó la primera inseminación artificial humana. Fue en un caso en el que el paciente sufría hipospadia, y lo solucionó recogiendo el semen del paciente en una jeringa caliente y lo inyectó en la vagina de su mujer (2).

En los siglos diecinueve y veinte se produjeron grandes progresos en medicina, y se descubrieron sustancias que tenían efectos terapéuticos. Estos avances también se produjeron en el campo de la fertilidad y la esterilidad.

En 1866, Marion Sims publicó su principal tratado (3). En él, explica que la infertilidad y la dismenorrea tienen su origen en la estenosis cervical. Explica que la esterilidad se debía tratar dilatando el cérvix, bien usando dilatadores o quirúrgicamente. También describe que una mala posición uterina puede contribuir a la infertilidad, y prefería métodos clásicos y dejaba la cirugía como última opción.

En esta época la endocrinología todavía no se conocía y no estaba desarrollada. Se pensaba que el momento más adecuado para la fertilidad era durante los 10 días tras la menstruación. También se consiguieron inseminaciones con éxito durante esta época. En 1868 se publicó “The Microscope as an Aid in the Diagnosis and Treatment of Sterility” (4), en el que se explica el importante papel que juega el microscopio para examinar la calidad espermática.

La primera inseminación artificial de donante, realizada con éxito fue en 1885 (IAD) (5). Y en 1891 se recuperó un embrión preimplantatorio, esto se consiguió lavando el oviducto de una coneja. Después de recuperarlo se transfirió a una receptora en la que continuó su desarrollo normal (6). Este logro fue muy importante para que los científicos se motivasen para desarrollar el cultivo de embriones en el laboratorio.

Ya en el siglo XX empezó a desarrollarse la endocrinología enfocada a la reproducción y se empezaron a utilizar las hormonas para estimulaciones e inducciones ováricas (7).

En 1929 se comienzan a realizar recuentos espermáticos (8). A partir de ese momento hay una consecución de avances en reproducción que seguirán a lo largo de los años (9).

En Estados Unidos, en los años 30, surgieron una serie de investigadores que desarrollaron distintos métodos para diagnosticar la infertilidad. Uno de ellos fue Rubin quien utilizó un test para diagnosticar obstrucciones tubáricas (10).

Un equipo de investigación de Harvard en 1944, descubrió uno de los avances más importantes en reproducción, la fecundación in vitro (FIV) de ovocitos humanos. (9, 11, 12). Los embriones nunca se transfirieron al útero, pero fue el primer experimento de fecundación in vitro en Estados Unidos.

La primera transferencia con éxito de embriones, en este caso bovinos, tiene lugar en 1951 (13) y también se descubrió la capacitación espermática (14,15). También se publicaron nuevos artículos sobre FIV y sobre el desarrollo embrionario en conejos (16).

Dos años después, se publicaron los primeros embarazos logrados tras el usar espermatozoides criopreservados en hielo seco (a -80°C). Se utilizó como crioprotector el glicerol (17).

Hubo que esperar hasta 1958 para que se empezasen a utilizar los primeros extractos de hormona foliculo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Y se consiguieron buenos resultados (18). Además se introdujo el citrato de clomífero en formato oral para la estimulación ovárica controlada (19).

En el siglo XX también se consiguen obtener los primeros ovocitos humanos mediante la técnica laparoscópica (20) publicándose nuevas formas para monitorizar la inducción de la ovulación (21). También se publican los primeros procedimientos de micro manipulación en gametos animales para facilitar la fecundación en hámster (22, 23).

El equipo de Monashenen consiguió el primer embarazo por FIV en 1973, aunque la gestación sólo duró unos pocos días.

Fue Jean Purdy, en 1977 cuando transfirió un embrión en el útero materno pero no llegó a embarazo, pero no fue hasta 10 años después que se consiguió. La fecundación de los ovocitos fuera del cuerpo humano, hasta ese momento, había sido experimental y los intentos hechos en humanos habían acabado en abortos y en un embarazo ectópico en 1976.

Hasta que Lesley Brown se sometió a una laparoscopia para obtener un ovocito que fue fecundado en el laboratorio. Este ovocito se desarrolló hasta el estadio de embrión y fue posteriormente transferido al útero. La transferencia de ese embrión dio como resultado el nacimiento de Louise Brown el 25 de julio de 1978, fue la primera niña en el mundo tras fecundación in vitro e implantación embrionaria (24).

El grupo de los doctores Lopata, Leeton, Wood y Trounson consiguieron en 1980 que naciera el primer bebé en Australia tras FIV. En 1981, nació en Estados Unidos, el primer niño por FIV y con estimulación ovárica con gonadotropinas.

En 1983 se lograron los primeros embarazos de ovocitos donados. Se introdujo en el cérvix de la donante de ovocitos el semen. La fecundación se produjo in vivo, luego los cigotos fueron retirados mediante un lavado uterino y transferidos a la mujer receptora (25). Se consiguió el primer embarazo de ovocitos donados mediante FIV y transferencia embrionaria (26). Y en Australia se comunicó el primer embarazo proveniente de embriones congelados-descongelados (27).

Se introdujo, en 1984, una técnica nueva relacionada con los gametos, en la que se transfiere, directamente en la trompa de Falopio, mediante laparoscopia uno o más ovocitos que se han mezclado previamente con espermatozoides capacitados (28).

Tiempo después se publicó el primer embarazo utilizando una técnica en la cual se transferían ovocitos fecundados en las trompas (29).

Se publica en 1986 un nuevo método en el que intervienen la ecografía y un método de biopsia para recoger los ovocitos (30), por lo que la laparoscopia cae en el desuso.

Ese mismo año se publicó el primer nacimiento después de un proceso de congelación-descongelación de ovocitos humanos y posterior FIV y transferencia embrionaria (31).

Dos años más tarde, se comunicó la primera gestación usando una técnica novedosa llamada subzonal sperm insertion (SUZI), en esta técnica se inyecta uno o varios espermatozoides directamente a través de la zona pelúcida (ZP) y se depositan en el espacio perivitelino (32). Un año más tarde se describió una técnica que facilitaba la entrada de los espermatozoides en los ovocitos. Se le dio el nombre de partial zonal dissection (PZD) y consistía en realizar un agujero en la ZP para facilitar la entrada espermática (33).

Uno de los hitos más importante en la Reproducción Asistida (RA) ocurre de la mano de Gianpiero Palermo que desarrolló una nueva técnica de reproducción asistida en 1992, la introducción de un único espermatozoide en el interior del citoplasma del ovocito, la microinyección espermática o ICSI (Intra-Citoplasmic Sperm Injection). El ICSI fue un hito muy importante en la historia de la reproducción asistida y un gran avance para tratar la esterilidad que tenía un origen masculino (34).

La posibilidad de gestación se sitúa alrededor del 20-30% en cada ovulación y es al cabo de un año, que esta tasa llega casi al 100%.

Fertilidad es cuando una pareja consigue un embarazo de manera espontánea; esterilidad es la imposibilidad absoluta de concepción, y la subfertilidad es cuando la fertilidad está disminuida. Hay estudios que nos dicen que entre el 10% y el 15% de las parejas tienen problemas para concebir. En algunas sociedades desarrolladas, este número podría aumentar, esto puede deberse al cambio social que ha hecho que las parejas retrasen el momento de tener hijos.

La edad de la mujer y en menor medida, la edad del hombre, influyen en la eficiencia de un ciclo de RA. Hay que tener en cuenta que las mujeres nacen con un número fijo de ovocitos, y a partir de la pubertad, con la ovulación, los ovocitos se van perdiendo en cada ciclo menstrual. La mujer cuando llega a la menopausia, va agotando su reserva de ovocitos y la reproducción ya no es posible.

La RA puede solventar muchos problemas de fertilidad que se dan entre las parejas, pero lo que no puede resolver es la falta fisiológica de ovocitos o las anomalías cromosómicas que se producen en estos debido a la edad materna, esto provoca una disminución en las posibilidades de embarazo.

Existen diferentes técnicas para resolver problemas de fertilidad, como la inseminación artificial tanto de semen de la pareja como de donante, ciclos de FIV, con donación de gametos. De estas técnicas la FIV es la técnica que tiene un porcentaje más elevado de éxito. En ella se obtienen los ovocitos tras una estimulación ovárica mediante ecografía transvaginal, se fecundan los gametos y cuando el embrión está desarrollado se transfiere al útero materno.

1.1.2. Antecedentes de la Reproducción Asistida Humana en España.

El primer nacimiento mediante FIV en España se consiguió en 1984, se llamó Victoria Anna y nació en Barcelona.

Un año más tarde nació el primer niño de FIV concebido en un laboratorio de la medicina pública española.

En 1987 se produjo en España el primer embarazo a término después de una congelación y descongelación de embriones, y en 1988, se dieron a conocer los éxitos de la donación de ovocitos.

En 1992, se produjo el nacimiento del primer bebé cuya fecundación se realizó por microinyección espermática.

En las décadas de los años 80 y 90, los ovocitos se obtenían mediante la técnica de laparoscopia, mientras que esa técnica cayó en desuso y actualmente se obtienen los ovocitos mediante la técnica de ecografía, que es una técnica mucho menos traumática para las pacientes y mucho más simple y reproducible.

En los años 90 y 2000 se fueron poniendo a punto los protocolos de estimulación, y también a nivel de laboratorio se fueron elaborando protocolos sólidos de cultivo así como mejorando técnicas fundamentales como la congelación y descongelación de ovocitos, embriones, tejido ovárico y testicular, y empezaron también los programas de donación de ovocitos y de embriones.

En 1993 se comenzó a lavar el semen de hombres seropositivos al virus del VIH, con el fin de conseguir un embarazo sin riesgo de contagio a la pareja y al bebé. A nivel mundial y también en ese año el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) consiguió el primer embarazo de España, y segundo del mundo, en el que se utilizaron

espermatozoides testiculares. En 1995 se consiguió el primer embarazo del mundo con espermatozoides congelados del testículo de un hombre estéril en el IVI.

Entre los años 1990 y 2000 apareció una técnica nueva, fue la de DGP, que desarrolló en España el grupo del doctor Egozcue, con la doctora Francesca Vidal y con el doctor Josep Santaló, y pusieron en marcha el Grupo de Investigación en Embriones Preimplantacionales Humanos (GIEPH) consiguiendo la primera gestación a término de esta técnica en nuestro país.

En 1994, se consiguió el primer nacimiento en España tras un ciclo de DGP, en el que se seleccionaron embriones según su sexo.

En 2002 nacieron en España los primeros bebés después de la congelación y descongelación de ovocitos.

Cuatro años después en el año 2006 se produjo el primer nacimiento en España a partir de ovocitos madurados *in vitro*.

En el año 2007 se logró el primer nacimiento en el mundo de doble vitrificación, de óvulo y blastocisto y también en ese mismo año nacieron los primeros niños tras la vitrificación de ovocitos. El equipo de la Dra. Cobo fue el responsable.

Dos años más tarde en 2009, el IVI de Valencia, y el Hospital Universitario Dr. Peset Aleixandre de Valencia, consiguieron la primera gestación en España, de un trasplante de tejido ovárico.

Actualmente existen medios de cultivo y de evaluación de la calidad embrionaria cada vez más novedosos. Son incubadores con sistemas de captura de imágenes continuas que nos permiten observar en tiempo real el cultivo del embrión y poder evaluar el desarrollo del embrión de forma continua sin tener que sacarlo del incubador. También se han descubierto nuevas técnicas de análisis genético, permitiendo tener información del genoma completo del embrión.

1.2. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

1.2.1. Antecedentes del Diagnóstico Genético Preimplantacional.

La primera aplicación del DGP, se publicó en 1990 por el equipo de Alan Handyside. Para que esto fuese posible tuvieron que sumarse, por un lado, las técnicas de

reproducción asistida y por otro la biología molecular. En este mismo año se documentó la primera gestación en humana después de realizarse en los embriones una biopsia, que era necesaria para determinar el sexo de embriones con riesgo de padecer enfermedades ligadas al sexo (35). Dos años más tarde se publicó el nacimiento de un bebé sano tras el DGP para la detección de la fibrosis quística (36).

Un año después se consiguió el nacimiento de un niño sin Corea de Huntigton y unos años más tarde, en el año 2008, se logró el primer bebé histocompatible con un hermano afecto de beta-talasemia mayor. Este nacimiento se logró gracias al equipo médico del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

A lo largo de estos años se han ido introduciendo nuevas indicaciones para el DGP, como la histocompatibilidad de embriones con hermanos afectos, diagnosticar también, enfermedades de aparición tardías y la predisposición a ciertos tipos de cáncer.

1.2.2. Objetivo del DGP

Se vio que existía una relación entre ciertos problemas relacionados con la infertilidad y un aumento en la tasa de embriones con alteraciones cromosómicas, de forma que el DGP se empezó a aplicar en grupos de población donde parecía que la selección de embriones sin anomalías en la dotación cromosómica ocasionaría una ventaja reproductiva. Así parece que mujeres que han sufrido múltiples abortos, que presentan fallos de implantación en tratamientos previos de reproducción asistida, mujeres de edad avanzada o incluso en pacientes que tienen una muestra de semen muy pobre existe una mayor tasa de embriones con aneuploidías en los embriones, por lo que el DGP podría ayudar a estas parejas a obtener una gestación. Podríamos definir varios objetivos concretos del DGP:

- Evitar transferir embriones que no darían lugar a un recién nacido sano en casa.
- Reducir el riesgo de aborto espontáneo.
- Aumentar las tasas de éxito en técnicas de reproducción asistida.
- Reducir el tiempo hasta conseguir el embarazo.

El DGP se realiza sobre embriones en cultivo, por lo que requiere un tratamiento de FIV. Para hacer un ciclo de DGP se debe hacer una estimulación hormonal, para recuperar un mayor número de ovocitos y aumentar el éxito del tratamiento.

Para realizar la fecundación de los ovocitos se lleva a cabo un ICSI. Esta técnica se recomienda frente a una FIV convencional con el fin de evitar análisis genéticos incorrectos debido al riesgo de contaminación por el ADN de los espermatozoides o de células del cúmulo (37). Al igual que en cualquier ciclo de reproducción asistida se comprueba la fecundación a las 16-20 horas siguientes de la microinyección y se cultivan los embriones hasta un estadio de blastocisto (día 5,6 de cultivo), momento en que se realiza la biopsia embrionaria del trofoectodermo.

El número y la calidad de los embriones obtenidos condicionarán en parte, el éxito de un DGP. Esta técnica requiere de tecnología punta y personal altamente cualificado lo que lo hace un procedimiento técnicamente complejo y costoso. (38).

1.2.3. Análisis en el DGP

En la historia del DGP se han utilizado distintos métodos citoquímicos y moleculares para identificar los cromosomas. El primer método utilizado fue la **hibridación fluorescente in situ** (FISH), que es una técnica para detectar un fragmento de ADN en el genoma (Figura 1).

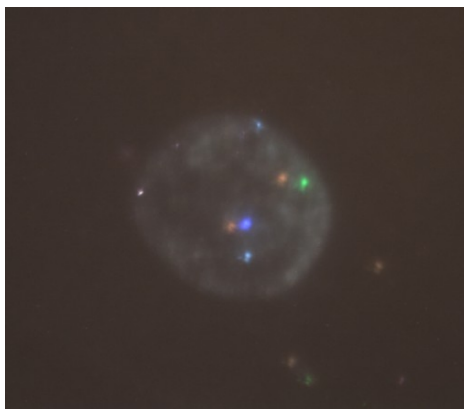


Figura 1. Núcleo euploide XY, analizado por FISH

Se utiliza un fragmento de ADN marcado con fluorescencia que se va a unir a un fragmento de ADN purificado, posteriormente ese ADN se incubó con todos los cromosomas del genoma de origen, que se fijó a un portaobjetos de vidrio para ser observado en un microscopio de fluorescencia. El ADN marcado con fluorescencia se une a su fragmento correspondiente en uno de los cromosomas. Al observar los cromosomas con el microscopio de fluorescencia, un científico formado, puede saber la zona donde el fragmento se ha unido al ADN gracias al marcador fluorescente que

llevaba. Gracias a la fluorescencia podemos conocer la ubicación del fragmento de ADN en el genoma de partida.

El siguiente método usado fue **Array de hibridación genómica comparada** (Array-CGH) que permite estudiar la dotación cromosómica al completo (los 24 cromosomas).

Durante mucho tiempo se utilizó este protocolo para un diagnóstico citogenético pre y postnatal (39,40). Es una técnica basada en el protocolo de CGH, pero que utiliza tiempos de hibridación más cortos. La técnica de CGH clásica conlleva mucho tiempo y hace imposible biopsiar en día 5,6 de desarrollo embrionario y su posterior transferencia en un ciclo en fresco, es decir, se requiere de la congelación de los embriones biopsiados array-CGH combina una amplificación del genoma completo con el marcaje fluorescente y la posterior hibridación con cromosomas normales.

En este tipo de análisis el ADN problema es marcado con fluorescencia en color verde. Y a la vez un ADN control normal cromosómicamente, se marca en color rojo (Figura 2).

La unión de ambos marcajes fluorescentes se hibrida con una plataforma de ADN. Este chip o array posee un conjunto de moléculas de ADN que representa todo el genoma humano.

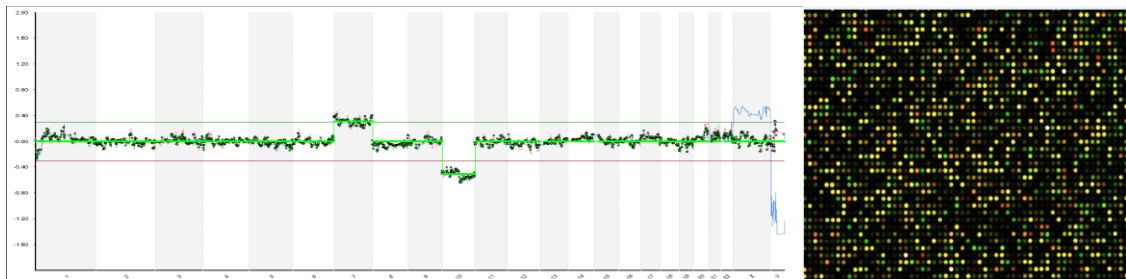


Figura 2.Gráfica de arrays-CGH de un embrión 46,XX+7-10

Un escáner analiza la hibridación y si la cantidad de ADN es normal, el escáner detecta el color amarillo, que es suma de los colores rojo y verde. En cambio, si una determinada región cromosómica está en exceso o defecto, se detectará el color verde o rojo respectivamente. Pero este método ha dado paso a la secuenciación masiva el **NGS (Next Generation Sequencing)** que analiza 25 millones de bases, en 4 horas, con un 99 % de precisión (41-47).

Las plataformas de secuenciación masiva NGS, se comienzan a comercializar en el año 2005 siendo una revolución en la biología. La secuenciación tradicional mediante la tecnología Sanger ya se conocía y dominó la investigación y el diagnóstico molecular durante dos décadas pero el rápido desarrollo de estos nuevos secuenciadores, siendo más precisos, con mejor rendimiento y más barato el proceso ha permitido que se expanda rápidamente su uso en el mundo científico para la secuenciación de genomas completos(48-50) resecuenciación dirigida de zonas concretas del genoma (51-54), secuenciación de transcriptomas completo (RNA-Seq) (55) identificación de microRNAs (56) estudios de interacción proteína-DNA (ChIP-seq) (57) o estudios de metilación entre otros (58) .

En los últimos 10 años, se han producido grandes avances en la velocidad, rendimiento y lectura, lo que ha hecho que se den un gran número de nuevas aplicaciones de NGS en la clínica, investigación básica o en investigación transversal.

El análisis por NGS, nos ha permitido obtener miles o millones de fragmentos de ADN en un único proceso, esto hace posible la secuenciación en poco tiempo. Todas estas plataformas de NGS comparten algunas características:

- Fragmentación al azar del ADN y unión de adaptadores específicos a ambos lados de cada molécula.
- Se amplifica la librería de ADN mediante fragmentos unidos por unos adaptadores, a una superficie sólida como pueden ser las microesferas o directamente a la placa de secuenciación.
- Secuenciación masiva y paralela.
- Lecturas cortas.
- Se pueden leer los extremos del mismo fragmento de ADN, facilitando la identificación de variantes estructurales.

A pesar de todos estos puntos comunes, luego cada plataforma de NGS se basa en unos procedimientos químicos distintos que producen diferencias cualitativas y cuantitativas.

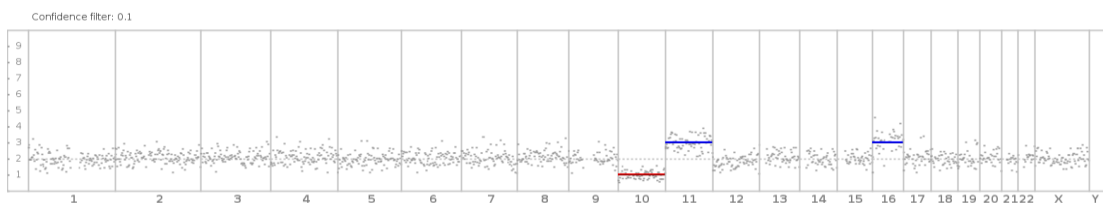


Figura 3. Gráfica del resultado por NGS de un embrión aneuploide -10,+11,+16

Se generan unas gráficas mostrando el número de lecturas NGS a lo largo de los 24 cromosomas y mostrando si existen aneuploidías (Figura 3).

El NGS, ha supuesto una revolución en la investigación genética, ya que permiten la secuenciación masiva del ADN a un buen coste. La tecnología del NGS aplicada al DGP da la posibilidad de tener un alto número de lecturas distribuidas uniformemente por todo el genoma del embrión, para detectar las anomalías cromosómicas estructurales, así como los defectos de un único gen.

Análisis de ADN para mutaciones de genes: Polimerase Chain Reaction (PCR).

Esta técnica nos permite identificar mutaciones puntuales en el ADN. Se utiliza para detectar enfermedades monogénicas, es decir enfermedades causadas por mutaciones específicas que alteran un único gen. Para detectar la presencia o ausencia de una determinada mutación es necesario amplificar el material genético. Para conseguir la cantidad adecuada de ADN se utiliza la técnica de PCR.

Es importante realizar la inseminación de los ovocitos mediante ICSI, para evitar una posible amplificación de ADN de espermatozoides que puedan permanecer adheridos a la ZP.

La PCR se realiza en tres pasos: 1°. Se separan las cadenas que forman la molécula de ADN y que se quiere amplificar, para ello se somete a la molécula de ADN a altas temperaturas próximas a la ebullición. Estas cadenas actuarán como molde para fabricar la cadena complementaria. 2°. Para que cada cebador se una a su región específica dentro del ADN, se baja la temperatura. 3°. En el último paso se genera la cadena de ADN complementaria por medio de la ADN polimerasa. Cada una de las moléculas generadas de ADN puede volver al proceso y poder servir como molde para fabricar más copias.

Por tanto después de 20 ciclos podemos tener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN.

La PCR tiene una sensibilidad muy alta, pero con algunos defectos, es una técnica cualitativa no cuantitativa, es decir, puede detectar la presencia o ausencia de los cromosomas; también tiene una alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para que esto no ocurra, es necesario que se optimice la secuencia de los cebadores y también la temperatura para que se puedan unir al ADN correctamente.

Por otro lado, para solucionar el problema de la cuantificación se han creado una serie de modificaciones sobre el protocolo de la PCR original, esto da lugar a la PCR cuantitativa. Existen varios métodos de PCR cuantitativa, aunque casi todos basados en el uso de otra sonda de ADN complementario al que queremos amplificar. Esta sonda lleva unida una molécula fluorescente y una molécula que inhibe esta fluorescencia, por lo que cuando la sonda es retirada de su sitio, por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción de la molécula inhibidora de fluorescencia y emite fluorescencia.

Aquellas parejas que padezcan una enfermedad monogénica o sospechen que puedan ser portadoras por tener un hijo anterior afecto o antecedentes familiares de dicha enfermedad pueden acudir a esta técnica para lograr un descendiente sano sin la enfermedad. Antes de empezar el ciclo de RA con DGP, es necesario hacer un estudio familiar para identificar exactamente la mutación que les provoca la enfermedad y estudiar el método más óptimo para realizar la PCR.

Se ha de diseñar para cada enfermedad monogénica concreta, un protocolo distinto de PCR

1.2.4. Indicaciones Clínicas del DGP

La Ley 14/ 2006 para técnicas de Reproducción Asistida, en su artículo 12 define una serie de casos en los que está permitido realizar el DGP, así se podría utilizar esta técnica en los siguientes casos:

La detección de enfermedades hereditarias graves, de apariciones precoces y no susceptibles de tratamiento curativo posnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los embriones no afectados para su transferencia.

La detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del embrión.

En relación a estas definiciones, el DGP se aplica en las siguientes indicaciones clínicas:

- Alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales (cariotipo anormal)
- Alteraciones en un gen (enfermedades monogénicas)
- Enfermedades ligadas al sexo
- Abortos de repetición
- Fallo de implantación
- Edad materna avanzada
- Factor masculino severo

Se definen dos tipos de DGP, dependiendo del tipo de indicación con la que se trabaje, así diferenciaremos entre PGT-M, PGT-A, PGT-SR

PGT- M y PGT-SR

En sus siglas en inglés (Preimplantational Genetic Testing for Monogenic Diseases and Preimplantation Genetic Testing for Structural Diseases), hace referencia a todas aquellas indicaciones en las que se conoce la alteración, ya sea génica o cromosómica.

PGT-A

Procede de sus siglas en inglés (Preimplantational Genetic Test for Aneuploidy). Se trata de detectar embriones cromosómicamente normales en pacientes subfértiles. Estos pacientes no son portadores de ninguna alteración cromosómica o génica, pero remiten problemas de fertilidad y estudiando su historia clínica esos problemas pueden estar relacionados con una mayor tasa de aneuploidías en los embriones. Existen datos que demuestran que este tipo de indicaciones está asociado a un aumento en la tasa de aneuploidías embrionarias (59-64). Esta es la principal indicación para DGP en todo el mundo (65), aunque ya están claros los beneficios del diagnóstico genético, siempre ha creado en la comunidad científica un gran debate en torno a los beneficios e inconvenientes que podría aportar esta técnica (66-69). Podemos diferenciar entre las siguientes indicaciones:

Alteraciones del cariotipo

Todos los portadores de anomalías cromosómicas. Se ha publicado que 1 de cada 500 nacidos es portador de alguna anomalía cromosómica (70) y dentro de la población general un 0,6% son portadores de anomalías cromosómicas. El 3,2% en parejas con más de 10 fallos de reproducción asistida y el 9,2% en parejas con tres o más abortos consecutivos durante el primer trimestre (71).

Existen dos tipos de anomalías cromosómicas: numéricas (aneuploidías como el síndrome de Down o que originen abortos de repetición) y estructurales (translocaciones recíprocas y robertsonianas, inversiones, deleciones). Estas anomalías cromosómicas suelen deberse a un error en la gametogénesis viéndose afectado por lo tanto el óvulo o el espermatozoide y dando lugar en la fecundación a un embrión con una anomalía cromosómica. La mayor parte de las veces, los embriones que poseen una cantidad anormal de cromosomas o alteraciones estructurales, no sobreviven y dan lugar a un aborto espontáneo durante el primer trimestre del embarazo. Por lo tanto, en estas parejas, sobre todo las que portan alteraciones estructurales, lo importante no es solo conseguir una gestación, sino una vez conseguida esta disminuir el riesgo de aborto. En este tipo de alteración no es válido dejar los embriones evolucionar hasta el estadio de blastocisto sin realizar DGP como selección ya que muchos consiguen alcanzar el estadio de blastocisto y posteriormente se traducen en abortos (72-73).

Enfermedades monogénicas

Aquellas enfermedades hereditarias originadas por la mutación o alteración en la secuencia de ADN de un único gen.

Como resultado de la mutación en el ADN se produce una proteína distinta de la que ese gen es responsable. Pueden ser que no se sintetice la proteína, que se fabrique en exceso, en poca cantidad o se forme una proteína diferente, lo que puede provocar una alteración orgánica que se manifieste en varios órganos del cuerpo produciendo así una enfermedad monogénica.

En este tipo de enfermedades encontramos dos herencias distintas: monogénica dominante, cuando se requiere tan solo una copia del gen afectado para padecer la enfermedad, y monogénica recesiva cuando es necesario que estén afectadas dos copias del gen para padecer la enfermedad.

Enfermedades ligadas al sexo

Así se determina cualquier carácter determinado por un gen situado en algún cromosoma sexual, X o Y. Podemos clasificar estas enfermedades en dos tipos:

- Tipo dominante, la mutación en uno de los genes de tan solo uno de los progenitores es capaz de originar la enfermedad, siendo el gen del otro progenitor normal. Para este caso de herencia dominante ligada al cromosoma X, si la madre es portadora del gen X anormal, existe un riesgo de que el 50% de la descendencia presente este gen anormal y por lo tanto manifieste la enfermedad.

- Tipo recesiva, las dos copias del gen (paterna y materna) deben estar alteradas para expresar la enfermedad. Si sólo es anormal uno de los genes, la enfermedad no se manifiesta o su manifestación es muy leve; estos individuos son portadores de la enfermedad y pueden transmitirla a su descendencia. En general, en este tipo de enfermedades nos encontramos con que los descendientes varones tienen un riesgo de heredar la enfermedad del 50% (siempre y cuando el portador sea la madre y la enfermedad está ligada al cromosoma X), mientras que las mujeres suelen ser portadoras de la enfermedad.

Los embriones de sexo masculino poseen un riesgo del 50% de contener la enfermedad, mientras que los embriones de sexo femenino como mucho serán portadores de la enfermedad, pero así estaríamos descartando los varones portadores por lo que es mejor detectar y diferenciar los varones o hembras portadoras de los sanas mediante el empleo de la técnica PCR, siempre y cuando sea posible.

Existen alrededor de 300 enfermedades de este tipo 67 (74), los más destacados son la hemofilia, la distrofia muscular de Duchenne, el síndrome de Turner (mujeres que tienen un solo cromosoma X en lugar de dos), el síndrome de Klinefelter (varones que poseen 47 cromosomas, entre ellos 2 cromosomas X y uno Y, a veces incluso más de 2 cromosomas X), el síndrome de Lesch-Nyham, la adrenoleucodistrofia y muchos otros 68(75).

Aborto de repetición

Pacientes en las cuales se han producido dos o más pérdidas de gestación antes de la semana 20 de embarazo. Se suele indicar con más de dos abortos incluidos aquellas que

no son consecutivas, ya que la probabilidad de volver a abortar tras 2 o 3 abortos es similar (24-30% vs 30-33%). Alrededor de un 10% de todas las gestaciones clínicas certificadas terminan en una pérdida del feto (76). Y de un 50-60% de los abortos que se producen en mujeres con dos o más abortos previos es debido a anomalías cromosómicas (77).

En la mayoría de los casos, nos encontramos con padres con un cariotipo normal, por lo que la causa radicaría en fallos en la gametogénesis o en el desarrollo embrionario.

En la mayoría de los abortos causados por cromosomopatías, las trisomías son las responsables (71) y en numerosos estudios se ha visto que, en primer lugar, existe una notable variación entre trisomías de origen paterno y la etapa meiótica causante del cromosoma adicional. Por ejemplo, los errores paternos representan casi el 50% de los 47, XXY y la trisomía del cromosoma 2, pero solo del 5 al 10% de la mayoría de las otras trisomías, y rara vez, si es que alguna, son la causa de la trisomía 16 (72-80). De manera similar, la importancia de los errores en la meiosis primera y la meiosis segunda varía entre los cromosomas. Por ejemplo, entre las trisomías derivadas de la madre, la mayoría, si no todas, parecen deberse a errores en la primera meiosis, pero para las trisomías de los cromosomas sexuales, un tercio de los casos son asociados con errores en la segunda meiosis, y para la trisomía 18 la mayoría parecen deberse a una no disyunción en la meiosis II (73). Entonces, parece probable que hay efectos cromosoma-específicos que influyen en los patrones de no disyunción.

Sin embargo, por encima de esta variación específica del cromosoma hay al menos un tema general y es que los errores predominantes entre casi todas las trisomías son de origen materno y se producen en la primera división meiótica. Esto, tal vez no sea tan sorprendente ya que la primera división en las mujeres se inicia antes del nacimiento y no se completa hasta el momento de la ovulación e involucra comportamientos cromosómicos únicos para segregarse cromosomas homólogos en lugar de cromátidas hermanas.

Diversos autores han demostrado que la aplicación de DGP en estos pacientes provoca un aumento de las tasas de gestación e implantación y un descenso de las tasas de aborto (81-82).

Aun así, debemos conocer que en este tipo de pacientes existe otros factores de riesgo que pueden ser la causa de esos abortos, como son: Trombofilia familiar, Hipofibrinólisis familiar y Síndrome anticuerpo antifosfolipídico.

Fallo de implantación

Definido como aquellos grupos de pacientes con tres o más fallos en intentos de fecundación *in vitro* o fallo de gestación después de transferir embriones de buena calidad.

Estos fallos de implantación pueden ser originados por causas múltiples y poco definidos como pueden ser defectos en la relación embrión-endometrio, malformaciones uterinas, genes implicados en la implantación, factores inmunológicos, infecciones... Por otro lado, se ha descrito que existe un aumento de la tasa de aneuploidías cromosómicas en embriones de mujeres con 2 o más fallo de implantación (53-57). En este sentido el DGP es una herramienta que ayuda a mejorar las tasas de gestación e implantación (51,56).

En trabajos recientemente publicados encontraron que los fallos de implantación, después de tres transferencias de embriones euploides, con endometrios morfológicamente normales, sólo en un 5% se vuelve a producir un fallo de implantación. Esto apoya el concepto de que los fallos de implantación en Reproducción Asistida se deben principalmente a causas embrionarias en aproximadamente un 95% (83,84)

Edad materna avanzada

Generalmente está definido como mujeres mayores de 38 años, en las cuales existe un mayor porcentaje de ovocitos aneuploides dando lugar a embriones con anomalías cromosómicas. Actualmente muchos grupos utilizan esta indicación en mujeres mayores de 38 años. Parece que la incidencia de aborto con anomalías cromosómicas es del 82% en mujeres de 40 años o más (85). Estudiando la tasa de aneuploidías en los ovocitos de pacientes mayores de 39 años se ha observado un valor superior al 70%. Se ha visto que la anomalía más frecuente en estos pacientes es la monosomía, más común que la trisomía (86,87). Quizás todas estas monosomías, pueden alcanzar el estadio de blastocisto (88), por lo que la simple elección de embriones que llegan a blastocisto no es suficiente como método de selección de embriones para transferir.

En esta indicación si conseguimos obtener embriones cromosómicamente normales para ser transferidos, tienen una alta probabilidad de gestación. Por tanto, se da el aumento de la tasa de gestación por transferencia y una disminución de la tasa de aborto (89-91, 62).

Factor masculino severo

Esta indicación hace referencia a aquellos pacientes que muestran unos parámetros de semen muy alterados. Se sabe que las anomalías en los parámetros espermáticos afectan a un ciclo de reproducción asistida, de manera que se aprecia una bajada de la tasa de fecundación y gestación y un aumento de la tasa de aborto (92-96). Además, existe un incremento en la incidencia de aneuploidías en los espermatozoides de pacientes infértiles comparados con donantes (97-101). De hecho, se ha visto una correlación inversa entre la concentración espermática y la tasa de aneuploidías en espermatozoides (102,103), lo que provoca que embriones procedentes de pacientes azoospermicos tengan mayor tasa de anomalías cromosómicas que los que proceden de pacientes normozoospermicos u oligozoospermicos (104,105).

Parece ser que los pacientes con una alteración grave de los parámetros seminales, tienen una mayor tasa de anomalías cromosómicas tanto en los espermatozoides con morfología anormal como normal, por lo que la selección morfológica del espermatozoide mediante ICSI no es un proceso en estos casos, y hace necesario el empleo de DGP (106).

1.2.5. Limitaciones del DGP

- Son necesarias unas condiciones óptimas de cultivo para que los embriones evolucionen hasta el estadio de blastocisto y poder hacer la biopsia de trofoectodermo.
- También es necesario que el programa de vitrificación de embriones esté optimizado porque todos los embriones de diagnóstico genético se van a vitrificar a la espera de los resultados.
- Es necesaria una especialización y formación extensa para realizar la biopsia.
- Sigue existiendo un porcentaje de embriones que no tienen resultado después de hacer la biopsia, este número es pequeño y puede resolverse rebiopsiando el embrión.

1.2.6. Error diagnóstico del DGP

En un tratamiento de FIV y en concreto en un tratamiento de FIV con DGP, intervienen muchos factores y de su correcta ejecución depende el éxito de los mismos. Se pretende transferir un embrión libre de anomalías cromosómicas o libres de alguna enfermedad grave y para ello todos los procesos son muy cuidados pero en ocasiones puede que algo falle.

Puede ocurrir que se dé el nacimiento de un niño afecto por un diagnóstico con información limitada o porque nazca con una enfermedad diferente a la que se le aplicó la prueba.

Algunos diagnósticos erróneos han sido con riesgos calculados pero con unos resultados que no eran deseados.

Se debe hablar de un diagnóstico erróneo cuando ha existido un fallo en un procedimiento técnico, también cuando ese diagnóstico ha sido inexacto o interpretado de forma incorrecta.

También existen errores independientes de la técnica, como errores humanos al etiquetar las muestras, al identificarlas...Estos errores son evitables y los primeros que deben identificarse y eliminarse,

- **Error diagnóstico adverso:** estos errores se llaman así porque la consecuencia de ellos es grave para el paciente. Este tipo de errores se dan cuando nace un niño afecto de la enfermedad que hemos estudiado, provocando graves consecuencias en los pacientes y también en los técnicos que han analizado las muestras.
- **Error diagnóstico benigno:** cuando las consecuencias del error no son graves.

Para que no se produzcan estos errores es necesario realizar auditorías de calidad y técnicas para poder identificar posibles errores.

Siempre se debe identificar el error, las posibles causas de que se haya producido y tomar medidas para que no vuelva a ocurrir.

ADO (Allele Drop-out): este fenómeno se da cuando se amplifica una única célula y puede llevar a un diagnóstico erróneo del embrión. Lo que sucede es que se produce un fallo de amplificación de uno de los alelos donde se sitúa un marcador concreto, y se

interpreta como homocigoto un embrión que es heterocigoto. En los casos en los que se está analizando una enfermedad monogénica dominante puede ser relevante este hecho ya que puede que no amplifique el alelo portador de la enfermedad. En la mayoría de las publicaciones se publican datos para la PCR con una eficiencia de amplificación alrededor del 80% y tasas de ADO del 10%.

Contaminación: se puede dar contaminación por las células del cúmulo o las células espermáticas, por ello se deben extremar las precauciones realizando los procedimientos correctos. En los casos de DGP se recomienda el ICSI para realizarse la inseminación de los ovocitos. Así evitamos que en las muestras de estudio haya ADN procedente del padre y de la madre y se dé un diagnóstico erróneo.

También puede darse contaminación de ADN por incorrecta manipulación del operador o por amplicones de las PCRs.

Disomía uniparental: esta causa teórica puede provocar que se identifique un embrión heterocigótico como homocigótico cuando se analiza sólo una mutación.

Con la técnica de la PCR multiplex pueden darse patrones que parecen haploides en blastómeros, pero que también podrían ser disomías uniparentales.

Presencia de mosaicismo cromosómico: el mosaicismo embrionario está presente en las primeras etapas de su desarrollo y puede llevar a error. Ya que se analizan células del trofoectodermo que puede que no sean representativas del embrión.

Es difícil establecer un porcentaje de error debido al mosaicismo ya que hay una variabilidad muy alta entre distintos laboratorios.

1.3. FACTORES EXTRÍNSECOS

1.3.1. Concentración de oxígeno:

En los ciclos de diagnóstico genético preimplantacional, es muy importante que el embrión evolucione hasta su día cinco de desarrollo y además lo haga de forma óptima para que pueda dar gestación después de ser sometido a la biopsia embrionaria. Por eso, necesitamos optimizar las condiciones de cultivo que rodean al embrión. El oxígeno

(O₂) es uno de los factores extrínsecos al embrión que forma parte del cultivo y que debemos tener en cuenta, ya que tradicionalmente los embriones se han cultivado a concentraciones de O₂ superiores a las que hay dentro del útero y las trompas de mamíferos que fluctúa entre 2-8% (107,108)(Figura 4).

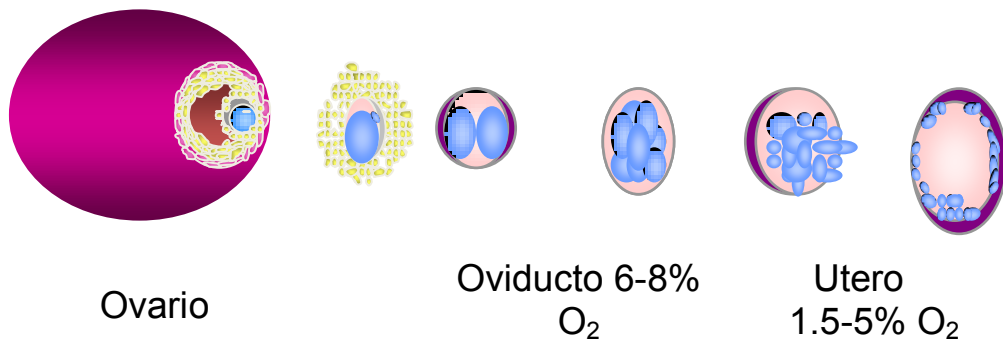


Figura 4. Concentración de Oxígeno en ovario, trompas y útero de distintos mamíferos

Diversos autores indican que una concentración alta de O₂ puede afectar al metabolismo embrionario a la tasa de aneuploidías y a la expresión génica.

Una alta concentración de oxígeno puede crear excesivas especies reactivas de oxígeno (ROS) produciendo apoptosis y fragmentación (Figura 5).

También pueden producir una división retardada, pérdida de fluidez de la membrana celular y daños en las proteínas, lípidos y ADN.

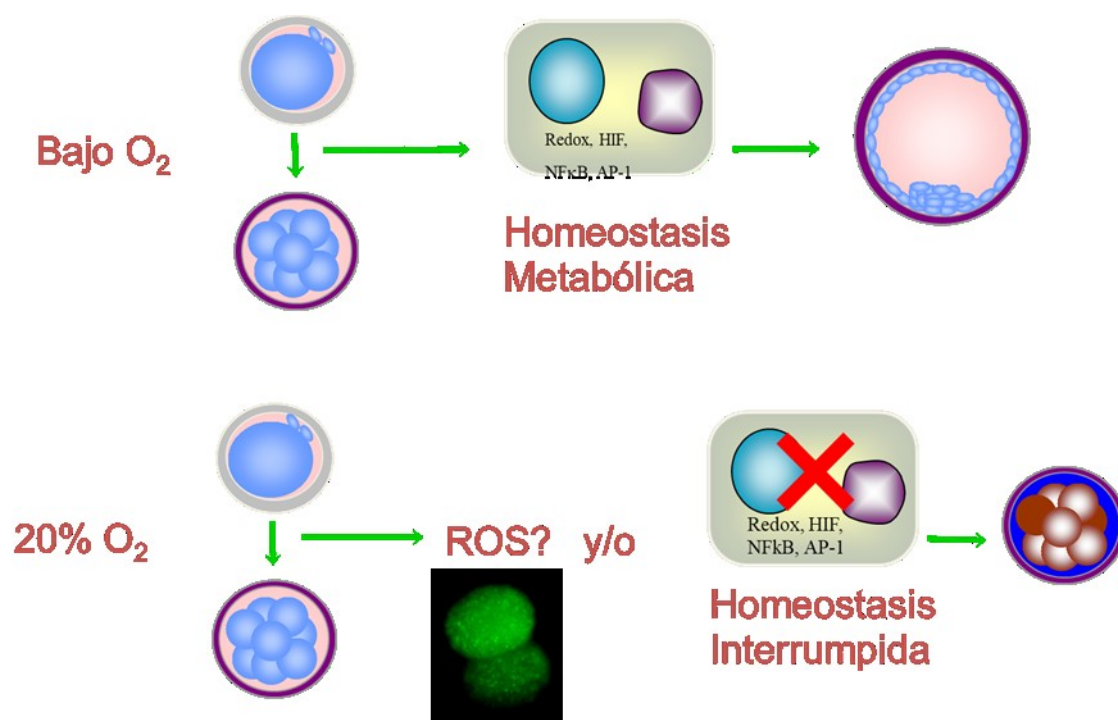


Figura 5. Las especies reactivas (ROS) pueden interrumpir la homeostasis celular

Hay numerosos estudios que nos dicen que la baja concentración de oxígeno mejora la calidad de los embriones, así como las tasas de embarazo y de recién nacido vivo (109-111)

1.3.2. Estimulación

Desde el inicio de la reproducción asistida en humanos, uno de los principales objetivos ha sido conseguir un embrión de buena calidad morfológica que pueda producir gestación (112-114). Para ello se han desarrollado mejores medios de cultivo con concentraciones de nutrientes similares a las que hay dentro del cuerpo de la mujer (115) lo que ha llevado a mejores resultados y a conseguir más nacimientos. Los medios de cultivo embrionarios siguen estando de actualidad y se estudian como base para la obtención de embriones de buena calidad, incluso en los últimos años se ha observado su influencia en la morfocinética embrionaria con las nuevas tecnologías de time-lapse (116). Pero no podemos tener un embrión de buena calidad si no tenemos embriones con los que trabajar, por eso otro de los grandes objetivos ha sido conseguir mayor número de ovocitos para poder trabajar. El primer embarazo humano logrado con FIV fue el resultado de un ovocito recuperado en un ciclo natural, pero rápidamente se vio

que este método tenía varios problemas, la necesidad de llevar a cabo varios controles con una baja tasa de éxito y alta de cancelación. Fue entonces cuando se comenzó a hacer uso de la estimulación ovárica con gonadotropinas para inducir un crecimiento folicular múltiple y obtener un mayor número de ovocitos y embriones candidatos a ser transferidos, factores que conducen a un aumento de las tasas de éxito en las técnicas de reproducción asistida (TRA)(Figura 6).

Las altas expectativas creadas por el uso de gonadotropinas, se vieron en parte empañadas por la preocupación sobre el posible efecto perjudicial sobre la calidad ovocitaria y embrionaria, no sólo desde el punto de vista morfológico y estructural sino también cromosómico.

El único modo de determinar con certeza la incidencia de aneuploidías en los embriones humanos sería estudiar aquellos fecundados *in vivo*, procedentes de mujeres con fertilidad probada y esto, claramente, no es posible, ya que para analizar un embrión se precisa la realización de un tratamiento de FIV. Esto hace imposible determinar el grado de implicación que podrían tener la estimulación hormonal y las condiciones ambientales de la FIV sobre las anomalías cromosómicas. En este sentido, las gonadotropinas podrían intervenir en la génesis de aneuploidías al afectar al proceso de segregación cromosómica durante la meiosis. Este hecho parece tener una correlación positiva con la dosis de gonadotropinas (117), así como con la respuesta elevada a la estimulación ovárica (118).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado cómo la tasa de anomalías cromosómicas aumenta conforme se incrementa el número de ovocitos obtenidos, independientemente de las dosis de gonadotropinas administradas. Es decir, la respuesta alta a la estimulación ovárica compromete la calidad del ovocito y, por tanto, está asociada con una alta tasa de embriones aneuploides. Se ha sugerido que esto es debido a una inmadurez citoplasmática (119), ya que en pacientes altas respondedoras la inducción de la ovulación se lleva a cabo cuando muchos folículos no son maduros todavía y ello conlleva a error en la segregación cromosómica. Un ejemplo es lo que ocurre en las donantes de ovocitos, en las que, a pesar de ser mujeres jóvenes y fértiles, la mitad de los embriones generados son cromosómicamente anormales (120). Lo cierto es que, independientemente del número de ovocitos obtenidos y de la dosis de gonadotropinas utilizadas, el número de embriones cromosómicamente normales es

relativamente constante en mujeres jóvenes, oscilando entre 2 y 6 embriones normales por ciclo de estimulación (121). Por tanto, no por estimular con dosis más altas vamos a obtener un mayor número de embriones euploides, sino que, lo que obtengamos por encima de cierto nivel, no será de buena calidad.

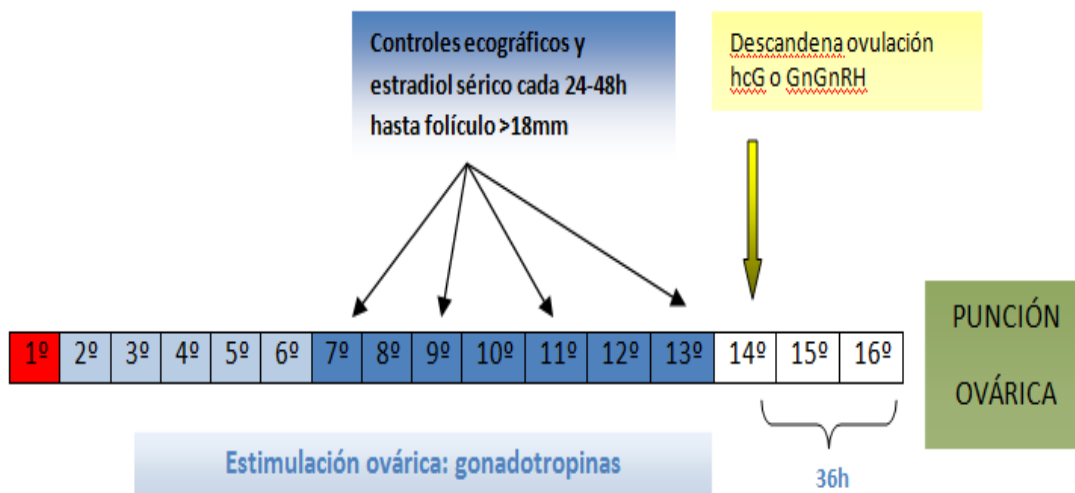


Figura 6. Esquema de un ciclo de estimulación ovárica controlada para FIV sin incluir los supresores hipofisarios (agonistas y antagonistas de GnRH).

1.3.3 Vitrificación

En cuanto al origen de los ovocitos existen estudios que nos indican que la congelación produce la despolimerización del huso, sin embargo, aquellos ovocitos que son capaces de repolimerizar el huso, presentan una alta capacidad implantatoria (122-123) (Figura 7).

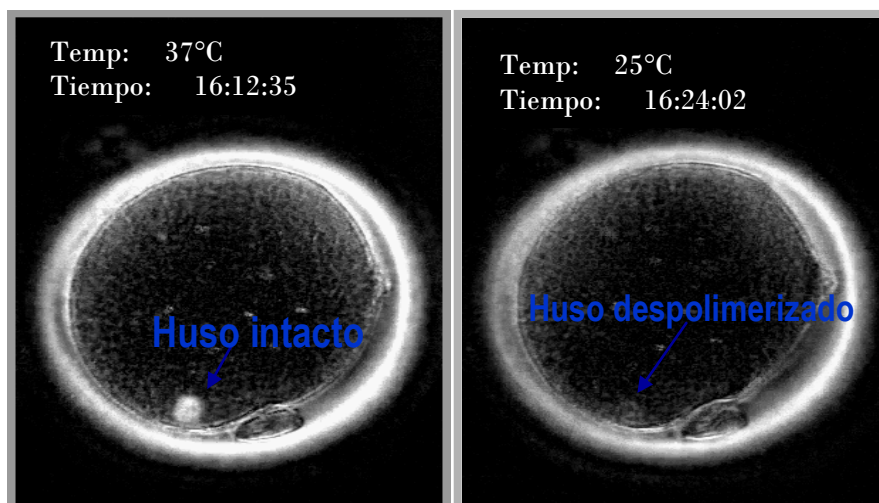


Figura 7. Fotografías hechas con Oosight® Imagen System, del huso meiótico de un ovocito desvitrificado

En humanos existen varios estudios, en algunos de ellos la vitrificación afecta a la expresión de diversos genes (124-125) y en otros no afecta (126). Por lo que es necesario introducir la vitrificación como un factor extrínseco para estudio.

1.3.4 Factor humano.

En los últimos años con las nuevas técnicas de análisis de los preembriones, se han podido estudiar los mosaicismos embrionarios, donde conviven células de distinta dotación cromosómica en el mismo preembrión. Estos avances han hecho que se estudien factores extrínsecos, como los protocolos de trabajo de distintos laboratorios, las personas que realizan la biopsia o la hora a la que se realiza dicha biopsia. Los últimos estudios publicados al respecto nos muestra que sí hay diferencias entre clínicas en el porcentaje de mosaicismo (127), estudiaron el tipo de estimulación de las donantes, la dosis de FSH suministrada a las donantes, la forma de selección de las mismas, el ginecólogo que realizaba la punción ovárica, el tipo de cultivo embrionario, las técnicas de biopsia... y encontraron que aunque no sabían con exactitud qué técnica empleada en cada clínica era la que más influencia tenía, sí que vieron que los datos eran estadísticamente significativos entre clínicas. Es necesario un estudio como éste para saber cómo influimos con nuestros protocolos de trabajo en los embriones.

1.4. FACTORES INTRINSECOS

1.4.1 Índice de masa corporal.

El Índice de Masa Corporal (IMC) relaciona el peso de una persona con su estatura y sirve para conocer si nos encontramos dentro de un intervalo óptimo. Para calcular el IMC hay que utilizar la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Altura}^2 (\text{m}^2).$$

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define que el estado nutricional del ser humano es saludable cuando el IMC se encuentra entre 18,50 y 24,99 (128)

La clasificación del estado nutricional en función del IMC de cada persona:

IMC < 18 Kg/m² Delgadez

IMC 18-25 Kg/m² Normal

IMC 25-30 Kg/m² Sobrepeso

IMC 30-45 Kg/m² Obesidad

IMC > 45 Kg/m² Obesidad mórbida

Se recomienda que todas las mujeres que están buscando embarazo tengan un IMC óptimo, para evitar no solo los problemas de fertilidad, sino también problemas en el embarazo que podría afectar la salud del futuro bebe.

A nivel mundial el sobrepeso y la obesidad se han convertido en uno de los problemas de salud más importante, ya que ese exceso de peso aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes (129-130).

La obesidad también afecta en gran medida a la capacidad reproductiva de las parejas, ya que reduce la probabilidad de concebir de forma natural y, también, disminuye el éxito de un tratamiento de reproducción asistida (131-135).

Esto es debido a que la grasa corporal tiene un efecto sobre la producción de estrógenos y el bloqueo de la GnRH, que es responsable a su vez de regular el funcionamiento de la hipófisis y la liberación de las hormonas FSH y LH.

Esta disfunción hormonal tiene efecto tanto en los ciclos menstruales de la mujer como en la producción espermática de los varones.

El aumento de estrógenos, en las mujeres con sobrepeso, afecta al eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovarios y provoca alteraciones como:

- Ciclos menstruales irregulares.
- Anovulación.
- Alteraciones en el endometrio.
- Mayor riesgo en cirugías reproductivas.
- Resistencia a la insulina y asociación con el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP)
- Riesgo de aborto espontáneo
- Mayor riesgo de complicaciones en el embarazo: hipertensión, diabetes gestacional, malformaciones congénitas, alto peso al nacer, parto por cesárea, etc.

Si estudiamos las TRA, las mujeres con obesidad o con sobrepeso, presentan una menor tasa de gestación debido a multitud de problemas que pueden surgir durante el ciclo:

- Resistencia a las gonadotropinas, por lo que necesitarán una mayor dosis hormonal en la estimulación ovárica
- Asincronía folicular y obtención de óvulos inmaduros
- Baja respuesta a la estimulación
- Mayor riesgo de cancelación del ciclo de RA.
- Aumenta el riesgo de complicaciones durante la punción folicular
- Menor tasa de fecundación
- Peor calidad embrionaria

En cuanto a las aneuploidías no se ha visto que haya más embriones aneuploides en pacientes con obesidad, pero sí que se ha visto una mayor tasa de aborto una vez que se ha transferido un embrión euploide (136-140).

1.4.2. El grosor endometrial.

Un adecuado grosor endometrial es crucial para una eficiente placentación e invasión del trofoblasto (Figura 8). Defectos en la placentación incrementan el riesgo de complicaciones obstétricas tales como problemas en el crecimiento fetal o bajo peso al nacer (141). Aunque hay nacimientos descritos con endometrios finos (142) la mayoría de los autores consideran que son niveles subóptimos (143-146) (Figura 9). Está bien establecido que la tasa de embarazo disminuye con endometrios por debajo de 7mm (147).



Figura 8. Endometrio trilaminar



Figura 9. Endometrio lineal

1.4.3. Edad Materna

Está descrito ampliamente que la tasa de embriones aneuploides aumenta con la edad, llegando a ser muy alta, alrededor del 80%, a partir de los 40 años. En pacientes de 26 a 30 años hay un bajo riesgo de tener embriones aneuploides pero a partir de esa edad empieza a crecer esta tasa. También aumenta el riesgo de tener anomalías complejas, es decir, que haya varias anomalías en un mismo embrión (148).

Hay numerosos estudios que indican que el DGP es beneficioso para pacientes de edad materna avanzada reduciendo notablemente la tasa de aborto y aumentando la tasa de embarazo (149,150)

A pesar de esta mejoría, siguen existiendo abortos y fallos de embarazo que no están causados por las aneuploidías. Por eso, quisimos estudiar el factor de la edad materna

como factor intrínseco posible causante del aborto después de la transferencia de un embrión euploide.

1.4.4 Edad Paterna

Durante la última década en el mundo occidental, ha habido un aumento significativo en la edad paterna en la que se concibe el primer hijo, ya sea debido al aumento de la esperanza de vida, el uso generalizado de métodos anticonceptivos, los matrimonios tardíos y otros factores. Mientras que el efecto del envejecimiento materno sobre la fecundación y la reproducción es bien conocido y varios estudios han demostrado que las mujeres por encima de los 35 años tienen mayor riesgo de infertilidad, complicaciones del embarazo, aborto espontáneo, anomalías congénitas y complicaciones perinatales. El efecto de la edad paterna sobre la calidad del semen y la función reproductiva es controvertido por varias razones. Primero, no existe una definición universal para el envejecimiento paterno avanzado. En segundo lugar, la literatura está llena de estudios con resultados contradictorios, especialmente para los parámetros más comunes evaluados.

La edad paterna avanzada además se ha asociado con un aumento del riesgo de enfermedad genética. Se han visto que los cambios epigenéticos, las mutaciones del ADN y las aneuploidías cromosómicas están también asociados con el aumento de la edad paterna (151). Además del aumento del riesgo de infertilidad masculina, también se ha demostrado que la edad paterna afecta los resultados reproductivos y de fertilidad, incluida una disminución en la tasa de éxito de FIV/ICSI y una tasa creciente de nacimientos prematuros (152). Y la edad paterna aumenta la incidencia de diferentes tipos de trastornos como el autismo, la esquizofrenia, los trastornos bipolares y la leucemia infantil en la progenie (153-155).

1.4.5 Abortos Previos

Conocemos que entre 1-2% de parejas que intentan embarazo tienen abortos recurrentes, y esta tasa se incrementa en los tratamientos de reproducción asistida. Además, entre el 4-5% de los casos de abortos, los progenitores son portadores de una anomalía estructural, generalmente balanceada, pero en el 95% de los casos, el origen de esa anomalía es de novo, de progenitores con cariotipos normales y puede ser causa

de estos abortos. Estas anomalías cromosómicas que causan el aborto, dependiendo de la aneuploidía que sea, se ha visto que tiene un origen materno o paterno (156).

Hallazgos recientes nos dicen que estos abortos están asociados con múltiples factores, incluido el aumento de la edad, los hábitos de vida de las mujeres, así como factores genéticos, trombofilia hereditaria y adquirida e infecciones. Los factores metabólicos y endocrinos, además de las causas anatómicas, como las malformaciones uterinas, también se han sugerido como factores causantes de estos abortos. Se esperaría que el manejo de estos abortos tuviese una causa específica; pero, en la mayoría de los pacientes no se conoce la causa (157).

La contribución de la disfunción uterina (como anomalías en la decidualización o la respuesta inmune) a la pérdida recurrente del embarazo sigue sin estar claro, en parte porque no hay una prueba para identificar la alteración del desarrollo uterino como causa de algún trastorno de implantación o del embarazo, y pocos han realizado estudios clínicos. El tratamiento del útero para prevenir la pérdida recurrente del embarazo en las mujeres sin factores de riesgo identificados, es una perspectiva atractiva, ya que el tratamiento podría administrarse antes del embarazo, por lo tanto, evitando posibles efectos adversos fetales (158).

Después de un aborto espontáneo, la probabilidad de tener otro va aumentando cada vez que hay un nuevo aborto (159).

El riesgo de aborto espontáneo aumenta en mujeres cuyo embarazo anterior terminó en un mortinato o aborto espontáneo, en comparación con mujeres sin antecedentes de aborto. El riesgo también es mayor para las mujeres con historia de muerte neonatal.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Aproximadamente el 35% de los embriones de los ciclos en reproducción asistida son anormales cromosómicamente, presentando esas anomalías en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Los factores extrínsecos a los embriones (estimulación, concentración de O₂, tipología de trabajo, vitrificación), pueden afectar al desarrollo embrionario y producir aneuploidías.

La tasa de aborto puede estar influenciada no solo por las anomalías cromosómicas sino por otras variables como el IMC, el grosor endometrial, el tipo de preparación del endometrio, la edad paterna, la edad materna, la duración de la infertilidad, la etiología femenina y masculina, la historia obstétrica, la calidad embrionaria en día 5 o el día en el que se realiza la biopsia.

2.2 OBJETIVOS

- Estudiar los factores externos que rodean al embrión, durante su evolución en el laboratorio y analizar la tasa de embriones aneuploides, tasa de gestación, tasa de implantación, tasa de aborto y tasa de recién nacido vivo.
- Estudiar qué factores clínicos y de laboratorio excluido el cromosómico están relacionados con el aborto después de transferir un embrión euploide.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

a) Se realizó un estudio retrospectivo, **unicéntrico** de 605 ciclos de pacientes a los que se les realizó un ciclo de FIV-ICSI con PGT-A entre los años 2017 y 2018 en IVI Madrid.

En el caso de las variables **estimulación y factor humano**, la población de estudio fueron 2741 embriones biopsiados en día 5 y/o 6 de desarrollo, de pacientes que se realizaron PGT-A en IVI Madrid entre los años de 2017 a 2018.

b) Una vez estudiados los factores extrínsecos, estudiamos las **variables de laboratorio y clínicas** que podían estar afectando a los abortos después de haber transferido un embrión euploide. Para ello diseñamos un estudio retrospectivo **multicéntrico** de 2832 ciclos de pacientes de PGT-A, del año 2017 a 2019 en el grupo IVIRMA-Global.

Para todas las variables de estudio se incluyeron pacientes de PGT-A con las indicaciones de fallo de implantación, aborto de repetición, edad materna avanzada y factor masculino severo.

Definimos **aborto de repetición** cuando se producen dos o más abortos antes de la semana 20 de embarazo. El **fallo de implantación** lo definimos como la ausencia de saco gestacional después de transferir al menos cuatro embriones de buena calidad en un mínimo de tres ciclos de reproducción asistida, ya sean ciclos con transferencia de embriones frescos o congelados y cuyas mujeres están por debajo de los 40 años (158). La indicación de **edad materna avanzada** la aplicamos en mujeres con edades por encima de 37 años. Y la indicación de **factor masculino** severo incluye azoospermias (ausencia de espermatozoides en el eyaculado tanto por causas obstructivas como no obstructivas) y oligoastenoteratozoospermia severas (concentraciones espermáticas en eyaculado en fresco por debajo de 1×10^6 espermatozoides por mililitro, movilidad inferior al 10% y morfología por debajo del 4%).

Los ciclos de pacientes con enfermedades monogénicas, con cariotipos alterados, así como las donantes de ovocitos fueron excluidos del estudio y solamente se incluyeron los primeros ciclos en los cuales se transfirió un único embrión euploide.

Aunque los embriones mosaicos no fueron transferidos, sí que se estudiaron para conocer si algunos factores externos podrían causar más mosaicismo en los embriones.

Embriones mosaicos son aquellos embriones que tienen varias líneas celulares con diferente dotación cromosómica. Así es que los embriones que resultaron cromosómicamente normales, analizados por NGS fueron clasificados como euploides, los embriones con alteraciones cromosómicas en todas las células analizadas de la biopsia de trofoectodermo, fueron clasificados como aneuploides, y aquellos embriones en los cuáles encontramos, células de la biopsia de trofoectodermo, cromosómicamente normales y otras anormales los clasificamos como embriones mosaicos. Todos los embriones mosaicos, independientemente del porcentaje de células anormales y del tipo de anomalía (trisomías mosaico, monosomías mosaicos, anomalías segmentales y complejas, aquellas que afectan a tres cromosomas o más), fueron descartados.

Consideramos embriones mosaicos de bajo grado aquellos cuyo porcentaje de células anormales estaban entre 30-50% y embriones mosaicos de alto grado los que sus células anormales eran de un 50-80%. Por debajo de un 20% de células anormales se consideraron embriones euploides, y por encima del 80% fueron considerados embriones aneuploides.

3.1.1 Variables de estudio

Variables de exposición

1. **Concentración de CO₂** en los incubadores de cultivo embrionario.
2. **Dosis de estimulación:** dosis de FSH suministrada a las pacientes y/o hMG/LH.
3. **Tipo de protocolo de estimulación:** protocolo largo con agonista de la GnRH, protocolo corto con agonista GnRH, protocolo con antagonista de la GnRH.
4. **Procedencia de los ovocitos:** ciclos frescos, ciclos vitrificados.
5. **Embriólogo** que realiza la biopsia embrionaria.: biólogo 1, 2,3, 4, y 5.
6. **Edad materna:** años.
7. **Edad paterna:** años.

8. **Índice de masa corporal:** Kg/m²
9. **Duración de la infertilidad:** años.
10. **Calidad embrionaria en D5:** A, B, C, D.
11. **Día de la biopsia embrionaria:** día 5 y/o día 6.
12. **Grosor endometrial:** milímetros. Dividido en cuartiles
13. **Tipo de preparación endometrial.:** ciclo natural, ciclo sustituido.

Variables de respuesta

- Tasa de aneuploidías** (número embriones anormales cromosómicamente/número embriones biopsiados en día 5 y 6 de desarrollo).
- Tasa de gestación** (número de pacientes con un resultado positivo en coriogonadotropina humana (hCG)/número de embriones transferidos).
- Tasa de implantación** (número de sacos gestacionales comprobados por ecografía a partir de la semana 5^a de embarazo / número de embriones transferidos).
- **Tasa de gestación clínica** (número de gestaciones comprobadas por ecografía, visualizándose uno o más sacos gestacionales con signos clínicos definitivos de embarazo / número de transferencias).
- Tasa de embriones biopsiados** (preembriones biopsiados en día 5,6 de desarrollo/embriones totales en día 5,6 de desarrollo).
- **Tasa de aborto clínico** (número de abortos espontáneos hasta la semana 20 de embarazo/número de pacientes con gonadotropina coriónica humana positiva).

- **Tasa de recién nacido vivo** (número de partos con resultado de un recién nacido vivo/número total de pacientes con transferencia embrionaria.

3.1.2 Grupos de estudio

- O₂:

Grupo 1: Pacientes en Incubadores con bajo O₂ (O₂~5%)

Grupo 2: Pacientes en Incubadores con alto O₂ (O₂~20%)

- ESTIMULACIÓN

Se hicieron 3 grupos de estudio según la dosis de gonadotropinas, grupo 1 pacientes con dosis bajas de FSH con dosis de hormona hasta 150 unidades internacionales (UI), grupo 2 pacientes con dosis de FSH intermedia 150 UI y 75 UI de hMG (hormona menopáusica humana) combinadas o 225 UI de hMG sola diariamente. Y grupo 3 con dosis altas de FSH de 225 UI y 75 microgramos de UI de hMG combinadas o 300 UI de hMG sola al día.

Otros tres grupos de estudio dependiendo del tipo de protocolo utilizado, grupo (a) protocolo largo con agonista de la GnRH grupo (b) protocolo corto con agonista de la GnRH y grupo (c) protocolo con antagonista de la GnRH

- FACTOR HUMANO.

Grupo 1: biólogo 1

Grupo 2: biólogo 2

Grupo 3: biólogo 3

Grupo 4: biólogo 4

Grupo 5: biólogo 5

- VITRIFICACIÓN:

Grupo 1: ovocitos vitrificados

Grupo 2: ovocitos frescos

-ÍNDICE DE MASA CORPORAL:

Grupo 1: IMC < 18 Kg/m². Delgadez

Grupo 2: IMC 18-25 Kg/m² Normal

Grupo 3: IMC 25-30 Kg/m² Sobrepeso

Grupo 4: IMC 30-45 Kg/m² Obesidad

Grupo 5: IMC > 45 Kg/m² Obesidad mórbida

- GROSOR DE ENDOMETRIO

Grupo 1: endometrio <7.8mm Medidas subóptimas por debajo de lo recomendado

Grupo 2: endometrio 7,8-8,8mm Medidas dentro de los valores normales

Grupo 3: endometrio 8,9-10,0 mm Medidas óptimas

Grupo 4: endometrio 10,1-12,0 mm Medidas dentro de los valores normales

Grupo 5: endometrio >12mm Medidas por encima del recomendado

- TIPO DE PREPARACIÓN DEL ENDOMETRIO

Grupo 1: Natural

Grupo 2: Sustituido

3. 2. METODOLOGÍA DE TRABAJO

La biopsia de trofoectodermo se realizó en día 5 o 6 de desarrollo, después los embriones fueron vitrificados, pendientes del resultado del análisis cromosómico. El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de genética (iGenomix)

La vitrificación fue llevada a cabo usando Cryotop® (Kitazato Corporation, Shizuoka, Japan), con el protocolo que se describe en este trabajo.

Todos los embriones desvitrificados fueron transferidos en un ciclo natural o sustituido según lo mejor para cada paciente y de acuerdo con su médico. Sólo se tuvieron en

cuenta aquellos ciclos en los que hubo supervivencia embrionaria, excluyendo aquellos embriones que no sobrevivieron, alrededor de un 5%.

En ciclos naturales, una vez que el folículo dominante alcanzó un diámetro medio de 17mm y el grosor del endometrio era ≥ 7 mm, se administraron 250 microgramos (μg) de coriogonadotrofina humana recombinante (rec hCG), y se añadió progesterona vaginal micronizada 200 mg/12 h a las 48 horas. La transferencia se programó 7 días después. En ciclos preparados hormonalmente, una vez se comprobó el reposo ovárico, mediante ecografía transvaginal, en los tres días primeros del ciclo, los pacientes comenzaron con 2 mg/8 h de valerianato de estradiol oral. Aproximadamente, 10 días después de iniciar estradiol, si el grosor del endometrio era ≥ 7 mm y el valor de la progesterona sérica está < 1 ng/ml, se mantuvieron los estrógenos orales y se comenzó con la progesterona vaginal micronizada 400 mg/12 h. La transferencia de embriones se realizó después de 5 días completos de administración de progesterona.

Todos los procedimientos y protocolos incluidos en este estudio (1806-MAD-045CN) fueron aprobados por el Instituto Valenciano de Fertilidad y por el comité de ética del Hospital Puerta de Hierro de Madrid.

3.2.1 Estimulación y punción ovárica

Se tuvieron en cuenta varios protocolos:

1.- Ciclo con agonista de la GnRH largo: en este tipo de protocolo se suprime la acción de las hormonas producidas por la paciente para que no interfieran en la estimulación. Se comienza administrando el agonista de la GnRH en la fase lútea tardía del ciclo anterior y posteriormente se administra FSH tras la menstruación.

2.- Ciclo con agonista de la GnRH corto: lo que produce el agonista es una supresión de la producción de hormonas en la hipófisis, pero su primer efecto es el contrario. El efecto 'flare up' que se produce, aumenta las concentraciones endógenas de gonadotropinas, aumentando así el número de folículos reclutados. Se utiliza cuando se sospecha de una respuesta ovárica baja. La administración del agonista y de la FSH comienza el segundo día del ciclo.

3.- Ciclo con antagonista: La estimulación comienza tras la regla. Cuando los folículos tienen un tamaño adecuado (12-14 mm) se añade el antagonista de la hormona liberadora de gonadotrofina (antGnRH) para evitar la ovulación. La duración del

tratamiento se reduce a 10-12 días. Aunque lo más utilizado para la estimulación en estas pacientes de diagnóstico genético preimplantacional fue un protocolo en el cual la paciente recibe una la dosis inicial diaria de 150 a 300 UI de rFSH. Normalmente esta se combina con 75 IU de HMG.

La administración de gonadotropinas comienza el tercer día de la menstruación o al quinto día después de dejar la última píldora anticonceptiva con dosis hormonal.

Para la maduración final de los ovocitos se utiliza una dosis de GnRH de 0,2 mg cuando al menos tres folículos al alcanzado un diámetro de 17-18mm. A las 36 horas se realiza la obtención de los ovocitos tras punción ovárica vía vaginal ecoguiada.

3.2.2 Cultivo embrionario.

La microinyección intracitoplasmática es la técnica recomendada en el DGP para evitar la contaminación del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida (160) que puede producirse si se fecundan por fecundación in vitro clásica. También se puede producir contaminación de origen materno por las células del cúmulo, esto se puede reducir desnudando los ovocitos para el ICSI (160).

La fecundación se confirmó, a las 16-20 horas después de la microinyección, por la presencia de los dos pronúcleos y por la extrusión del segundo corpúsculo polar.

Aquellos ovocitos fecundados correctamente y, que ahora son cigotos, se cultivaron en microgotas de medio de cultivo (Life Global, IVF) hasta el día 3 de desarrollo. En este día los embriones son evaluados y a aquellos embriones que son evolutivos se les realiza un orificio en su zona pelúcida mediante el láser (OCTAX, Herbron, Germany)

Se utilizó un láser de diodo infrarrojo (1.48 μ m) que dispara el rayo a través del objetivo del microscopio invertido; es decir, no se necesita el contacto directo con la zona diana, puesto que se produce una rotura térmica producida por la absorción de la energía del láser por la zona pelúcida del embrión. La placa y el medio de cultivo absorben una cantidad mínima de radiación. Y el efecto en la zona pelúcida es muy localizado produciéndose uno orificios redondos y precisos. El tiempo de exposición se reduce notablemente, esto es fundamental a la hora de realizar la biopsia embrionaria (161).

Después de hacer el orificio en la zona pelúcida (hatching asistido), los embriones se cultivaron en sus placas de cultivo hasta el día 5 o 6 de desarrollo, días en los que se realizó la biopsia de trofoectodermo.

3.2.3 Evaluación embrionaria.

Consideramos para evaluar la morfología de los embriones, el grado de desarrollo, la calidad de la masa celular interna y la calidad del trofoectodermo, basándonos en la clasificación propuesta por Gardner, et al (162).

- Según el grado de expansión se dividen en seis categorías:

Grado 1, el blastocele ocupa < 50% del volumen del embrión.

Grado 2, el blastocele ocupa > 50% del volumen del embrión.

Grado 3, el blastocele ocupa todo el volumen del embrión

Grado 4, blastocisto expandido, cuando el blastocele ocupa todo el embrión y tiene una zona pelúcida fina.

Grado 5, blastocisto haciendo hatching.

Grado 6, blastocisto fuera de la zona pelúcida, blasto hatched.

- Según la masa celular interna existen 4 categorías:

A, masa celular interna compacta con muchas células y en forma de pelota

B, masa celular interna, compacta con menos células que la de tipo A y de forma más alargada.

C, masa celular interna con muy pocas células, no compactas y difícilmente identificable.

D, masa celular inexistente o degenerada.

- Según el trofoectodermo existen 4 tipos:

A, el trofoectodermo está formado por muchas células y formando un epitelio denso y con células de la misma morfología.

B, el trofoectodermo tiene zonas en las que no se forma un epitelio denso, formado por menos células que el anterior tipo y con distintas morfologías.

C, muy pocas células forman el trofoectodermo, sin formar un epitelio y con células de distintas morfologías.

D, trofoectodermo degenerado

Los embriones fueron clasificados en día 5 o 6 como:

A, son embriones de alta calidad, B embriones de calidad media, C embriones de baja calidad y D embriones de calidad pobre.

- Embriones de alta calidad, son aquellos embriones con un grado de expansión de hatching o hatched con masa celular interna A y trofoectodermo A.

- Embriones de calidad media, aquellos embriones cuyo desarrollo es hatching, expandidos y hatched con masa celular interna B y trofoectodermo B.

- Embriones de baja calidad, son aquellos que en día 5 o 6 tienen un grado de expansión de hatching, expandido, morula compacta, blastocisto temprano o hatched con una masa celular interna tipo C y un trofoectodermo C.

- Embriones de la mala calidad, que son embriones degenerados con masas celulares D, degeneradas y trofoectodermo D, también degenerados.

Se biopsian embriones con un grado de expansión que nos permita diferenciar claramente la MCI y el TE. La MCI tienen que ser al menos una A y los trofoectodermo una C para poder hacer la biopsia.

3.2.4 Biopsia Embrionaria de Trofoectodermo

En general, la biopsia de trofoectodermo (TE) es una estrategia que ha supuesto un gran avance dentro de los laboratorios de reproducción asistida (FIV). Consiste en extraer de 5 a 10 células en D5 o día 6 de desarrollo. El blastocisto posee alrededor de 150 células, por lo que extraer 5-10 células supone un menor porcentaje de pérdida celular (3,3% a 10%) si lo comparamos con la extracción de un blastómero de un preembrión de 6-8 células, reduciéndose el contenido celular de un 12,5% a un 33%.

Las ventajas que se consiguen con la biopsia de trofoectodermo son:

- Aumentar el material disponible para realizar el análisis, tanto cromosómico como genético, en lugar de tener un blastómero o a lo sumo dos como ocurre en la biopsia en D3 de desarrollo.
- Menor riesgo de mosaicismo. Aunque este persiste, la tasa es significativamente más baja, aproximadamente 3-5%, que estadios de división celular más tempranos.
- Mayor coste-efectividad, ya que sólo se analizan los que llegan a blastocisto y completan su desarrollo y esto se ha asociado con un incremento en la tasa de nacidos vivos en última década
- Evitar el error de diagnóstico debido al alelo drop-out (ADO). También es cada vez más habitual realizar análisis combinados de PGT-A más PGT-M, mediante biopsia de TE (trofoectodermo), en parejas que por su situación puedan verse beneficiadas del estudio simultáneo de la enfermedad y la presencia de aneuploidías en los embriones, seleccionando para transfer aquellos embriones libres de la enfermedad y cromosómicamente normales.
- Es una técnica menos invasiva ya que podemos diferenciar masa celular interna (MCI), que daría lugar al propio feto y que quedaría intacta, y trofoectodermo (TE) que está confinado a placenta y que es de donde se realiza la biopsia (Figura 10).

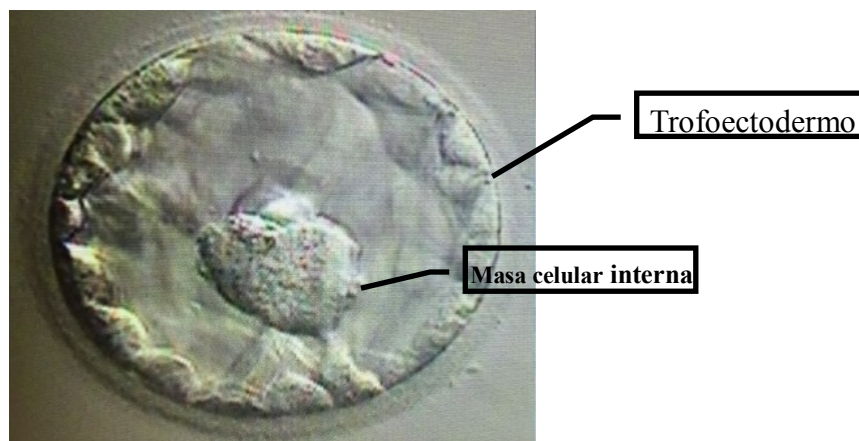


Figura 10. Blastocisto expandido

La biopsia de blastocisto es en estos momentos, una técnica sólida dentro de los laboratorios de PGD (Figura 11). Sin embargo, para efectuarse con total seguridad necesitamos unos altos estándares dentro del laboratorio, siendo necesaria la implementación de un buen sistema de cultivo hasta estadio de blastocisto y un excelente programa de vitrificación, ya que los embriones una vez biopsiados son vitrificados mientras estamos a la espera de conocer el resultado del estudio. Hay numerosas publicaciones, donde se pone de manifiesto que la biopsia de TE es un procedimiento que no afecta a la viabilidad del embrión ni a su potencial de implantación siendo la tasa de supervivencia tras la biopsia de alrededor de un 95%.

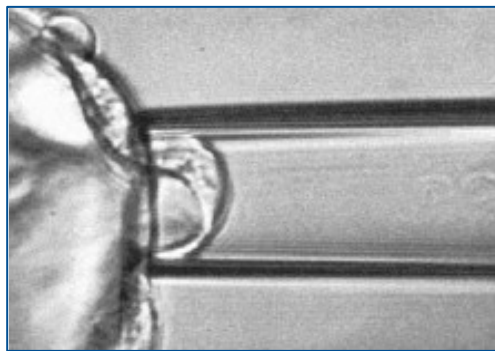


Figura 11. Biopsia de trofoectodermo

Material utilizado

Hay que tener en cuenta que la biopsia en estadio de blastocisto sólo se puede realizar utilizando el láser, no se recomienda el uso de ácido Tyrode.

Medios y soluciones

Medio de cultivo secuencial Blastocyst (Life Global©)

Aceite mineral: oil for tissue culture (LifeGuard©Oil). Previamente gaseado.

Fungible

Pipeta holding de TP de 25 μm de diámetro interno y 120 μm de diámetro externo.

Pipeta de aspiración de TPC 15 μm de diámetro interno.

Desarrollo de la técnica

Antes de realizar la biopsia en día 5-6 de desarrollo, debemos realizar un orificio en la zona pelúcida en el día 3 (Assisted Hatching: AH) (Figura 12) para facilitar la eclosión del embrión. Para la rotura se realiza un disparo a modo de orificio lineal en la zona pelúcida del embrión.

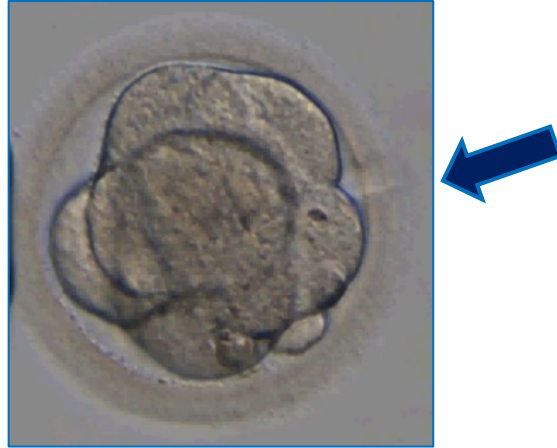


Figura 12. Assited Hatching

Una vez realizado el orificio, los embriones son devueltos al incubador y son cultivados hasta el día 5-6 de desarrollo.

El chequeo del desarrollo embrionario para determinar si el embrión ya está en el estadio de blastocisto correcto para realizar la biopsia se realiza: a las 10:00 a.m horas del día 5 y a las 9:00 a.m horas del día 6 de desarrollo. El mejor estadio para realizar la biopsia del blastocisto es cuando este está eclosionando. También se puede realizar si el embrión ha eclosionado completamente. Hacemos un único chequeo de los embriones. Aquellos que no estén aptos para biopsiar en D5 se descartarán o dejarán en observación hasta D6.

En día 5 o 6 de desarrollo se realiza la biopsia de trofoectodermo. Para ello, necesitamos aspirar las células a través del orificio que realizamos en día 3 de desarrollo en el embrión. Hay dos métodos para realizar la biopsia: método flicking y método pulling. En el método flicking se hace rodar la pipeta de aspiración sobre la pipeta de sujeción efectuando un movimiento rápido hacia abajo para conseguir que se separe el trozo de trofoectodermo aspirado (movimiento de fricción). La biopsia se hace en una placa de Petri y se biopsian máximo dos embriones por placa (Figura 13).

En el método de biopsia “pulling”, se tira hacia ambos lados del embrión, creando una tensión y una separación entre células que nos permite disparar el láser en las uniones intercelulares y poder separar la muestra de trofoectodermo del blastocisto.

Las células del trofoectodermo se introdujeron en un eppendorf hasta su procesamiento posterior según el tipo de análisis que se vaya a realizar

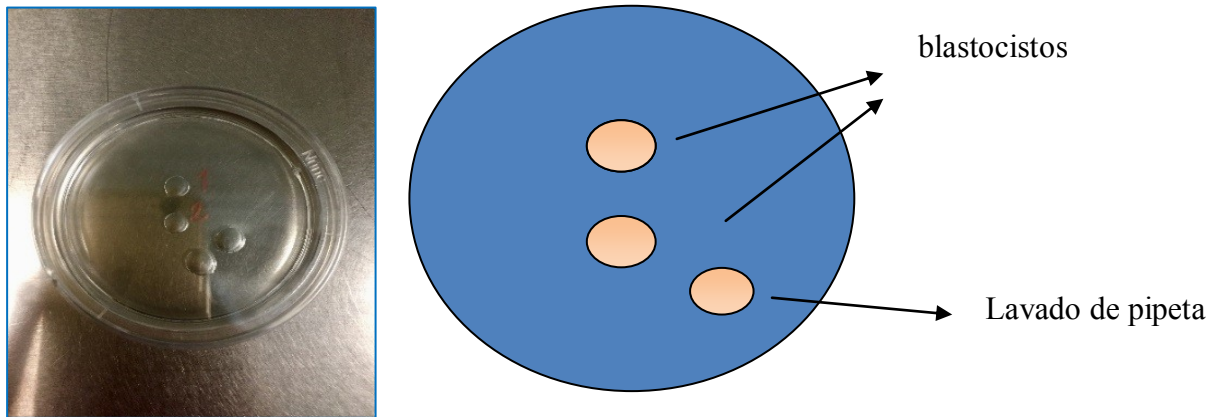


Figura 13. Placa de biopsia

3.2.5 “Tubing” celular

Consiste en introducir una célula en un tubo de análisis. Es muy importante estar seguros de haber introducido en el tubo únicamente la célula deseada, y deben tomarse estrictas medidas de precaución para evitar la contaminación con ADN externo.

Medidas de prevención de contaminación:

Usar siempre guantes para manipular todo el material utilizado para este procedimiento.

El operador debe ponerse primero bata de quirófano, gorro y mascarilla; después se colocará los guantes desechables.

Antes de iniciar el procedimiento, encender la luz ultravioleta de la campana y el flujo laminar 10-20 minutos. Limpiar el puesto de trabajo con alcohol (Figura 14).

La introducción de las células en tubos se realizará siempre en campana de flujo laminar y bajo lupa.

NO debe haber ADN cerca de la campana donde se realiza el procedimiento, ni donde se guarden los reactivos.

Es recomendable hacer una centrifugación rápida o spin a los tubos con solución de tubing para disponer todo el volumen en el fondo del tubo

Realizar en campana de flujo laminar. Cambiarse los guantes después de preparar el material.

Material utilizado

Lupa binocular.

Pipeta automática de 0.5 μ l a 10 μ l. .

Puntas estériles aptas para esta pipeta, con filtro y libres de ADN/ARN.

Sistema de micromanipulación controlado con boquilla.

Microcapilares de desnudación de vidrio 122-124 μ m

Placas Petri estériles.

Eppendorf de 0.2 ml

Bata de quirófano, gorro, máscara y guantes de látex (preferentemente sin polvos de talco).

Campana de flujo laminar con UV.

Marcadores permanentes de punta fina.

Soluciones

Medio de lavado Polivinilpirrolidona (PVP)

Es el medio en el cual se lavan las células antes de introducirlas en el tubo. Es una solución salina con un polímero que aporta densidad, favoreciendo la manipulación de las células. Debe almacenarse a 4⁰C en alícuotas de 1 ml (Figura 15)

Medio del eppendorf Phosphated Buffer Saline (PBS)

PBS (Phosphated Buffer Saline). Es una solución salina a 20x. Debe almacenarse a 4⁰C en alícuotas de 1 ml.

Aceite Mineral

Es un aceite mineral testado para el cultivo embrionario. Con él se cubren las gotas de lavado preparadas en la placa de Petri para evitar que se evaporen.



Figura 14. Preparación de la campana de tubing

Tras el lavado de la biopsia debemos cambiar de capilar, NUNCA el mismo capilar para lavar dos biopsias diferentes, aunque procedan del mismo embrión.

Una vez entubado el trofoectodermo se deberá rellenar adecuadamente la Plantilla Tubing.

Al analizar, debe comprobarse que todos los tubos están completamente cerrados y correctamente identificados (Figura 16).

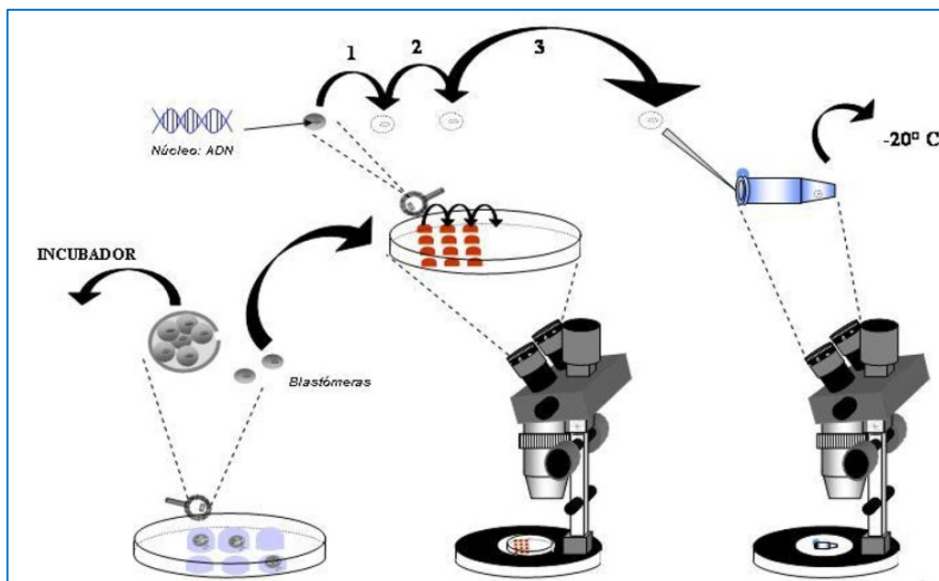


Figura 15. Tubing de la muestra biopsiada

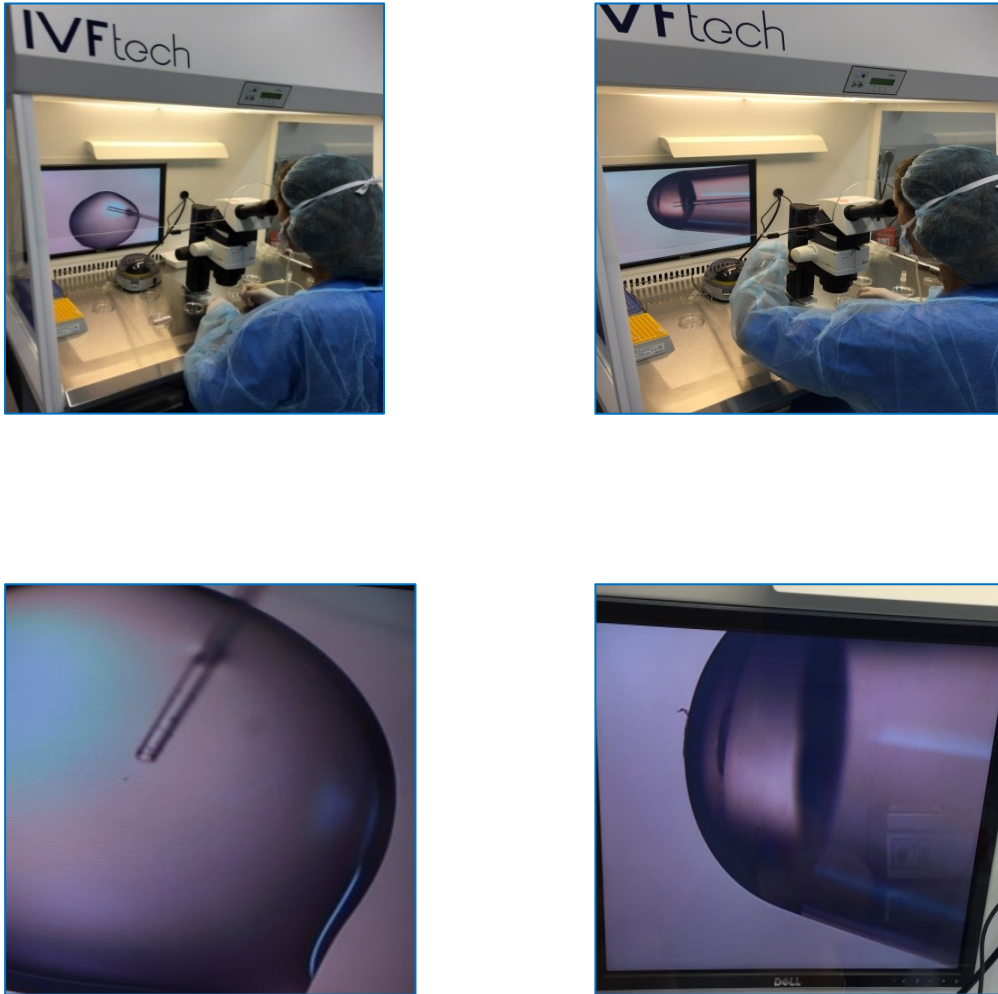


Figura 16. Proceso del tubing celular

3.2.6 Identificación de muestras biológicas, análisis y conservación.

Método de identificación de las muestras

Las muestras son anonimizadas de tal forma que sólo se recoge el resultado cromosómico. Asociada a cada muestra se envió, debidamente cumplimentada, la hoja de tubing para el análisis mediante NGS con los datos relativos a los preembriones a analizar.

Análisis de las muestras por NGS

Todos los análisis genéticos de las biopsias se realizaron en un solo laboratorio de referencia, eliminando la variación técnica en las pruebas como factor de confusión de las tasas de euploidia

El análisis de las muestras se realiza utilizando la tecnología de NGS. Para la preparación de librerías se utiliza el kit Ion ReproSeq[®]PGS para el análisis de aneuploidías de 24 cromosomas y el equipo Ion Chef[®]System (Thermo Fisher Scientific, USA). La secuenciación de las librerías se realiza con el secuenciador Ion S5 System (Thermo Fisher Scientific, USA). Para el análisis de los datos se utiliza el software Ion Reporter, que realiza el alineamiento de las lecturas respecto a la última versión del genoma humano de referencia (hg19) (Thermo Fisher Scientific, USA).

Conservación de las muestras

Aquellas muestras que van a ser procesadas mediante NGS son conservadas en IVI Madrid congeladas a -20 °C hasta que son transportadas a IGENOMIX S.L. Las muestras son transportadas dentro de neveras debidamente acondicionadas para su llegada a destino sin que se rompa la cadena de frío por una empresa autorizada para ello, tal y como se hace en la rutina clínica diaria. Una vez en las instalaciones de IGENOMIX S.L. se mantienen congeladas a -20 °C hasta el momento en el que vayan a ser procesadas. Una vez procesadas, las muestras se mantienen refrigeradas a 4 °C hasta la finalización del estudio, momento en el que las muestras serán eliminadas.

3.2.7 Vitricación de Embriones

Los medios se sacan de la nevera una hora antes de su utilización. Los embriones se vitrifican máximo 2 por cryotops.

Preparación de la placa de vitricación siguiendo este esquema (Figura 17):

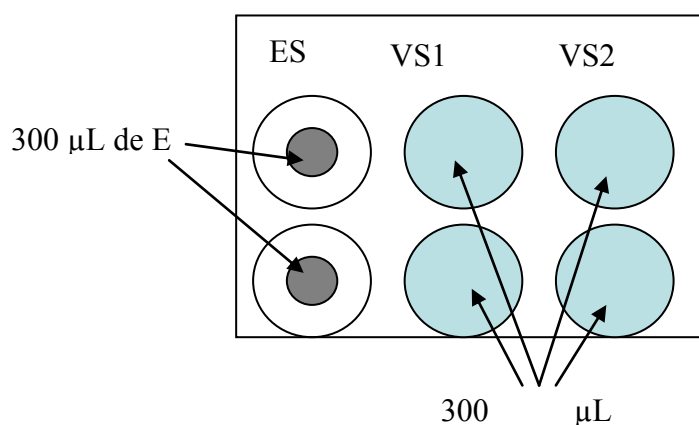


Figura 17. Placa de vitricación de embriones

2. Pasar los embriones con una pipeta Flexipet de 170 nm de diámetro al pocillo ES. Esperar hasta los 12 minutos. Si los preembriones ya están reexpandidos comenzar el lavado en VS, sino esperar hasta los 15 minutos.
3. Pasar los preembriones con mínimo volumen al primer pocillo de VS. Dejarlos en la superficie y retirar todo el medio ES. Lavar llevándolos al fondo del pocillo y cambiando de zona dentro de este.
4. Pasarlos al segundo pocillo de VS y volver a lavar.
5. Transcurrido un minuto en VS, cargar en el cryotop con el mínimo medio posible. Retirar el medio hasta dejar sólo una película de medio cubriendo los preembriones.
6. Sumergir en nitrógeno mediante un movimiento recto y rápido.
7. Repetir el mismo proceso de lavado en VS con el resto de preembriones, de 3 en 3 como máximo.
8. Poner el protector a los cryotops con las pinzas.
9. Guardar los cryotops en el banco que corresponda.

3.2.8 Desvitrificación de embriones

Sacar los medios de la nevera una hora antes de su utilización. Meter el medio TS en un incubador durante al menos 1 hora. No abrir. Meter también una placa petri pequeña. Preparar la placa de desvitrificación siguiendo el siguiente esquema (Figura 18):

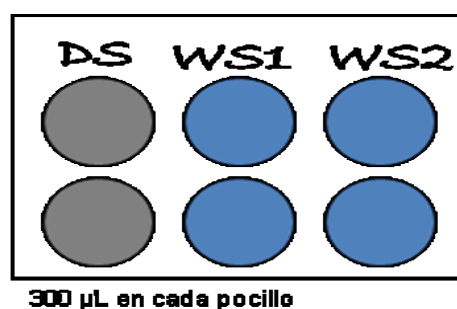


Figura 18. Placa de desvitrificación de embriones

Llenar el recipiente de nitrógeno líquido. Sacar el gobelet con los cryotops de la paciente que vamos a desvitrificar del banco y colocarlo en el recipiente de nitrógeno

líquido. Con unas pinzas frías quitar el tapón de protección de los cryotops a desvitrificar.

En el momento que está todo preparado, sacar el medio TS del incubador verter el contenido de TS en una placa petri caliente en el mínimo tiempo posible.

Coger el cryotop a desvitrificar y sumergir rápidamente la lengüeta del cryotop en el medio TS a 37°C. Aspirar suavemente los ovocitos/preembriones y depositarlos en el fondo de la placa TS. Tiempo total en TS: 1 minuto.

Pasar los ovocitos/preembriones al pocillo DS. Esperar 3 minutos.

Pasar los ovocitos/preembriones a la placa WS1. Esperar 3 minutos.

Pasar los ovocitos/preembriones a la placa WS2. Esperar 3 minutos.

Pasar los ovocitos/preembriones a una placa de cultivo, lavarlos y dejarlos debidamente rotulados

Pasar a la placa de transfer si se van a transferir ese mismo día

3.3 DEFINICIÓN DE LAS TASAS CLÍNICAS

Las tasas clínicas incluyen, tasa de implantación, tasa de embarazo, tasa de aborto, tasa de recién nacido vivo, tasa de aneuploidías, tasa de blastocisto y tasa de aborto clínico.

Tasa de implantación (número de sacos gestacionales comprobados por ecografía a partir de la semana 5ª de embarazo / número de embriones transferidos).

Tasa de gestación clínica (número de gestaciones comprobadas por ecografía, visualizándose uno o más sacos gestacionales con signos clínicos definitivos de embarazo / número de transferencias).

Tasa de embriones biopsiados (preembriones biopsiados en día 5,6 de desarrollo/embriones totales en día 5,6 de desarrollo).

Tasa de aborto clínico (número de abortos espontáneos hasta la semana 20 de embarazo/número de pacientes con gonadotropina coriónica humana positiva.

Tasa de recién nacido vivo (número de partos con resultado de un recién nacido vivo/número total de pacientes con transferencia embrionaria.

3.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS

La información necesaria fue exportada desde la clínica gestor de información, SIVIS (base de datos IVI) a una tabla de Excel a través de un sistema de consulta de base de datos. Los datos exportados fueron debidamente encriptados para proteger la información clínica y personal de los pacientes como previsto por la ley aplicable en el lugar donde se llevó a cabo el proyecto de investigación. Previo al estudio estadístico, se llevó a cabo un análisis exploratorio para revisar la calidad de la información extraída. Una vez terminado, se utilizó para el análisis el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales, versión 20.0 (SPSS, IBM Corporation, NY, EE. UU.)

Las variables continuas se expresaron como valores medios y desviaciones estándar, mientras que las variables categóricas fueron expresadas como proporciones (porcentajes), con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se utilizó la prueba de ANOVA para variables cuantitativas, mientras que la prueba de chi-cuadrado se utilizó para comparar proporciones. Para verificar la distribución normal de los datos y la homogeneidad en las varianzas, la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Leven fueron aplicadas respectivamente.

La razón de probabilidades de todas las variables de aborto espontáneo generadas se expresó con intervalos de confianza del 95%. Y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor estaba por debajo de 0,05.

Se realizó una regresión logística multivariante para cuantificar el efecto de diferentes variables (edad de la mujer, edad del hombre, índice de masa corporal, años de infertilidad, etiología femenina, etiología masculina, antecedentes obstétricos, calidad embrionaria, día de la biopsia, ciclo natural modificado o ciclo de reemplazo, tipo de hormona terapia de reemplazo y grosor endometrial) sobre la tasa de aborto.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO

Para el estudio de la variable concentración de oxígeno se analizaron 605 ciclos de PGT-A entre los años 2017 y 2018 en IVI Madrid. La edad media de las pacientes en el grupo de baja concentración de oxígeno fue de 37.3 ± 0.6 años y en el grupo de alta concentración fue de 40.2 ± 0.3 años. El porcentaje de ciclos con transferencia fue estadísticamente significativo $p < 0.05$ siendo mayor en el grupo de baja concentración de oxígeno 68.5% frente al 38.6% del grupo de alta concentración de oxígeno.

| CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO EN CICLOS TOTALES DE PGT-A | BAJA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~5%) (n=108) | ALTA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~20%) (n=497) | p-valor |
|---|---|--|---------|
| MEDIA EDAD | 37.3 ± 0.6 | 40.2 ± 0.3 | 0.45 |
| Tasa de Transferencia (n°transferencias/n°ciclos)% | 74/108= 68.5% | 192/497= 38.6% | <0.05 |
| Tasa de Gestación (n°gestaciones/n°transferencias)% | 45/74= 60% | 98/192= 51% | 0.08 |
| Tasa de Gestación Clínica (n°gestaciones clínicas/n°transferencias) | 42/74=56.7% | 92/192= 47.9% | 0.09 |
| Tasa de Implantación (sacos gestacionales /n°embriones transferidos) | 53/113= 47% | 61/126= 48.4% | 0.79 |
| Tasa de Aborto (n°abortos/n°gestaciones) | 3/45= 6,6% | 6/98= 6.1% | 0.96 |
| Tasa de Blastocisto (n°totales blastos/n° totales embriones biopsiados)% | 405/706= 57.3% | 1171/2448= 47.8% | 0.07 |
| Tasa de embriones euploides (n° embriones euploides/n°embriones biopsiados)% | 165/706= 23.3% | 355/2448= 14.5% | <0.05 |

Tabla 1. Tasas clínicas en los grupos de baja y alta concentración de oxígeno

El porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto fue de un 57.3% en el grupo de baja concentración de oxígeno y de un 47.8% en el en el grupo de alta concentración de oxígeno, aunque no fue estadísticamente significativo se ve una

tendencia a la mejora del cultivo cuando los incubadores tienen una tensión de oxígeno alrededor del 5%. Y la tasa de embriones normales fue superior en el grupo de embriones cultivados a baja concentración de oxígeno con un 23.3% de embriones normales frente a un 14,5% (Tabla 1).

Al estratificar los casos según la indicación del PGT-A, según eran pacientes con fallos de implantación, con edad materna avanzada o con abortos de repetición, obtuvimos los siguientes resultados: para los pacientes de fallos de implantación no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tasas clínicas analizadas (Tabla 2).

| CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO CICLOS DE FALLOS DE IMPLANTACIÓN | BAJA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~5%) (n=13) | ALTA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~20%) (n=18) | p- valor |
|--|--|---|----------|
| MEDIA EDAD | 35.9± 0.3 | 35.5± 0.5 | 0.34 |
| Tasa de Transferencia (nºtransferencias/nºciclos)% | 11/13= 84.6% | 14 /18= 77.7% | 0.63 |
| Tasa de Gestación (nºgestaciones/nºtransferencias)% | 4/11= 36.3% | 4/14= 28.5% | 0.64 |
| Tasa de Gestación Clínica (nºgestaciones clínicas/nºtransferencias) | 36.3% | 3/14= 21.4% | 0.36 |
| Tasa de Implantación (sacos gestacionales /nºembriones transferidos) | 4/16= 25% | 6/21= 28.5% | 0.82 |
| Tasa de Aborto (nºabortos/nºgestaciones) | 0% | 1/4= 25% | - |
| Tasa de Blastocisto (nºtotales blastos/nº totales embriones biopsiados)% | 42/73= 57.5% | 57/102= 55.8% | 0.92 |
| Tasa de embriones euploides (nº embriones euploides/nºembriones biopsiados)% | 22/73= 30.1% | 34/102= 33.3% | 0.85 |

Tabla 2. Tasas clínicas para la indicación de fallo de implantación en los grupos de baja y alta concentración de oxígeno.

Para los pacientes con la indicación de abortos de repetición nos encontramos que las tasas clínicas que son estadísticamente significativas son la tasa de transferencia, la tasa de blastocisto y la tasa de embriones normales. Estas son superiores en el grupo de

embriones cultivados con bajas concentraciones de oxígeno (Tabla 3). Se transfirieron más embriones en el grupo de baja concentración de oxígeno, un 75.5% frente a un 58.3% en el grupo de alta concentración de oxígeno. También consiguieron llegar al estadio de blastocisto un mayor porcentaje de embriones en el grupo de baja concentración de oxígeno un 59% frente a un 45.8%.

| CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO EN CICLOS DE ABORTOS DE REPETICIÓN | BAJA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~5%) (n=33) | ALTA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~20%) (n=36) | p-valor |
|---|--|---|---------|
| MEDIA EDAD | 35.9± 0.2 | 36.0± 0.5 | 0.34 |
| Tasa de Transferencia (n°transferencias/n°ciclos)% | 25/33= 75.7% | 21/36= 58.3% | 0.12 |
| Tasa de Gestación (n°gestaciones/n°transferencias)% | 14/25= 56.0% | 8/21= 38,1% | 0.13 |
| Tasa de Gestación Clínica (n°gestaciones clínicas/n°transferencias) | 13/25= 52.0 % | 38.1% | 0.22 |
| Tasa de Implantación (n°sacos gestacionales /n°embriones transferidos) | 17/40= 42.5% | 10/27= 37.0% | 0.65 |
| Tasa de Aborto (n°abortos/n°gestaciones) | 1/14= 7.1 % | 0% | - |
| Tasa de Blastocisto (n°totales blastos/n° totales embriones biopsiados)% | 139/236= 59.0% | 115/251= 45.8% | <0.05 |
| Tasa de embriones euploides (n° embriones euploides/n°embriones biopsiados)% | 62/236= 26.3% | 46/251= 18.3% | <0.05 |

Tabla 3. Tasas clínicas para la indicación de abortos de repetición.

Además, se obtuvieron más embriones euploides en el grupo de baja concentración un 26,3% frente un 18,3% de embriones euploides en el grupo de alta concentración.

Para la indicación de edad materna avanzada, encontramos que no hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tasas clínicas estudiadas (Tabla 4).

La población del grupo de baja concentración de oxígeno es sensiblemente menor al otro grupo de estudio. Esto es debido a que cuando se empezaron a utilizar incubadores a baja concentración de oxígeno, se comenzó con un número pequeño de pacientes y luego se fue aumentando el número, cuando se comprobaron que las tasas clínicas eran las óptimas.

| CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO | BAJA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~5%) (n=29) | ALTA CONCENTRACIÓN OXÍGENO (~20%) (n=386) | p-valor |
|--|--|--|---------|
| MEDIA EDAD | 41.0 | 41.4 | 0.24 |
| Tasa de Transferencia (n°transferencias/n°ciclos)% | 13/29= 44.8% | 121/386= 31.3% | 0.13 |
| Tasa de Gestación (n°gestaciones/n°transferencias)% | 9/13= 69.2% | 60/121= 49.5% | 0.17 |
| Tasa de Gestación Clínica (n°gestaciones clínicas/n°transferencias) | 69.2% | 57/121= 47.1% | 0.12 |
| Tasa de Implantación (n°sacos gestacionales /n°embriones transferidos) | 11/17= 64.7% | 63/146= 43.1% | 0.09 |
| Tasa de Aborto (n°abortos/n°gestaciones) | 0% | 3/60=5% | - |
| Tasa de Blastocisto (n°totales blastos/n° totales embriones biopsiados)% | 71/156= 45.5% | 759/1715= 44.2% | 0.75 |
| Tasa de embriones euploides (n° embriones euploides/n°embriones biopsiados)% | 26/146= 14.7% | 190/1715= 11.1% | 0.18 |

Tabla 4. Tasas clínicas para la indicación de edad materna avanzada

4.2 VITRIFICACIÓN

Otra de las variables que estudiamos fue la vitrificación de los ovocitos. Se hicieron dos grupos: ovocitos vitrificados y ovocitos frescos. Y obtuvimos que las dos tasas que eran estadísticamente significativas fue la tasa de transferencia, que era mayor en el grupo de los ovocitos vitrificados con un 63% de tasa de transferencia frente a un 42.1% en los ciclos con ovocitos frescos. También encontramos diferencias en la tasa de embriones normales siendo ésta más alta en el grupo de ovocitos vitrificados con un 23% de

embriones normales frente a un 16.7% de embriones normales en el caso de los ovocitos frescos (Tabla 5)

| ORIGEN DEL OVOCITO | OVOCITOS VITRIFICADOS n=62 | OVOCITOS FRESCOS n=437 | p- valor |
|--|-------------------------------|---------------------------|----------|
| MEDIA EDAD | 39.3±0.7 | 39.7±0.5 | 0.35 |
| Tasa de Transferencia (n°transferencias/n°ciclos)% | 39/62= 63% | 184/437= 42.1% | <0.05 |
| Tasa de Gestación (n°gestaciones con beta positiva/n°transferencias)% | 24/39= 61.5% | 104/184= 56.5% | 0.56 |
| Tasa de Gestación Clínica (n°gestaciones clínicas/n°transferencias) | 22/39= 56.4 % | 96/184= 52.1% | 0.62 |
| Tasa de Implantación (n°sacos gestacionales /n°embriones transferidos) | 32/62= 51.6% | 123/243= 50.6% | 0.92 |
| Tasa de Aborto (n°abortos/n°gestaciones) | 2/24= 8.3% | 8/104= 7.7% | 0.82 |
| Tasa de Blastocisto (n°totales blastos/n° totales embriones biopsiados)% | 214/382= 56% | 1041/2058= 50.6% | <0.05 |
| Tasa de embriones euploides (n° embriones euploides/n°embriones biopsiados)% | 89/382= 23.3% | 344/2058= 16.7% | <0.05 |

Tabla 5. Tasas clínicas en ciclos con ovocitos frescos y ovocitos vitrificados.

4.3 ESTIMULACIÓN

En cuanto a la influencia que pudiese tener la estimulación en la tasa de embriones normales encontramos que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de estimulación según la concentración de FSH. Tampoco existen diferencias entre los distintos tipos de protocolos de estimulación (Tabla 6).

| GRUPOS DE ESTIMULACIÓN SEGÚN DOSIS DE FSH DIARIA | GRUPO 1 Baja concentración de FSH <150UI (n= 745) | GRUPO 2 Concentración de FSH Intermedia 150-225UI (n=1499) | GRUPO 3 Alta concentración de FSH>225UI (n=497) | p-valor |
|--|---|---|---|----------------|
| Edad media mujer (años) | 39.1±0.3 | 39.3±0.5 | 39.4±0.5 | 0.45 |
| Edad media hombre (años) | 40.8±0.2 | 40.8±0.6 | 40.7±0.4 | 0.36 |
| Tasa de embriones normales (nºembriones normales/ nºembriones totales biopsiados%) | 249/745=33.2% | 509/1499=33.9% | 150/497= 30.1% | 0.24 |

Tabla 6. Tasa de embriones normales según concentración de FSH.

4.4 FACTOR HUMANO

Otra de las variables que estudiamos fue el embriólogo que realiza las biopsias embrionarias, queríamos ver si influía el factor humano en el resultado del análisis cromosómico. Para ello dividimos en 5 grupos, según el embriólogo del equipo de diagnóstico genético de IVI Madrid que realizaba la biopsia embrionaria y vimos que no había diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 7). También estudiamos si tenía alguna influencia en el grado de mosaicismo (bajo o alto mosaicismo) la persona que hiciera la biopsia.

De los 2741 embriones analizados, 328 fueron mosaicos. Del total de embriones mosaicos 130 fueron embriones mosaicos de alto grado y 198 fueron de bajo grado. Analizamos el embriólogo que había realizado la biopsia a cada embrión y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. No había ningún embriólogo que tuviese una tasa de embriones mosaico de alto grado o de bajo grado estadísticamente significativa.

| EMBRIÓLOGOS | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | P-valor |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| N (ABRIL 2017-ABRIL 2018) Número de embriones biopsiados | 559 | 537 | 552 | 540 | 553 | |
| Tasa de embriones normales % (n°embriones normales/n° embriones totales biopsiados) | 43,9% | 42,5% | 40,8% | 41,3% | 43,2% | NS |
| Tasa de embriones mosaico% (n°embriones mosaico /n°embriones totales) | 76/559= 13,5% | 63/537= 11,7% | 63/552= 11,4% | 62/540= 11,4% | 64/553= 11,5% | NS |
| Tasa de embriones mosaico alto grado% (n°embriones mosaico alto grado 60-80% /n°embriones totales) | 32/76= 42,1% | 26/63= 41,2% | 23/63= 36,5% | 21/62= 33,8% | 25/64= 39,0% | NS |
| Tasa de embriones mosaico bajo grado% (n°embriones mosaico bajo grado 20-60 %/n°embriones totales) | 44/76= 57,8% | 37/63= 58,7% | 40/63= 63,4% | 41/62= 66,1% | 39/64= 60,9% | NS |

Tabla 7. Tasas de embriones normales por embriólogo que realiza la biopsia.

4.5 FACTORES INTRÍNSECOS QUE INFLUYEN EN EL ABORTO DESPUÉS DE LA TRANSFERENCIA DE UN EMBRIÓN EUPLOÍDE.

Una vez analizados los factores extrínsecos que podían influir en la tasa de embriones anormales y en las tasas clínicas, estudiamos qué otros factores podrían influir en los abortos que se producían tras la transferencia de un embrión euploide. Estudiamos un total de 2.832 ciclos con pacientes bajo la indicación de PGT-A. La edad media de las mujeres fue de 38.2 ± 3.5 años y la edad media de los hombres fue de 40.1 ± 5.5 años.

El número medio de ovocitos recuperados fue de 11.9 ± 7.9 , ovocitos inseminados 11.1 ± 6.0 y ovocitos fertilizados 8.3 ± 4.7 . El número medio de blastocistos y blastocistos euploides biopsiados fue de 4.1 ± 2.8 y 2.1 ± 1.6 , respectivamente. La tasa de embarazo clínico fue del 59.1 %, la tasa de implantación fue del 59.1 %, la tasa de aborto espontáneo clínico fue del 13,1 % y la tasa de nacidos vivos fue del 45.3 %.

Como se muestra en la Tabla 8, no encontramos diferencias en las tasas de aborto entre diferentes grupos de calidad embrionaria: alta calidad = 11.3%; calidad normal = 12.8%; baja calidad = 11.8%; mala calidad = 12.5%, $p = 0.83$.

| | Calidad Alta (A) (n=542) | Calidad Media (B) (n=1618) | Calidad Baja(C) (n=714) | Calidad Muy baja(D) (n=119) | P- valor | |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------|--|
| Edad mujer (años) | 37.8 ± 0.3 | 38.3 ± 0.2 | 38.0 ± 0.3 | 38.4 ± 0.6 | 0.05 | N/S |
| Edad hombre (años) | 39.7 ± 0.5 | 40.1 ± 0.3 | 40.1 ± 0.5 | 40.8 ± 1.0 | 0.45 | N/S |
| IMC (kg/m2) | 23.0 ± 0.5 | 23.5 ± 0.3 | 23.7 ± 0.5 | 23.5 ± 1.5 | 0.24 | N/S |
| Duración infertilidad (años) | 0.8 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | 0.9 ± 0.2 | 1.0 ± 0.4 | 0.87 | N/S |
| Abortos previos | 0.77 ± 0.1 | 0.81 ± 0.09 | 0.85 ± 0.2 | 0.93 ± 0.4 | 0.82 | N/S |
| Número de ovocitos | 14.4 ± 0.8 ^a | 12.5 ± 0.4 | 11.5 ± 0.7 ^a | 12.2 ± 1.3 | <0.001 | ^a p=0.02 |
| Número de ovocitos maduros | 12.8 ± 0.6 ^{ab} | 11.5 ± 0.4 | 10.7 ± 0.5 ^a | 10.2 ± 1.0 ^a | <0.001 | ^a p=0.031 ^b p=0.027 |
| Número de embriones biopsiados | 5.9 ± 0.4 ^{ab} | 4.4 ± 0.2 | 3.3 ± 0.2 ^a | 3.0 ± 0.3 ^b | <0.001 | ^a p=0.016 ^b p=0.019 |
| Número de embriones euploides | 3.1 ± 0.2 ^{ab} | 2.3 ± 0.1 | 1.7 ± 0.1 ^a | 1.5 ± 0.2 ^b | <0.001 | ^a p=0.012 ^b p=0.014 |
| Grosor del endometrio (mm) | 8.9 ± 0.2 ^a | 8.2 ± 0.5 ^b | 7.1 ± 0.1 ^{ab} | 7.5 ± 0.4 | 0.04 | ^a p=0.049 ^b p=0.038 |
| Tasa implantación (%) | 63.9% ^{a,b} | 61.8% ^c | 49.4% ^{b,c} | 49.1% ^{a,c} | <0.001 | ^a p<0.001 ^b p<0.001 ^c p<0.001 |
| Tasa gestación (%) | 64.0% ^{a,b} | 62.2% ^c | 50.2% ^{b,c} | 49.4% ^{a,c} | <0.001 | ^a p<0.001 ^b p<0.001 ^c p<0.001 |
| Tasa aborto (%) | 11.3% | 12.8% | 11.8% | 12.5% | 0.833 | N/A |
| Tasa recién nacido vivo (%) | 50.2% ^{a,b} | 47.5% ^c | 37.0% ^{b,c} | 34.4% ^{a,c} | <0.001 | ^a p<0.001 ^b p<0.001 ^c p<0.001 |

Tabla 8. Tasas clínicas según la calidad embrionaria.

Sin embargo, la tasa de implantación y la tasa de recién nacido vivo fueron más altas cuando los embriones tenían mejor calidad.

Para determinar qué variable estaba más relacionada con el aborto, realizamos un análisis de regresión logística para investigar las variables que estaban más relacionadas con el aborto, tras la transferencia de un embrión euploide.

Descubrimos que el IMC, se asociaba significativamente (odds ratio [OD] 1.04; intervalo de confianza [IC] del 95 % 1.012–1.076 p = 0.006) con la tasa de aborto (Tabla 9).

| Variable | OR (CI95%) | P-valor |
|---|----------------------------|--------------|
| Edad mujer (años) | 0.988 (0.962-1.015) | 0.98 |
| Edad hombre (años) | 1.006 (0.988-1.024) | 0.54 |
| IMC (kg/m²) | 1.044 (1.012-1.076) | 0.006 |
| Duración de la infertilidad (años) | 0.993 (0.944-1.044) | 0.78 |
| Etiología femenina | 1.021 (0.971-1.073) | 0.41 |
| Etiología masculina | 1.059 (0.981-1.144) | 0.14 |
| Abortos previos | 1.008 (-0.988-1.033) | 0.32 |
| Calidad en Día 5 | 0.983 (0.859-1.126) | 0.80 |
| Día de la biopsia (día 5/6) | 0.986 (0.776-1.254) | 0.90 |
| Tipo de ciclo (sustituido o natural) | 0.772 (0.593-0.995) | 0.04 |
| Grosor endometrial (mm) | 0.653 (0.528-0.778) | 0.04 |

Tabla 9. Variables incluidas en nuestro modelo de regresión comparando variables de laboratorio y clínicas versus aborto.

Dividimos el IMC (kilogramos/metros²) en cuatro grupos según la Organización Mundial de la Salud: bajo peso (< 18.5; n = 69), normopeso (18.5–24.9; n = 1011), sobrepeso (25–29.9; n = 276), y obesos (≥ 30 ; n = 120). La tasa de aborto espontáneo, como muestra el análisis de regresión logística, fue significativamente mayor en mujeres con obesidad en comparación con las mujeres con peso normal, como se

muestra en la tabla 3 y la figura 1: peso inferior al normal (< 18.5; 13.4 %), peso normal (18.5-24.9; 12.1 %), sobrepeso (25-29.9; 14.5 %) y obesos (≥ 30 ; 19.2%).

| | IMC<18.5 (n=69) | IMC 18.5-24.9 (n=1011) | IMC 25.0-29.9 (n=276) | IMC ≥ 30 (n=120) | P-valor | |
|--------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|--|
| Edad mujer (años) | 37.6 \pm 1.0 | 38.2 \pm 0.2 | 38.2 \pm 0.3 | 37.8 \pm 0.7 | 0.36 | N/S |
| Edad hombre(años) | 41.1 \pm 0.6 | 39.9 \pm 0.4 | 40.4 \pm 0.8 | 39.2 \pm 1.1 | 0.10 | N/S |
| Duración infertilidad (años) | 0.6 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.4 | 0.34 | N/S |
| Abortos previos | 0.6 \pm 0.4 | 0.8 \pm 0.1 | 0.67 \pm 0.3 | 1.1 \pm 0.5 | 0.27 | N/S |
| Número de ovocitos | 12.6 \pm 2.1 | 12.7 \pm 0.6 | 12.8 \pm 1.0 | 13.8 \pm 1.5 | 0.37 | N/S |
| Ovocitos maduros | 11.1 \pm 0.6 | 11.5 \pm 0.4 | 11.5 \pm 0.8 | 11.6 \pm 1.0 | 0.93 | N/S |
| Embriones biopsiados | 4.3 \pm 0.8 | 4.5 \pm 0.2 | 4.5 \pm 0.4 | 4.1 \pm 0.5 | 0.51 | N/S |
| Embriones normales | 2.4 \pm 0.6 | 2.4 \pm 0.2 | 2.3 \pm 0.1 | 2.3 \pm 0.2 | 0.72 | N/S |
| Grosor endometrial (mm) | 8.8 \pm 0.4 | 9.0 \pm 0.2 | 9.1 \pm 0.3 | 9.1 \pm 0.3 | 0.74 | N/S |
| Tasa de implantación (%) | 70.4% ^{a,b,c} | 57% ^a | 56% ^b | 56.7% ^c | 0.04 | ^a p=0.004 ^b p<0.001 ^c p<0.004 |
| Tasa de gestación (%) | 70.4% ^{a,b,c} | 57% ^a | 56% ^b | 56.7% ^c | <0.001 | ^a p<0.001 ^b p<0.001 ^c p<0.004 |
| Tasa de aborto (%) | 13.4% ^a | 12.1% ^b | 14.5% ^c | 19.2% ^{a,b,c} | 0.01 | ^a p<0.001 ^b p<0.001 ^c p=0.026 |
| Tasa de recién nacido vivo (%) | 55.1% ^{a,b,c} | 44.4% ^a | 40.5% ^b | 37.5% ^c | <0.001 | ^a p<0.001 ^b p<0.001 ^c p<0.001 |

Tabla 10. Tasas clínicas según el índice de masa corporal. a, b, c y d indican la significación estadística (p < 0.05) entre los grupos en el análisis ANOVA post-hoc.

También encontramos que la tasa de gestación y de recién nacido vivo era menor en el grupo de mayor índice de masa corporal.

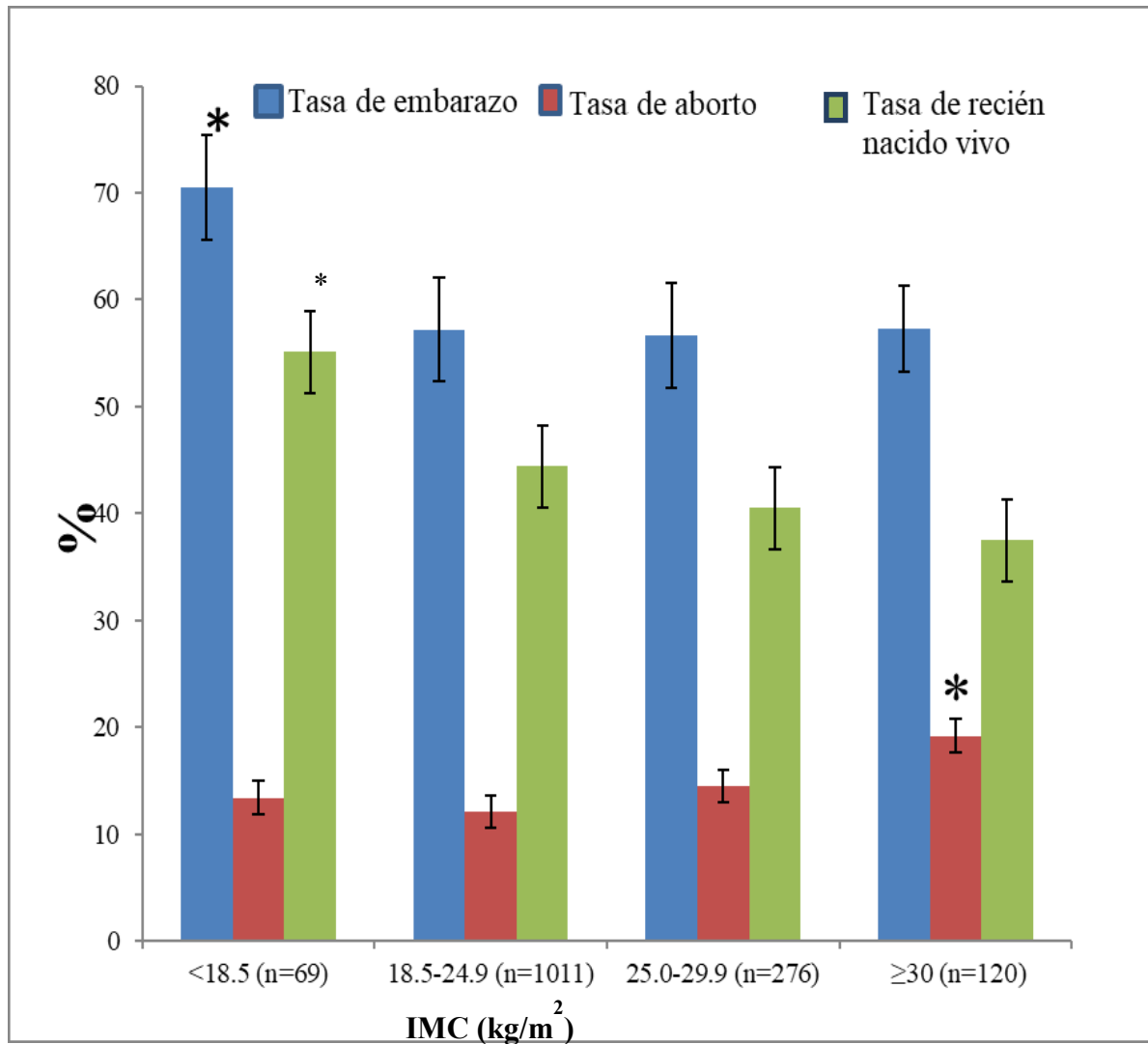


Figura 19. Tasas clínicas en los cuatro grupos de IMC. La tasa de embarazo y de recién nacido vivo fue estadísticamente significativo entre los grupos (*). La tasa de aborto fue también estadísticamente significativa en el grupo con alto IMC comparado con los otros tres grupos ().**

Cuando se analizó el tipo de preparación endometrial ciclo natural frente a ciclo sustituido, encontramos de nuevo diferencias en la tasa de aborto espontáneo (9.1% vs 13.1% respectivamente, $p = 0.03$ (Tabla 11).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de implantación (58.1 % frente a 59.1 %, $p = 0.81$), tasa de embarazo clínico (58.1 % frente a 59.1 %, $p = 0.12$) y la tasa de recién nacido vivo fue de 47.4 % frente a 45.2 %, $p = 0.36$).

| | Ciclos sustituidos (n=2222) | Ciclos naturales (n=608) | P-valor |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------|
| Grosor endometrial (mm) | 9.1 ± 0.2 | 9.2 ± 0.4 | 0.27 |
| Tasa de implantación (%) | 59.1 | 58.1 | 0.81 |
| Tasa de gestación (%) | 59.1 | 58.1 | 0.12 |
| Tasa de aborto (%) | 13.1 | 9.1 | 0.03 |
| Tasa de recién nacido vivo (%) | 45.2 | 47.4 | 0.36 |

Tabla 11. Tipos de preparación endometrial y tasas clínicas.

Adicionalmente, y considerando que solo incluimos pacientes con grosor endometrial \geq 7 mm, observamos una asociación débil pero significativa entre el grosor endometrial y la tasa de aborto (OD 0.65; 95%, 0.528–0.778 $p = 0.04$) y cuando se analizó el grosor endometrial por cuartiles, observamos mejores resultados clínicos con endometrios más gruesos (Tabla 12.)

| | Grosor endometrial <7.8 mm (n=686) | Grosor endometrial 7.8-8.8 mm (n=734) | Grosor endometrial 8.9-10.0mm (n=792) | Grosor endometrial 10.1-12 mm (n=488) | Grosor endometrial >12mm (n=132) | P-valor |
|--------------------------------|---------------------------------------|--|--|--|-------------------------------------|---|
| Grosor endometrial (mm) | 7.1 \pm 0.1 | 8.2 \pm 0.1 | 9.6 \pm 0.2 | 11.1 \pm 0.3 | 13.1 \pm 0.4 | 0.110 |
| Tasa de implantación (%) | 57.0% ^a | 57.4% ^a | 63.7% ^{a,b} | 62.5% ^{a,b} | 61.8% | ^a $p=0.03$ ^b $p<0.04$ |
| Tasa de gestación (%) | 57.0% ^a | 57.4% ^a | 63.7% ^{a,b} | 62.5% ^{a,b} | 61.8% | ^a $p=0.03$ ^b $p<0.03$ |
| Tasa de aborto (%) | 11.2% ^a | 9.2% | 10.6% ^b | 10.1% ^c | 7% ^{a,b,c} | ^a $p=0.03$ ^b $p=0.04$ ^c $p=0.04$ |
| Tasa de recién nacido vivo (%) | 40.4% ^a | 40.3% ^b | 45.1% ^{a,b} | 46.9% ^{a,b} | 48.1% ^{a,b} | ^a $p=0.04$ ^b $p=0.03$ ^c $p=0.02$ |

Tabla 12. Tasas clínicas según el grosor endometrial.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El cribado genético de miles de embriones humanos en las últimas dos décadas ha establecido claramente que la incidencia de anomalías cromosómicas numéricas es alta después de la estimulación ovárica y la FIV, superando en general el 50% de los embriones biopsiados (163-165). La mayoría de las aneuploidías son de origen meiótico y mayoritariamente relacionadas con la edad materna (149) (Figura 20). Otras anomalías cromosómicas se producen después de la activación, durante la reanudación de la meiosis II y las mitosis posteriores, lo que da lugar a anomalías complejas, poliploidía y mosaicismo en los embriones resultantes (166-168). Las tasas de anomalías posmeióticas son constantes en todos los grupos de edad (~35 % en embriones del día 3), mientras que las tasas de aneuploidía meiótica aumentan con el avance de la edad materna, del 29 % en mujeres <35 años de edad al 47 % en mujeres de 40 años o más (150).

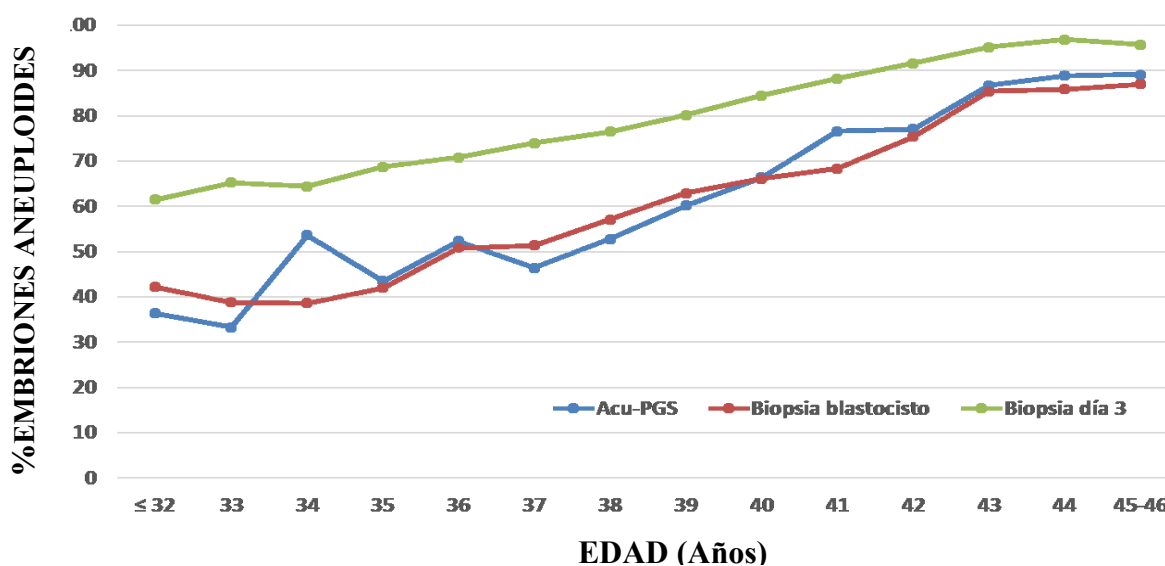


Figura 20. Porcentaje de embriones aneuploides, que va aumentando en función de la edad. Datos de IVI Madrid (2011-2016)

Acu PGS: acumulación de embriones biopsiados con screening de aneuploidías

Los datos clínicos sugieren que, además de la edad materna, varios factores relacionados con el tratamiento pueden afectar la incidencia del desequilibrio cromosómico en los embriones. Estos factores incluyen las condiciones de cultivo, la

manipulación de los gametos, la alta tensión de oxígeno durante el cultivo y la inmadurez o posmadurez de los ovocitos en el momento de la fecundación (169-174) (9-14). Otros estudios han encontrado diferencias significativas en las anomalías cromosómicas según el tipo de medicación (175-176) o la dosis para la estimulación ovárica (177-178).

5.1 DE LOS FACTORES EXTRÍNSECOS

La cuestión de si algunas anomalías detectadas en embriones humanos tempranos están relacionadas con la manipulación de los embriones y con los ciclos de FIV merece ser investigada.

En consecuencia, iniciamos un análisis retrospectivo de los distintos factores extrínsecos de laboratorio que creíamos podían estar relacionados con cambios en la dotación cromosómica de los embriones.

Los embriones humanos han sido cultivados tradicionalmente a concentraciones de oxígeno atmosféricas (20% aprox.), sin embargo, la concentración de oxígeno dentro del útero y las trompas de mamíferos normalmente fluctúa entre 2-8% (108).

Se han realizado numerosos estudios en diferentes especies animales, observándose efectos negativos sobre la tasa de formación y el número de células que formaban los blastocistos cultivados a concentraciones atmosféricas de oxígeno (179-180). Un estudio realizado sobre embriones de ratón, describe como los efectos negativos de las concentraciones de oxígeno atmosférico ocurren ya desde el primer ciclo de división celular siendo el mayor impacto sobre los estadios de precompactación (181).

Por todo ello, se llevó a cabo un estudio piloto para valorar el efecto de las concentraciones de oxígeno en diferentes incubadores, con concentraciones de oxígeno atmosférico y con concentraciones bajas de oxígeno alrededor del 5%. Se realizó un estudio retrospectivo sobre 301 ciclos de cultivo secuencial. Se cultivaron 2807 cigotos que fueron distribuidos en cuatro incubadores. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) tanto en tasa de formación de blastocistos totales y viables como en tasa de blastocistos de buena calidad en D5 a favor del cultivo en bajas concentraciones de oxígeno (182).

Después se realizó el análisis que forma parte de este estudio y en el que se compararon incubadores con concentraciones de oxígeno atmosférico (~20%), con incubadores con baja concentración de oxígeno (~5%) en los ciclos de PGT-A (183). Obtuvimos unos resultados en consonancia con la mayoría de los trabajos realizados sobre este tema, con mejores tasas de formación de blastocisto (184-187). Se cree que una de las causas de las mejores tasas en el cultivo con baja concentración de oxígeno es debido a que a bajas concentraciones se generan menos especies reactivas de oxígeno que son citotóxicas y en un cultivo embrionario prolongado podría deteriorar la viabilidad del blastocisto (188).

El efecto que la criopreservación podría causar en el huso meiótico ha sido uno de los puntos que más ha preocupado a los investigadores. Conocemos que la integridad del huso meiótico y de la placa metafásica es fundamental para que se produzca una correcta segregación de los cromosomas durante anafase. Los microtúbulos del huso son muy sensibles a los cambios de temperatura (173,189) por lo que la vitrificación, que es una técnica que los somete un cambio brusco de temperatura, podría producir alteraciones en la segregación cromosómica y que se vea reflejada en el desarrollo embrionario. Los datos obtenidos en este estudio muestran que no hemos encontrado ningún efecto de la vitrificación en la tasa de embriones normales, por lo que creemos que la vitrificación de ovocitos no afecta a la segregación cromosómica y no aumenta la tasa de embriones con aneuploidías.

Encontramos diferencias en la tasa de transferencia, que es superior en el caso de los ovocitos vitrificados. Esto puede deberse a que los ovocitos vitrificados se acumulan para obtener un mayor número con el que poder trabajar y en consecuencia mayor probabilidad de encontrar embriones normales cromosómicamente. También puede deberse a que los ovocitos vitrificados con una calidad comprometida, no sobreviven a la desvitrificación, seleccionándose así los que son óptimos para llegar a desarrollarse.

Por otro lado, conocemos que una alta respuesta a la estimulación ovárica provoca la obtención de un número elevado de ovocitos que provienen de folículos en diferentes grados de madurez. Aunque se pueden tener ovocitos con madurez nuclear de folículos de diámetros pequeños, la hipótesis de que el aumento de la tasa de aneuploidías en pacientes altas respondedoras, se deba a una inmadurez citoplasmática, nos hace suponer que dichos ovocitos maduros estarían más inclinados a dar ovocitos con defectos en la formación del huso meiótico y de la placa meiótica y, por tanto, dar lugar

a embriones cromosómicamente anormales. Pero lo que hemos encontrado en nuestro estudio, es que independientemente de la dosis y la respuesta, el número final de embriones cromosómicamente normales disponibles para transferencia, es similar con distintas estrategias de estimulación y con dosis crecientes de gonadotropinas, como ya fue observado por Bart et al. (177).

Desde el inicio de la EOC se ha cuestionado su efecto adverso, tanto por el riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), como por los efectos negativos que puede tener un estradiol elevado (E2), tanto a nivel endometrial como en la calidad ovocitaria y embrionaria (190,191). Se ha visto que la especie humana tiene una cantidad alta de aneuploidías de forma natural, sin que se haya realizado una EOC. Existen abortos espontáneos en embarazos naturales y también fallos de implantación de los que no tenemos conocimiento. Por lo que se cree que el alto porcentaje de embriones aneuploides en los ciclos de FIV, puede que esté relacionado con unas tasas de implantación que no avanzan al ritmo que clínicos y pacientes desearían y no tanto a la dosis de gonadotropinas suministrada. De hecho, es algo característico de la especie humana, estas altas tasas de aneuploidías, ya que en otras especies como en el ratón apenas existen aneuploidías (148).

5.2 DE LOS FACTORES INTRÍNSECOS

Una vez que estudiamos todos los factores extrínsecos que creíamos podían tener efecto en la dotación cromosómica de los embriones, y siendo los resultados aplicados a la práctica clínica diaria, nos preguntamos por qué había pacientes que seguían sin conseguir una gestación a término después de transferirles un embrión de buena calidad y euploide. Por ello comenzamos nuestro proyecto de factores intrínsecos que podían estar influyendo en estas interrupciones de gestación.

La implantación de embriones es un paso crítico para que un ciclo de FIV tenga éxito. Como sabemos, la morfología del embrión tiene un fuerte valor predictivo para la implantación, pero está lejos de ser un sistema perfecto (192). La composición cromosómica del embrión después de una biopsia de blastocisto puede ser más útil para predecir el resultado del ciclo y aconsejar a nuestros pacientes. En nuestro estudio, después de transferencias de embriones euploides únicos, no observamos ninguna

correlación entre la morfología del embrión y el aborto espontáneo. Obviamente, para que un blastocisto pueda ser biopsiado debe tener un nivel mínimo de calidad (embriones viables con un grado de expansión necesario para diferenciar sus estructuras en términos de MCI y TE. La calidad de la MCI debe ser al menos B, pero dentro de este grupo, desde embriones con suficiente calidad para someterse a una biopsia hasta embriones de excelente calidad, la tasa de aborto espontáneo fue comparable. Nuestros resultados están en línea con otros estudios anteriores (162, 193). Aunque otros grupos encontraron una relación entre la calidad del embrión y las tasas de aborto espontáneo (194,195), es interesante notar que estos embriones no se sometieron a una biopsia embrionaria, lo que puede explicar sus hallazgos. Puede estar relacionado con la calidad de los blastocistos y concretamente de la diferenciación de sus células en masa interna y trofoectodermo. Mientras que algunos autores consideran que la MCI es el mejor predictor de un embarazo exitoso (196,197), otros consideran que el trofoectodermo es el mejor indicador (194). En nuestras pacientes, transferimos el embrión con la mejor morfología, pero solo después de confirmar la euploidia.

Una vez transferido un blastocisto euploide morfológicamente bueno, analizamos el impacto de las diferentes variables clínicas. Descubrimos que las mujeres con un IMC más alto experimentaron una tasa de aborto espontáneo más alta que las mujeres con un IMC normal. Estudios anteriores han demostrado que las mujeres con un IMC alto tienen tasas de embarazo más bajas y tasas de aborto espontáneo más altas (198-201). Se planteó la hipótesis de que estas mujeres podrían tener una mayor cantidad de embriones aneuploides, lo que resultaría en una mayor tasa de aborto espontáneo. Sin embargo, nuestro estudio muestra que incluso después de una transferencia de embriones euploides, las tasas de aborto espontáneo siguen siendo más altas. Tremellen et al (138) sugirieron por primera vez una causa no cromosómica para el aborto espontáneo relacionado con la obesidad en una pequeña serie de pacientes. De hecho, la probabilidad de tener embriones aneuploides no cambia con el aumento del IMC (139). En un esfuerzo por mejorar el resultado reproductivo en mujeres con un IMC más alto, se estudiaron modificaciones en el estilo de vida dirigidas a una vida/dieta más saludable y con el objetivo de reducir su peso. Desafortunadamente, no parecieron afectar el pronóstico de la FIV (202,203). Recientemente, las mujeres sometidas a FIV después de una cirugía bariátrica mostraron tasas de éxito comparables en relación con mujeres no operadas con IMC similares (204). El mecanismo que causa esta mayor tasa

de aborto espontáneo aún no está completamente dilucidado, se ha visto que en las pacientes con ICM alto existen alteraciones en la receptividad endometrial que pueden llevar a menores tasas de implantación y mayor aborto y que el ambiente uterino está claramente alterado a lo largo del embarazo, lo que puede llevar consigo cambios maternos y fetales (205-209). La obesidad también se asocia a una inflamación crónica, por lo que el sistema inmunológico podría estar involucrado en el mayor número de complicaciones obstétricas que presentan estas pacientes y que pueden terminar en una pérdida prematura del embarazo.

La preparación endometrial adecuada es crucial para la implantación exitosa del embrión. Los ciclos naturales, midiendo la LH, y los ciclos naturales modificados, administrando hCG, son alternativas sencillas y fáciles de usar para que las pacientes que ovulan se preparen para la transferencia de embriones, pero requieren ciclos regulares. Un ciclo sustituido utilizando estrógenos y progesterona, se puede aplicar con cualquier paciente y permite un mejor control de la transferencia de embriones tanto para la paciente como para el equipo, pero debe mantenerse hasta la semana 10-12 de embarazo. Cuando analizamos nuestros datos, no encontramos diferencias en las tasas de implantación, embarazo y nacidos vivos entre los ciclos naturales y sustituidos; sin embargo, observamos una mayor tasa de aborto espontáneo en los ciclos sustituidos.

Estudios previos con transferencias de embriones congelados sin biopsia han mostrado resultados similares (210). Recientemente, parece que los ciclos sustituidos pueden aumentar los riesgos obstétricos y neonatales (211). Los datos retrospectivos sugieren que la preeclampsia también puede ser ligeramente mayor en los ciclos sustituidos en comparación con los ciclos naturales (212). Sin embargo, aún debe establecerse la estrategia de seguimiento óptima para el reemplazo de embriones congelados, ya que depende de la regularidad del ciclo menstrual de la paciente, la necesidad de controlar el momento y los riesgos reproductivos que se validarán prospectivamente.

Otra variable clínica a controlar antes de planificar una transferencia embrionaria es el grosor del endometrio. El grosor endometrial adecuado es crucial para una placentación eficiente y la invasión del trofoblasto. La placentación defectuosa aumenta el riesgo de complicaciones obstétricas como retardo del crecimiento fetal, bajo peso al nacer e hipertensión inducida por el embarazo (213). Aunque se pueden lograr embarazos continuos incluso con un revestimiento endometrial muy delgado (214), y aunque no

todos los autores están de acuerdo (215-218), está bien establecido que las tasas de nacidos vivos son más bajas cuando el grosor del endometrio es inferior a 7 mm (219). En nuestros resultados no observamos diferencias en las tasas de implantación o embarazo. En cambio, las tasas de aborto espontáneo aumentaron cuando los embriones se transfirieron a mujeres cuyo grosor endometrial no alcanzaba los 7 mm, lo que contribuyó significativamente a la pérdida del embarazo.

Si bien estudiamos una gran cohorte de pacientes con criterios de inclusión estrictos, principalmente transferencias de blastocistos euploides únicos, nuestra investigación tiene algunas limitaciones. En primer lugar, debido a su carácter retrospectivo, el estudio agrupa datos de diferentes centros. Aunque todos los laboratorios de FIV comparten los mismos protocolos y procedimientos, pueden existir pequeñas diferencias metodológicas, pero podrían ser irrelevantes teniendo en cuenta el tamaño de la muestra. En segundo lugar, no podíamos descartar todas las variables hipotéticas que contribuyen al aborto espontáneo: alteraciones metabólicas, discrepancias en la hipotética compatibilidad inmunológica como el sistema de KIR-HLA u otros factores causales aún desconocidos o en investigación que pueden facilitar el aborto espontáneo. Sin embargo, lo más probable es que estos representen una pequeña fracción no significativa en la muestra total.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Bajando la concentración de oxígeno en el incubador del 20% al 5%, conseguimos mejoras en el cultivo y una mayor tasa de blastocisto.
2. La vitrificación no afecta a la tasa de aneuploidía embrionaria.
3. La manipulación de los gametos y de los embriones por parte de los profesionales del laboratorio no afecta a la tasa de aneuploidía embrionaria.
4. La estimulación ovárica controlada no aumenta la tasa de aneuploidía y tampoco provoca aumento de mosaicismo en los embriones.
5. El IMC está fuertemente asociado a la tasa de aborto.
6. La calidad embrionaria influye en las tasas de implantación y gestación, pero no en la tasa de aborto.
7. El grosor endometrial está asociado a la tasa de aborto.
8. La preparación endometrial natural tiene unas menores tasas de aborto que los ciclos sustituidos.
9. Encontramos que el IMC, el grosor del endometrio y la preparación del endometrio deben considerarse antes de la transferencia de embriones para optimizar las tasas de éxito y minimizar el riesgo de aborto espontáneo

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Spallanzani L. Dissertations relative to the natural history of animals and vegetables. Trans. by T. Beddoes in Dissertations Relative to the Natural History of Animals and Vegetables. J Murray. 1784;2:195-199.
2. Hanson FM and Rock J. Artificial insemination with husband's sperm. Fertil Steril 1951; 2:162-174.
3. Sims JM. Clinical notes on uterine surgery with special reference to the management of the sterile condition. R. Hardwicke. 1866.
4. Sims JM. The microscope as an aid in the diagnosis and treatment of sterility. Br Med J. 1868;2:465.
5. Hard AD. Artificial impregnation. Med World 1909; 27:163.
6. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. Proc R Soc 1891;48:457.
7. Ascheim S and Zondek B. Insulated prolan B from the uterine of pregnant women. They managed to stimulate and induce ovulation using gonadotrophins. Klin Wschr 1928;7:8-9.
8. Macomber D and Sanders MB. The spermatozoa count: Its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. N Engl J Med 1929;200:981.
9. Chen SH and Wallach EE. Five decades of progress in management of the infertile couple. Fertil Steril 1994;62:665-685.
10. Rubin IC. Non-operative determination of the patency of Fallopian tubes in sterility. JAMA 1920;74:1017.
11. Rock J and Hertig AT. Information regarding the time of human ovulation derived from a study of 3 unfertilized and 11 fertilized ova. Am J Obstet Gynecol 1944;47:343-356.
12. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. Reproduction 2002;124:181-196.

13. Willett EL, Black WG, Casida LE, et al. Successful transplantation of a fertilised bovine ovum. *Science* 1951;113:247.
14. Austin CR. Observations of the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951;134,581.
15. Chang MC. Fertilization capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature* 1951;168:697.
16. Chang MC. Fertility and sterility as revealed in the study of fertilization and development of rabbit eggs. *Fertil Steril* 1951; 2:205-222.
17. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen spermatozoa. *Nature* 1953; 172: 767.
18. Gemzell CA, Diczfalusy E and Tillinger KG. Clinical effect of human pituitary follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1958;18:1333.
19. Greenblatt RB, Barfield WE, Jungck ED and Ray AW. Induction of ovulation with MRL/41: preliminary report. *J Am Med Assoc* 1961;178:101-104.
20. Edwards RG, Donahue RP, Baramaki TA and Jones HW. Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1966;1:1163
21. Wu CH. Monitoring of ovulation induction. *Fertil Steril* 1978;30:617-630.
22. Yanagimachi R, Chang MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* 1963; 200:281-282.
23. Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976;15:467-470
24. Steptoe RC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:336.
25. Buster JE, Bustillo M, Thorneycroft IH, et al. Nonsurgical transfer of in vivo fertilised donated ova to five infertile women: report of two pregnancies. *Lancet* 1983; 2: 223.

26. Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C and Renou C. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature* 1984; 307:174-175.
27. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707.
28. Asch RH, Balmaceda JP, Ellsworth LR and Wong PC. Preliminary experiences with gamete intrafallopian transfer (GIFT). *Fertil Steril* 1986;45:366-371
29. Devroey P, Braeckmans P, Smitz J, Waesberghe LV, Wisanto A, Van Steirteghem A. Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet* 1986;1:1329.
30. Russell JB, DeCherney AH and Hobbins JC. A new transvaginal probe and biopsy guide for oocyte retrieval. *Fertil Steril* 1987; 47:350-352.
31. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884-886.
32. Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, et al. Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* 1988;2:790.
33. Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of human oocytes: A nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989; 51:139.
34. Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992;1:826.
35. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70.
36. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RML and Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnosis testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992;327:905-908.

37. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, et al. ESHRE PGD Consortium "Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)". *Hum Reprod* 2005; 20: 35-48.
38. Lissens W, Sermon K. Preimplantation genetic diagnosis: current status and new developments. *Hum. Reprod.* 1997;12:1756-1761.
39. Lavery SA, Aurell R, Turner C, Taylor DM, Winston RM. An analysis of the demand for cost of preimplantation genetic diagnosis in the United Kingdom. *Prenat Diagn* 1999;19:1205-8.
40. Heinrich U, Rost I, Brown A, Gordon T, Haan N, Massie J. Array comparative genomic hybridisation in clinical diagnostics: principles and applications. *J Lab Med*;33:255-66.
41. Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, et al. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Mol Cytogenet* 2008;1:15.
42. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* 2012;57:621-32.
43. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of Mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013;369:1502-1510.
44. Need AC, Shashi V, Hitomi Y. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 2012;49:353-361.
45. Koning TJ, Jongbloed JD, Sikkema-Raddatz B, Sinke RJ. Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn.*, 2015;15:61-70.
46. Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Weedl C, Dufke C, Bauer M, Kehrer. Next generation sequencing in X-linked intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 2015;4.
47. Shin HY, Jang H, Han JH, Park HJ, Lee JH, Kim SW. Targeted next-generation sequencing for the genetic diagnosis of dysferlinopathy. *Neuromuscul Disord* 2015.

48. Liu S, Wang H, Zhang L, Tang C, Jones L, Ye H. Rapid detection of genetic mutations in individual breast cancer patients by next-generation DNA sequencing *Hum Genomics* 2015;1:2-10.
49. Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walte JGr, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:22-30.
50. Mills JD, Janitz M. Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases *Neurobiol Aging* 2012;33:1012.e11-e24.
51. Takahashi JS, V. Kumar, P. Nakashe, N. Koike, H.C. Huang, C.B. Green, et al. ChIP-seq and RNA-seq methods to study circadian control of transcription in mammals *Methods Enzymol.* 2015;551:285-321.
52. Masser DR, Stanford DR, Freeman WM. D.N.A. Targeted. Methylation analysis by next-generation sequencing *J Vis Exp* 2015;24:96-107.
53. Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, Vilorio T, De los Santos MJ, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn.* 2007;27:748-56.
54. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril.* 1997;68:1128-31.
55. Magli MC, Gianaroli L, Munné S, Ferraretti AP. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15:297-301.
56. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril.* 1999; 72:837-44.
57. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simón C, Pellicer A. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online.* 2003;6:232-7.

58. Wilding M, Forman R, Hogewind G, Di Matteo L, Zullo F, Cappiello F, Dale B. Preimplantation genetic diagnosis for the treatment of failed in vitro fertilization-embryo transfer and habitual abortion. *Fertil Steril.* 2004;81:1302-7.
59. Verlinsky Y, Cohen J, Munné S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, Kuliev A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* 2004; 82:302-3.
60. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril.* 2008;8.
61. Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, Reisner E, Borg K, Wikland M, Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2008;23:2806-12.
62. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med.* 2007;357:9-17.
63. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004;19:2849-58.
64. Hook EB, Hamerton JL. Analyses of data on rates of cytogenetic disorders in live births. *Am J Hum Genet.* 1978;30:330-1.
65. Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod.* 1999;14:2097-101.
66. Ménézou YJ, Bellec V, Zaroukian A, Benkhalifa M. Embryo selection by IVF, co-culture and transfer at the blastocyst stage in case of translocation. *Hum Reprod.* 1997; 12:2802-3.

67. Evsikov S, Cieslak J, Verlinsky Y. Effect of chromosomal translocations on the development of preimplantation human embryos in vitro. *Fertil Steril.* 2000;74:672-7.
68. McKusick VA. *Mendelian Inheritance in Man.* 11th Ed., 1994. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
69. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990; 344: 768-770.
70. Millar JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinkas JG, Sykes A. Fetal loss alters implantation. A prospective study. *Lancet.* 1980;2:554-556.
71. Osagawa M, Auki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* 2000;73:300-304.
72. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy, *Nat Rev Genet.* 2001;2:280-291.
73. Bugge M. et al. Non-disjunction of chromosome 18. *Hum. Mol. Genet.* 1998;7:661-669.
74. Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, & Sherman S. Recombination and maternal agedependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am. J. Hum. Genet.* 1995;57:867-874.
75. Lamb NE et al. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6:1391-1399.
76. Lamb N.E. et al. Susceptible chiasmata configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nature Genet.* 1996;14:400-405.
77. Robinson W. P. et al. Nondisjunction of chromosome 15: origin and recombination. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;53:740-751.
78. MacDonald M. et al. The origin of 47,XXY and 47,XXX aneuploidy: heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum. Mol. Genet.* 1994;3:1365-1371.

79. Zaragoza M. V. et al. Nondisjunction of human acrocentric chromosomes: studies of 432 trisomic fetuses and liveborns. *Hum. Genet.* 1994;94:411–417.
80. Zaragoza M. V, Millie E, Redline RW, Hassold T. J. Studies of non-disjunction in trisomies 2, 7, 15, and 22: does the parental origin of trisomy influence placental morphology? *J. Med. Genet.* 1998;35: 924–931.
81. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 53:159-65.
82. Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, Escudero T, Oter M, Schoolcraft B, Simpson JL, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 2005;84:331-5.
83. Pirtea P, de Ziegler D, Ayoubi JM. Recurrent Implantation Failure-Is It the Egg or the Chicken?. *Life Basel.* 2021;12:39.
84. Pirtea P, Scott RT Jr, de Ziegler D, Ayoubi JM. Recurrent implantation failure: how common is it? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2021 Jun 1;33:207-212.
85. Spandorfer SD, Davis OK, Barmat LI, Chung PH, Rosenwaks Z. Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 2004; 81, 1265-1269.
86. Munné S, Bahçe M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M, Cohen J. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online.* 2004;8:81-90.
87. Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2000; 1:17-26.
88. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2001;16:1954-8.

89. Munné S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J; Referring Centers PGD Group. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril*. 2006;85:326-32.
90. Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril*. 2007;88:53-61.
91. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:91-7.
92. Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod*. 1998;13:3406-13.
93. Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL. Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod*. 2000;15:2165-72.
94. Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1999;14:1266-73.
95. Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, D'Agata R. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod*. 2001;16:1172-9.
96. Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2001;6:2084-92.
97. Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril*. 1995;64:811-7.

98. Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L. Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet.* 1998;102:129-37.
99. McInnes B, Rademaker A, Martin R. Donor age and the frequency of disomy for chromosomes 1, 13, 21 and structural abnormalities in human spermatozoa using multicolour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1998;13:2489-94.
100. Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Siméon N, Joly G, Macé B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet.* 1999;105:266-72.
101. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod.* 2000;15:351-65.
102. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Hum Reprod.* 2001;16:703-8.
103. Martin RH, Greene C, Rademaker AW. Sperm chromosome aneuploidy analysis in a man with globozoospermia. *Fertil Steril.* 2003;79:1662-4.
104. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP. The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 22:13-8.
105. Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munné S. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril.* 2003; 79:30-8.
106. Burrello N, Vicari E, Calogero AE. Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111:363-5.
107. Garder DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996;65:349-53

108. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J.Reprod Fertil* 1993;99:673–9
- 109.De los Santos MJ, Gámiz P, Albert C, Galán A, Vilorio T, Pérez S, Romero JL, Remohí J. Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles. *Fertil Steril*. 2013;100:402-7.
110. Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;11
- 111.Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril*. 2013;99:738-744.
- 112.Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986;3:284–95.
- 113.Scott L.The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:237–49.
- 114.Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;12:532–41.7.
- 115.Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherina WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil steril* 2006;86:1608-15.
- 116.Basile N, Morbeck D, García-Velasco J, Bronet F, Mesenguer M. Type of cultura media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes.
- 117.Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, et al. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2007;22:980-988.

118. Rubio C, Mercader A, Alamá P, Lizán C, Rodrigo L, Labarta E, Melo MA, Pellicer A, Remohí J: Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulations protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod* 2007;22:980-8.
119. Tarín JJ, Pellicer A.: Consequences of high ovarian response to gonadotropins: a cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Fertil Steril*. 1990;54: 665-70.
120. Reis Soares S, Rubio C, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A.: High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles. *Fertil Steril*. 2003;80:656-7.
121. Munné S, Ary J, Zouves C, Escudero T, Barnes F, Cinioglu C, Ary B, Cohen J.: Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:340-6.
122. Chen CK, Wang CW, Tsai WJ, Hsieh LL, Wang HS, Soong YK. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy. *Fertil Steril*. 2004;82:666-72.
123. Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod*. 2004;19:655-9.
124. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, Krivokharchenko A, Kreienberg R, Woriedh M, Bader M, Weiss JM. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction*. 2009;138:319-27.
125. Chamayou S1, Bonaventura G, Alecci C, Tibullo D, Di Raimondo F, Guglielmino A, Barcellona ML. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology*. 2011;62:130-4.
126. Di Pietro C, Vento M, Guglielmino MR, Borzi P, Santonocito M, Ragusa M, Barbagallo D, Duro LR, Majorana A, De Palma A, Garofalo MR, Minutolo E, Scollo P, Purrello M. Molecular profiling of human oocytes after vitrification strongly suggests that they are biologically comparable with freshly isolated gametes. *Fertil Steril*. 2010; 94:2804-7.

127. Munné S, Alikani M, Ribustello L, Colls P, Martínez-Ortiz PA, McCulloh DH; Referring Physician Group. Euploidy rates in donor egg cycles significantly differ between fertility centers. *Hum Reprod*. 2017;32:743-749.
128. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet 2020. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets>.
129. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction* 2017;153:97–108.
130. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000 (WHO Technical Report Series, No. 894).
131. Bellver J, Pellicer A, Garcia-Velasco JA, Ballesteros A, Remohi J, Meseguer M. Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. *Fertil Steril* 2013;100:1050–8.
132. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sorensen TI, Olsen J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod* 2007;22:1634–7.
133. Sundaram R, Mumford SL, Buck Louis GM. Couples' body composition and time-to-pregnancy. *Hum Reprod* 2017;32:662–8.
134. Glenn T, Harris AL, Lindheim SR. Impact of obesity on male and female reproductive outcomes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2019;31:201–6.
135. Bellver J, Martinez-Conejero JA, Labarta E, Alama P, Melo MA, Remohi J, et al. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:2335-2341, 2341.e1-8.
136. Cozzolino M, García-Velasco JA, Meseguer M, Pellicer A, Bellver J. Female obesity increases the risk of miscarriage of euploid embryos. *Fertil Steril* 2021;115:1495-1502
137. Ginsburg ES, George JS. Weighing in: the impact of obesity on euploid miscarriage rates. *Fertil Steril*. 2021;115:1433-1434.

138. Tremellen K, Pearce K, Zander-Fox D. Increased miscarriage of euploid pregnancies in obese women undergoing cryopreserved embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 2017;34:90-97
139. Goldman K.N, Hodes-Wertz B, McCulloh D.H, Flom J.D, Grifo J.A. Association of body mass index with embryonic aneuploidy. *Fertil Steril*. 2015;103:744-748
140. Hughes LM, McQueen DB, Jungheim ES, Merrion K, Boots CE. Maternal body mass index is not associated with increased rates of maternal embryonic aneuploidy. *Fertil Steril*. 2022;117:783-789
141. Mecacci F, Avagliano L, Lisi F, Clemenza S, Serena C, Vannuccini S, Rambaldi MP, Simeone S, Ottanelli S, Petraglia F. Fetal Growth Restriction: Does an Integrated Maternal Hemodynamic-Placental Model Fit Better? *Reprod Sci* ;2020. Available from <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00393-2>.
142. Cruz F, Bellver J. Live birth after embryo transfer in an unresponsive thin endometrium. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30:481-484.
143. Wu Y, Gao X, Lu X, et al. Endometrial thickness affects the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in normal responders after GnRH antagonist administration. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:96-102.
144. Traub ML, Van Arsdale A, Pal L, et al. Endometrial thickness, Caucasian ethnicity, and age predict clinical pregnancy following fresh blastocyst embryo transfer: a retrospective cohort. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:33-40. 591
145. Al-Ghamdi A, Coskun S, Al-Hassan S, et al. The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;6:37-41.
146. Arce H, Velilla E, Lopez-Teijon M. Association between endometrial thickness in oocyte donation cycles and pregnancy success rates. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28:1288-598
147. Ribeiro VC, Santos-Ribeiro S, De Munck N, Drakopoulos P, Polyzos NP, Schutyser 601 V, Verheyen G, Tournaye H, Blockeel C. Should we continue to measure

endometrial thickness in modern-day medicine?. The effect on live birth rates and birth weight. *Reprod Biomed Online*. 2018;36:416-426

148. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*. 2014;101:656-663.

149. Hassold T, Jacobs PA, Kline J, Stein Z, Warburton D. Effect of maternal age on autosomal trisomies. *Ann Hum Genet* 1980;44:29–36.

150. Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007;14:628–634.

151. Sharma R, Agarwal A, Rohra VK, Assidi M, Abu-Elmagd M, Turki RF. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;19:13-35.

152. Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2010;16:65-79.

153. Mazur DJ, Lipshultz LI. Infertility in the Aging Male. *Curr Urol Rep*. 2018;17;19-54.

154. Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 2017;135:29-41.

155. de Kluiver H, Buizer-Voskamp JE, Dolan CV, Boomsma DI. Paternal age and psychiatric disorders: A review. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2017;174:202-213.

156. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*. 2007;15:16

157. Tsonis O, Balogun S, Adjei JO, Mogeckwu O, Iliodromiti S. Management of recurrent miscarriages: an overview of current evidence. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2021;33:370-377.
158. Magnus MC, Wilcox AJ, Morken NH, Weinberg CR, Håberg SE. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *BMJ.* 2019; 20:364
159. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 2005;20:1144-7.
160. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod.* 2009;24:1221–8. 155.18.
161. Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, Celebi C, Cimadomo D, Goossens V, Liss J, Nunes S, Sfontouris I, Vermeulen N, et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology Biopsy Working Group, et al 2020 ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Hum Reprod Open.* 2020;1–12.
162. Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Schoolcraft WB, Stevens J. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000;73:1155–8
163. Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382–391.
164. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol Cell Endocrinol* 2001;22:S29–S34.
165. Ata B, Kaplan B, Danzer H, Glassner M, Opsahl M, Tan SL, Munné S. Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related with the number of embryos generated. *Reprod Biomed Online* 2012;24:614–620.
166. Munné S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994;51:373–379.

167. Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online* 2006;12:234–253.
168. Magli MC, Gianaroli L, Ferrareti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosome complement. *Fertil Steril* 2007;87:534–541.
169. Badenas J, Santalo J, Calafell JM, Estop AM, Egozcue J. Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: a source of chromosome imbalance. *Gamete Res* 1989;24:205–218.
170. McKiernan SH, Bavister BD. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 1990;43:404–413.
171. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102–108.
172. Santaló J, Badenas J, Calafell JM, Català V, Munné S, Egozcue J, Estop AM. The genetic risk of in vitro fertilization techniques. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:462–474.
173. Almeida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995;3:357–365.
174. Munné S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, Tucker M, Cohen J, Gianaroli L. Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Human Reprod* 1997;12:780–784.
175. Weghofer A, Munné S, Brannath W, Chen S, Tomkin G, Cekleniak N, Garrisi M, Barad D, Cohen J, Gleicher N. The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation. *Hum Reprod* 2008;23:499–503.

176. Weghofer A, Munné S, Brannath W, Chen S, Barad D, Cohen J, Gleicher N. The impact of LH-containing gonadotropin stimulation on euploidy rates in preimplantation embryos: antagonist cycles. *Fertil Steril* 2009;92:937–942.
177. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, Macklon NS, Fauser BC. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007;22:980–988.
178. Rubio R, Mercader A, Alama P, Cesar L, Rodrigo L, Labarta E, Melo M, Pellicer A, Remohi J. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod* 2010;25:2290–2297.
179. Harvey AJ. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci.* 2007;98:113-28.
180. Lindenau A, Fischer B. Effect of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured preimplantation rabbit embryos. *Theriogenology* 1994;41:889–98.
181. Wale PL, Gardner DK. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod Biomed Online* 2010;21:402–10.
182. Martínez M, Losada C, Pareja S, Martínez A, Agudo D, Bronet F. Efecto de las bajas concentraciones de oxígeno en función del tipo de incubador utilizado en cultivos secuenciales. VII Congreso ASEBIR (Sevilla, Noviembre 2013).
183. Nogales M, Bronet F, Martínez E, Ariza M, Liñán A. Effect of oxygen concentrations on the blastocyst rate in the preimplantation genetic screening program. 14th PGDIS Congress (Chicago, Mayo 2015).
184. Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;11:7.

185. Nastri CO, Nóbrega BN, Teixeira DM, Amorim J, Diniz LMM, Barbosa MWP, Giorgi VSI, Pileggi VN, Martins WP. Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2016;106:95-104.
186. Gomes Sobrinho DB, Oliveira JB, Petersen CG, Mauri AL, Silva LF, Massaro FC, Baruffi RL, Cavagna M, Franco JG Jr. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011 Nov 1;9:143.
187. Kovacic B, Vlaisavljević V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:229-36.
188. Waldenström U, Engström AB, Hellberg D, Nilsson S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2009;91:2461-5.
189. Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. 1,2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. *Hum Reprod*. 2007;22:250-9.
190. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 1995;2:91-7.
191. Gelety TJ, Pearlstone AC, Surrey ES. Short-term endocrine response to gonadotropin-releasing hormone agonist initiated in the early follicular, midluteal, or late luteal phase in normally cycling women. *Fertil Steril*. 1995;64:1074-80.
192. Munne S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril*. 2019;112:1071-9.
193. Lou H, Li N, Guan Y, Zhang Y, Hao D, Cui S. Association between morphologic grading and implantation rate of Euploid blastocyst. *J Ovarian Res*. 2021;14:18-26.

194. Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, et al. Trophoctoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril*. 2013;99:1283-9.
195. Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJ, Klein BM, et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single blastocyst transfer. *Reprod BioMed Online*. 2013;27:353-61.
196. Irani M, Reichman D, Robles A, Melnick A, Davis O, Zaninovic N, et al. Morphologic grading of euploid blastocysts influences implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2017;107:664-70.
197. Nazem TG, Sekhon L, Lee JA, Overbey J, Pan S, Duke M, et al. The correlation between morphology and implantation of euploid human blastocysts. *Reprod BioMed Online*. 2019;38:169-76.
198. Mahutte N, Kamga-Ngande C, Sharma A, Sylvestre C. Obesity and reproduction. *J Obstet Gynaecol Can*. 2018;40:950-66.
199. Nelson SM, Matthews P, Poston L. Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. *Hum Reprod Update*. 2010;16:255-75.
200. Boots C, Stephenson MD. Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. *Semin Reprod Med*. 2011;29:507-13.
201. Supramaniam PR, Mittal M, McVeigh E, Lim LN. The correlation between raised body mass index and assisted reproductive treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis of the evidence. *Reprod Health*. 2018;15:2-15.
202. Mutsaerts MA, van Oers AM, Groen H, Burggraaff JM, Kuchenbecker WK, Perquin DA, et al. Randomized trial of a lifestyle program in obese infertile women. *N Engl J Med*. 2016;374:1942-53.
203. Einarsson S, Bergh C, Kluge L, Thurin-Kjellberg A. No effect of weight intervention on perinatal outcomes in obese women scheduled for in vitro fertilization treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2019;98:708-14.

204. Grzegorzczuk-Martin V, Freour T, De Bantel FA, Bonnet E, Merzouk M, Roset J, et al IVF outcomes in patients with a history of bariatric surgery: a multicenter retrospective cohort study. *Hum Reprod.* 2020;35:2755-62.
205. Bellver J, Mariani G. Impact of parental over- and underweight on the health of offspring. *Fertil Steril.* 2019;111:1054-64.
206. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization;2000(WHO Technical Report Series, No. 894
207. Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martinez M, Carmona L, Pellicer A. Five years experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril.* 2013;99:1994-9.
208. Provost MP, Acharya KS, Acharya CR, Yeh JS, Steward RG, Eaton JL, et al. Pregnancy outcomes decline with increasing recipient body mass index: an analysis of 22,317 fresh donor/recipient cycles from the 2008-2010 Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System registry. *Fertil Steril.* 2016;105:364-8.
209. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction.* 2017;153:97-108.
210. Cerrillo M, Herrero L, Guillen A, Mayoral M, Garcia-Velasco JA. Impact of endometrial preparation protocols for frozen embryo transfer on live birth rates. *Rambam Maimonides Med J.* 2017;8:e0020.
211. Zaat TR, Brink AJ, de Bruin JP, Goddijn M, Broekmans FJM, Cohlen BJ, et al. Increased obstetric and neonatal risks in artificial cycles for frozen embryo transfers? *Reprod BioMed Online.* 2021;42:919-29.
212. Wang Z, Liu H, Song H, Li X, Jiang J, Sheng Y, et al. Increased risk of preeclampsia after frozen-thawed embryo transfer in programming cycles. *Front Med.* 2020;7:104.

213. Mecacci F, Avagliano L, Lisi F, Clemenza S, Serena C, Vannuccini S, Rambaldi MP, Simeone S, Ottanelli S, Petraglia F. Fetal growth restriction: does an integrated maternal hemodynamic-placental model fit better? *Reprod Sci* ;2020.
214. Cruz F, Bellver J. Live birth after embryo transfer in an unresponsive thin endometrium. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30:481-4.
215. Wu Y, Gao X, Lu X, et al. Endometrial thickness affects the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in normal responders after GnRH antagonist administration. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:96-102.
216. Traub ML, Van Arsdale A, Pal L, et al. Endometrial thickness, Caucasian ethnicity, and age predict clinical pregnancy following fresh blastocyst embryo transfer: a retrospective cohort. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:33-40.
217. Al-Ghamdi A, Coskun S, Al-Hassan S, et al. The correlation between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;6:37-41.
218. Arce H, Velilla E, Lopez-Teijon M. Association between endometrial thickness in oocyte donation cycles and pregnancy success rates. *Reprod*

8. ANEXO

ANEXO. Certificado del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid



D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, PRESIDENTA DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID

C E R T I F I C A

Que el proyecto titulado: “Estudio del efecto de los factores extrínsecos en la tasa de aneuploidias pre-embriónicas” (1806-MAD-045-CN), remitido por la Dra. María del Carmen Nogales Barrios del Laboratorio de Embriología de IVI Madrid, ha sido sometido a un trámite de revisión abreviada por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos y se ha considerado que su planteamiento es correcto desde un punto de vista ético y que no requiere revisiones adicionales ni seguimiento por parte del CEIm.

Para esta opinión se ha tenido en cuenta que el proyecto de investigación se limita al uso secundario de información previamente obtenida en el curso de la asistencia médica, por parte del mismo equipo profesional responsable de la asistencia, que se mantiene la confidencialidad en el manejo de los datos personales de los pacientes y que se trata de investigación epidemiológica con interés científico. Se acepta la justificación de exención de la obtención del consentimiento informado de los pacientes para este estudio retrospectivo.

Lo que se hace constar a los efectos oportunos.

En Majadahonda, a 23 de julio de 2018

Hospital Universitario
Puerta de Hierro
Majadahonda
Comité Ético de Investigación
Clínica

Fdo.: Dra. Avendaño Solá
Presidenta del CEIm

ZONA NOROESTE
C/ Joaquín Rodrigo, 2
28222 Majadahonda / Madrid
Tel.: 91 191 60 00
Fax: 91 373 05 35

