

Universitat de València

Facultat de Medicina i Odontologia
Departamento de Pediatría, Obstetricia y
Ginecología



EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN LA CALIDAD EMBRIONARIA, INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS Y RESULTADOS CLÍNICOS

Trabajo de Tesis Doctoral

Presentado por D:

César Lizán Tudela

Coodirectores: Prof. J. Remohí Giménez y Dra. M.C. Rubio Lluesa

UNIDAD DOCENTE DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA

DEPARTAMENTO POG, FACULTAD DE MEDICINA DE VALENCIA

D. José Remohí Giménez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

D^a. Carmen Rubio Lluesa, Doctora en Ciencias Biológicas y Directora de laboratorio de Iviomics.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Efectos de la estimulación ovárica en la calidad embrionaria, incidencia de aneuploidías y resultados clínicos”, ha sido realizado íntegramente por D. César Lizán Tudela bajo nuestra supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 26 de Marzo de 2012.

Fdo. José Remohí

Fdo. Carmen Rubio Lluesa

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA	5
1.2 ANEUPLOIDÍAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA	11
1.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL	17
1.4 RELACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y ANEUPLOIDÍAS	21
1.4.1 PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DURANTE LOS TRES PRIMEROS DÍAS DE DESARROLLO EMBRIONARIO	22
1.4.2 ANOMALÍAS EN EL BLASTOCISTO	26
1.5 EFECTOS ADVERSOS DE LA EOC	28
1.6 EL DESARROLLO DE LOS PROTOCOLOS SUAVES O <i>MILD</i>	34
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO	41
3. OBJETIVOS	43
4. MATERIAL Y MÉTODOS	44
4.1 DISEÑO	44
4.2 LUGARES DE EJECUCIÓN	45
4.3 SUJETOS DE ESTUDIO	46
4.3.1 DONANTES DE ÓVULOS	46
4.3.2 RECEPTORAS DE ÓVULOS	48
4.4 BIOPSIA Y CULTIVO EMBRIONARIO	49
4.5 HIBRIDACIÓN "IN SITU" FLUORESCENTE (FISH)	52
4.6 VARIABLES ANALIZADAS	53
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	54
5. RESULTADOS	56
5.1 DONANTES CON AMBOS CICLOS COMPLETADOS	58
5.1.1 DONANTES CON NÚMERO SIMILAR DE OOCITOS EN AMBOS PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN (SUBGRUPO I)	62
5.1.2 DONANTES CON DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE OOCITOS TRAS ESTIMULACIÓN CON DOSIS REDUCIDA (SUBGRUPO II)	65
5.2 DONANTES CON CANCELACIÓN DEL CICLO DE DOSIS REDUCIDAS	68
6. DISCUSIÓN	70
6.1 ACERCA DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO	70
6.2 ACERCA DEL DISEÑO DEL ESTUDIO	73
6.2.1 ELECCIÓN DEL MODELO DE DONACIÓN OVOCITARIA	73

6.2.2	INFLUENCIA DE LA EOC REPETIDA EN LOS RESULTADOS	74
6.2.3	ELECCIÓN DE DONANTES ALTAS RESPONDEDORAS	76
6.2.4	CANCELACIÓN DEL CICLO DE DOSIS REDUCIDA EN DONANTES CON BAJA RESPUESTA	77
6.3	ACERCA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (PGS)	79
6.4	ACERCA DE LA VALORACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES	84
6.5	ACERCA DE LOS OBJETIVOS	87
7.	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>95</u>
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>97</u>
9.	<u>ANEXOS</u>	<u>111</u>
9.1	COMITÉ ÉTICO	111
9.2	CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO	112

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA

Los primeros tratamientos de fecundación *in vitro* (FIV) se llevaron a cabo mediante ciclos no estimulados que culminaron con el nacimiento de Louise Brown, el primer “bebé probeta” (Steptoe and Edwards, 1978). Ello supuso la consolidación de los primeros pasos de una nueva disciplina, la reproducción asistida, recientemente reconocida con el premio Nobel de Fisiología y Medicina 2010 para Robert Edwards “por haber hecho posible el tratamiento de la infertilidad, un problema médico que afecta a una parte importante de la Humanidad, incluyendo a más del 10% de las parejas del planeta” según se explicó durante el anuncio del galardón por parte del Instituto Karolinska de Estocolmo. A pesar del hito, rápidamente se concluyó que los ciclos naturales suponían una metodología de trabajo que conllevaba grandes esfuerzos a cambio de escasas posibilidades de éxito para la consecución de una gestación, motivo por el cual fueron reemplazados por la hiperestimulación ovárica controlada (HOC o EOC), la cual permitía obtener un número mayor de folículos maduros, y por lo tanto, de óvulos capaces de ser fecundados.

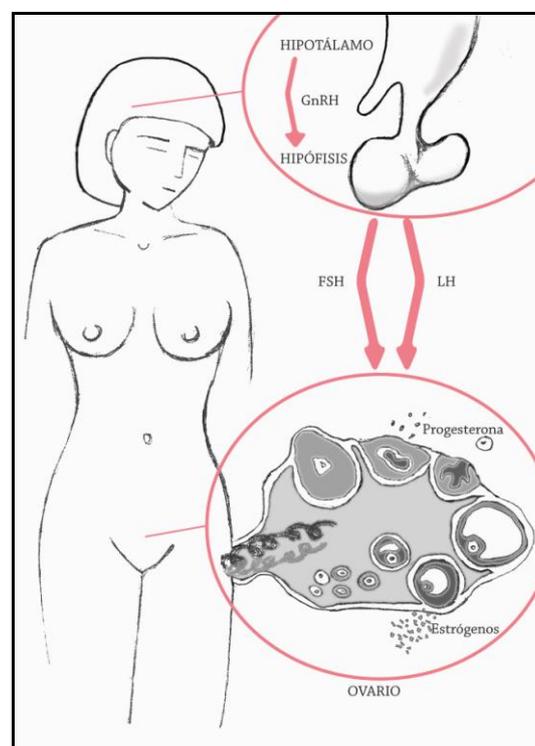


Figura 1. Esquema del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario

El concepto de umbral de la hormona folículo-estimulante (FSH) propuesto por Brown en 1978 (Brown, 1978) supone que todos los folículos con potencial para alcanzar el estadio preovulatorio necesitan de un nivel mínimo de FSH que es ligeramente distinto para cada uno. Por encima del mismo, se permitirá el desarrollo folicular (ver Figura 2). Así, en el transcurso de un ciclo natural, el folículo con menores requerimientos de FSH formará el microambiente hiperestrogénico adecuado y se convertirá en el folículo dominante que llegará a la ovulación. A nivel celular, las células de la granulosa del folículo dominante son más sensibles a la FSH, lo cual conduce a una expresión precoz del receptor de la hormona luteinizante (LH) junto con una mayor actividad aromatasas. Ello le permitirá continuar con la producción hormonal estrogénica cuando las concentraciones plasmáticas de FSH comienzan su descenso, mientras que el resto de los folículos, con un mayor umbral para la FSH y una respuesta a la LH más limitada, empiezan el camino que los llevará a la atresia (Zelevnik and Hillier, 1984).

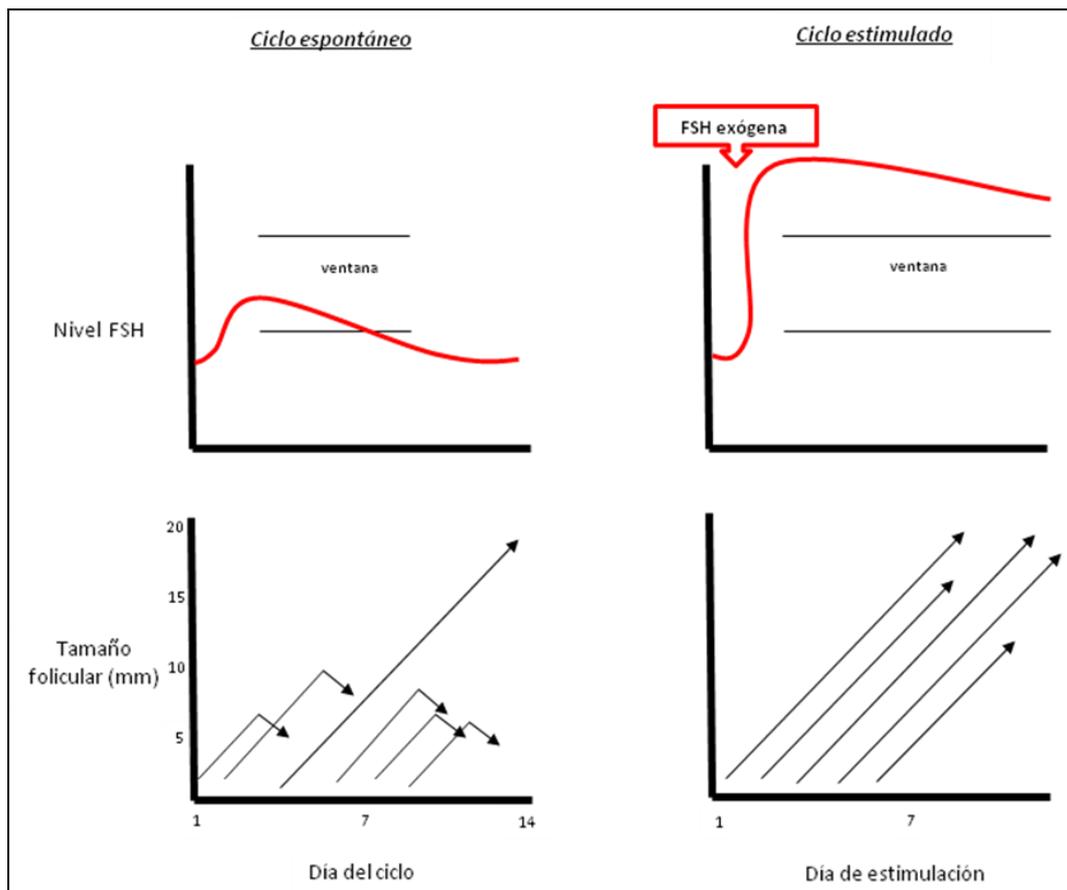


Figura 2. Representación gráfica de los niveles de FSH y su correspondiente desarrollo folicular durante un ciclo espontáneo y un ciclo estimulado.

Durante los ciclos de HOC el objetivo será evitar el proceso de dominancia mediante el empleo exógeno de unos niveles de gonadotropinas que superen el umbral de los requerimientos del *pool* de folículos antrales que ha comenzado su crecimiento, permitiéndose así su desarrollo hasta el estadio preovulatorio. En este momento se realizará la punción ovárica para extraer los oocitos. El proceso realizado de este modo proporciona un buen número de embriones candidatos a ser transferidos y supuso, por tanto, un incremento en las tasas de éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA).

La farmacología de la reproducción ha experimentado una rápida evolución de sus compuestos permitiendo el empleo de preparados con calidad creciente (ver Figura 3). En los primeros años de la disciplina, las gonadotrofinas urinarias y los antiestrógenos eran los fármacos más frecuentemente empleados en la estimulación ovárica. Las gonadotrofinas se obtenían de la orina de mujeres menopáusicas a través de técnicas de ultrafiltrado y purificación. Este proceso nos ha permitido disponer de la gonadotrofina menopáusica humana (hMG), con proporción fija y equiparable de FSH y LH, e isoformas urinarias de FSH. El representante tradicional de los antiestrógenos ha sido el citrato de clomifeno, el cual posee una acción mixta agonista-antagonista que aumenta la secreción endógena de FSH y LH. A mediados de los años noventa, se introdujeron en el mercado formas de FSH obtenidas por técnicas recombinantes (FSHr) que son idénticas en su secuencia de aminoácidos a la hormona humana. Estas nuevas hormonas ofrecen, en principio, alta efectividad, buena tolerancia y amplios márgenes de seguridad pero a un costo muy superior comparado con las formas urinarias. La FSHr ofrecería las ventajas de ser un producto más puro, con menor riesgo de producir reacciones inmunológicas y de transferir infecciones, sobre todo por virus lentos, proporcionando, además, una mayor estabilidad y homogeneidad entre presentaciones. Ello favorecería una mayor precisión en el manejo de la estimulación ovárica junto con una menor incidencia de efectos no deseados (Gleicher *et al.*, 2003). Sin embargo, la evidencia científica en favor de estas ventajas, a priori esperables, es escasa y la elección de la gonadotrofina a administrar se basa, en la mayoría de los casos, en la preferencia del médico tratante (Checa *et al.*, 2007). Recientemente, se ha introducido en el mercado la primera molécula híbrida con actividad folículo-estimulante mantenida durante aproximadamente una semana. Su administración supone una pauta más cómoda sin verse afectados los resultados gestacionales. (Devroey *et al.*, 2009)

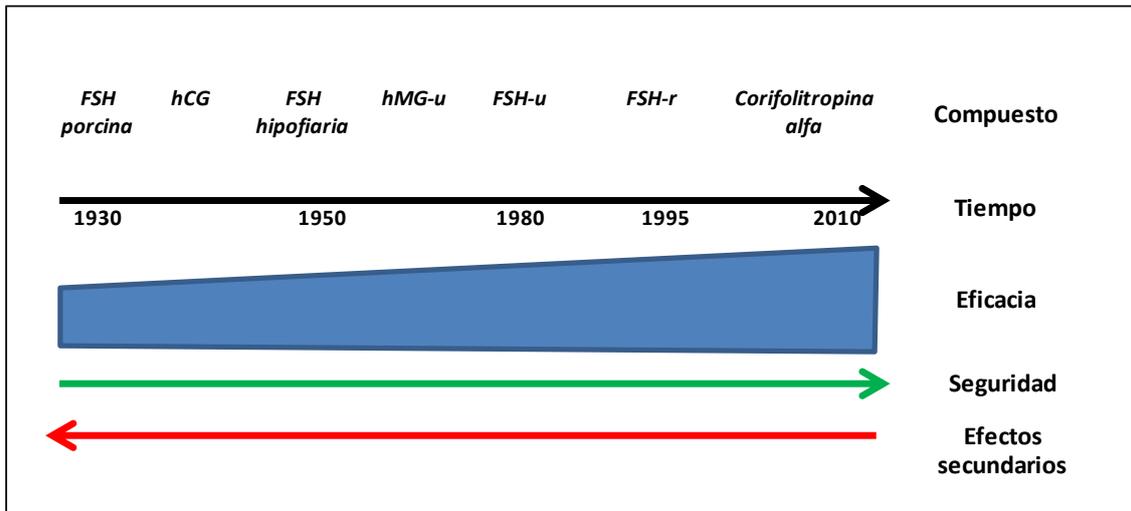


Figura 3. Representación gráfica de la evolución histórica de los compuestos farmacológicos empleados en reproducción asistida.

Los protocolos de estimulación ovárica controlada combinan el empleo de las gonadotropinas, para conseguir un desarrollo folicular múltiple, con los análogos de la GnRH. Estos últimos son péptidos sintéticos que han sufrido modificaciones en su estructura para alterar su afinidad con el receptor de la GnRH o para retrasar su aclaramiento metabólico, aumentando así su vida media y su potencia. Inicialmente, los análogos de la GnRH se contemplaron como adyuvantes en mujeres con antecedentes de resultados adversos en la FIV, tales como un pico de LH prematuro o una luteinización prematura, produciendo oocitos de baja calidad. Sin embargo, hoy en día su uso no sólo evita el pico prematuro de LH, sino que también produce un incremento de las probabilidades de embarazo, al aumentar el número de oocitos aspirados y fecundados, y, por tanto, aumentando también el número de embriones disponibles para transferir (Templeton and Morris, 1998).

Existen dos tipos de análogos de la GnRH: los antagonistas, que actúan de forma competitiva, uniéndose al receptor, bloqueándolo y provocando una supresión hipofisaria prácticamente inmediata; y los agonistas, que tienen mayor afinidad sobre el receptor que la GnRH natural, y la propiedad de causar un aumento inicial de la liberación de FSH y LH, efecto denominado *flare up*, para producir después, por la acción permanente sobre su receptor, una regulación a la baja tanto de los receptores como de las vías de transmisión de mensajeros posreceptor, consiguiendo finalmente su objetivo principal, que es la supresión hipofisaria (Remohí *et al.*, 2008a).

El efecto estimulante inicial de los agonistas (*flare up*) ha supuesto el desarrollo de protocolos que se han servido de esta acción para intentar optimizar la respuesta de pacientes

que presentaban, fundamentalmente, baja respuesta. Así, se han propuestos los denominados protocolos *flare* y *microflare*, nombres que reflejan la dosis de agonistas empleadas en cada uno de ellos, que han intentado evitar la supresión ovárica excesiva característica del protocolo largo. El principal problema asociado al primero son las excesivas concentraciones de LH que se producen en el entorno folicular y que conllevan una elevación de los niveles séricos de progesterona y testosterona, efectos que resultan deletéreos para la foliculogénesis y la implantación embrionaria. El protocolo *microflare* intenta disminuir esta secreción excesiva de LH y las mencionadas consecuencias (Remohí *et al.*, 2008b).

Fueron necesarios 15 años para conocer el protocolo óptimo con agonistas de la GnRH (protocolo largo, con comienzo de la administración del análogo en la fase lútea del ciclo previo) en lo referente a tasas de gestación en la población general. (Daya, 2000; Huirne *et al.*, 2004). Este protocolo consigue una supresión profunda de la secreción endógena de gonadotrofinas en la fase folicular precoz, permitiendo que los folículos antrales puedan crecer de forma coordinada en respuesta a las gonadotrofinas exógenas y que su maduración final sea simultánea. Ello conlleva la ampliación de la ventana de la FSH, un aumento de las necesidades de FSH y, finalmente, más folículos y más oocitos maduros obtenidos (Daya, 2000).

En lo referente a los antagonistas, se pueden administrar en cualquier momento durante la fase folicular precoz o media para evitar el pico prematuro de la LH. Además, su empleo supone menor sintomatología asociada a la supresión hormonal y menor posibilidad de formación de quistes (Felberbaum and Diedrich, 1999). Conocido ello, surgieron dos protocolos de administración de los mismos: el de dosis única, que supone la inyección del antagonista en la fase folicular tardía alrededor del día 7 u 8 del ciclo; y, el de dosis múltiple, con inicio de su administración el 6º día y la repetición diaria hasta el día de la gonadotropina coriónica humana (hCG). Inmediatamente tras la aparición de estos fármacos, empezaron a aparecer estudios que los comparaban con el protocolo largo con agonistas, sin quizá haber quedado bien establecido cuál era el régimen óptimo de utilización para los antagonistas. Sus resultados pusieron de manifiesto varias posibles desventajas, tales como que el número de oocitos obtenidos y la tasa de gestación clínica era menor (Al-Inany and Aboulghar, 2002) y, además, la planificación del ciclo resultaba más compleja, ya que el inicio de la FSH debía realizarse en día 2 o 3 del ciclo natural. Posteriormente, nuevas publicaciones matizaron los resultados previos, equiparando los resultados con los obtenidos con el protocolo largo

(Kolibianakis et al., 2006) y mostraron ventajas tales como la menor duración del tratamiento y el menor coste asociado.

1.2 ANEUPLOIDÍAS EN REPRODUCCIÓN HUMANA

Las crecientes dificultades que plantea la actual estructura social, se traducen en una demora del momento elegido para intentar concebir. Las mujeres de nuestro entorno tienden a diferir la maternidad con el fin de conseguir una mejor formación, mayor desarrollo profesional, logros sociales..., pero nuestra biología no se encuentra adecuadamente coordinada con estas exigencias. Todo ello hace que la reproducción en nuestra especie sea un proceso complejo, donde nos hemos ido alejando de las condiciones ideales para su realización. Son llamativas las diferencias en cuanto a efectividad del proceso con respecto a otras especies; así, las posibilidades de que la hembra de un conejo o un roedor quede gestante tras mantener relaciones sexuales programadas son de alrededor de un 90% (Foote and Carney, 1988). Estas cifras serían impensables para la especie humana, donde las probabilidades únicamente alcanzarían un 20-30% (Evers, 2002; Taylor, 2003). Uno de los motivos que se considera esencial para explicar esta gran ineficiencia del proceso reproductivo en la especie humana (Norwitz *et al.*, 2001) es la existencia de gran número de alteraciones cromosómicas embrionarias, las cuales, como sabemos, van en aumento con el paso de los años de la mujer (Hassold and Hunt, 2001). Por tanto, las aneuploidías suponen un obstáculo fundamental en la consecución del objetivo de concebir y son, habitualmente, un factor no previsto cuando una mujer decide planificar su maternidad.

Además, las pérdidas concepcionales se producen en el 15-20% de las gestaciones clínicas (Steer *et al.*, 1989). Los abortos pueden tener diversas etiologías pero los factores genéticos son, sin duda, la causa más frecuente. La gran mayoría se producen durante el primer trimestre del embarazo, donde se detectan alteraciones cromosómicas en alrededor del 60% de los casos (Hassold *et al.*, 1980)

Las anomalías cromosómicas observadas en estudios de abortos espontáneos son principalmente anomalías numéricas (95% del total) que se producen en padres con cariotipos normales. Las anomalías más frecuentes son las trisomías autosómicas (26,8%) y las poliploidías (9,8%), seguidas por la monosomía para el cromosoma X (8,6%), que es la alteración cromosómica que de forma individual se presenta con mayor frecuencia en las pérdidas gestacionales del primer trimestre (Hassold *et al.*, 1996). La afectación de los autosomas suele estar asociada a errores en la meiosis I materna (Nicolaidis and Petersen, 1998) y se asocia a alteraciones graves que dependerán de los cromosomas implicados. Para las trisomías de los cromosomas sexuales (XXX, XXY e XYY) el origen reside en un elevado

porcentaje en la no-disyunción durante la meiosis paterna o en las divisiones post-cigóticas (Jacobs and Hassold, 1995). Estas anomalías numéricas son más leves cuando afectan a los cromosomas sexuales, ya que la mayoría de los afectados tiene inteligencia normal aunque con aumento del riesgo de retraso mental, y alteración de su fertilidad (disgenesias gonadales, esterilidad, amenorrea). Finalmente, la mayor parte de las triploidías son de origen paterno (Zaragoza *et al.*, 2000; Egozcue *et al.*, 2002), debido a la fecundación de un oocito por más de un espermatozoide o también por la fecundación de un oocito por un espermatozoide diploide, más frecuentes en varones oligozoospermicos (Egozcue *et al.*, 2002). La diploidía no es tan frecuente en oocitos, ya que las alteraciones del huso meiótico resultan fundamentalmente en aneuploidías (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 1999), aunque se ha descrito un aumento en la proporción de oocitos diploides a medida que aumenta la edad materna (Roberts and O'Neill, 1995).

Como sabemos, el síndrome de Down se produce por la trisomía del cromosoma 21 y tanto ésta como otras trisomías aumentan con la edad materna. El efecto es tan evidente como muestra el hecho de que en mujeres de 25 años el 2% de los embarazos clínicos presente trisomías, mientras que el porcentaje alcanza el 35% en mujeres de más de 40 años (ver Figura 4).

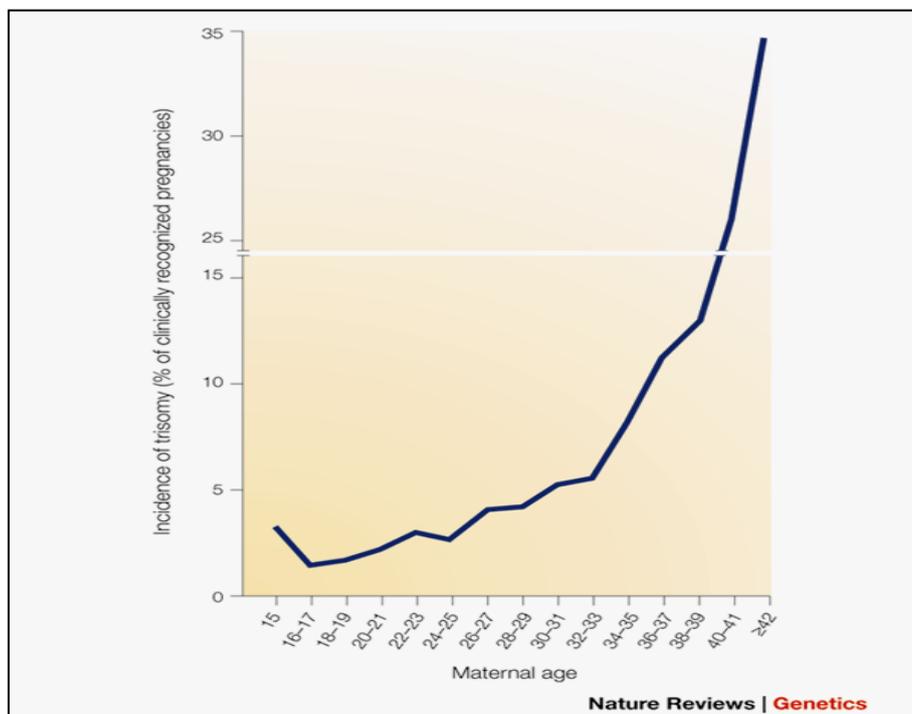


Figura 4. Incidencia de trisomías y edad materna (Hassold y Hunt, 2001)

Los mecanismos básicos que producen este aumento de las aneuploidías con la edad siguen siendo desconocidos. Varios trabajos sugieren una posible disminución en la recombinación entre algunos pares de cromosomas homólogos y que este fenómeno, asociado a defectos en la formación del huso relacionados con la edad, podrían aumentar la no-disyunción de algunos pares de cromosomas. Esta es la hipótesis *two-hit* (doble golpe) (Lamb *et al.*, 1996), según la cual en una mujer joven, la maquinaria meiótica funciona de forma óptima y la segregación es correcta excepto para aquellas configuraciones quiasmáticas más susceptibles, por lo que el primer golpe (o *hit*) se produciría por causa de un patrón de riesgo debido a una ausencia o disminución de la recombinación entre determinados cromosomas homólogos. A medida que la edad materna aumenta, la maquinaria meiótica se vuelve menos eficiente y más proclive a errores. Los patrones susceptibles de no disyunción lo siguen siendo, pero ahora se añade el riesgo para otros cromosomas con patrones normales. La edad sería el segundo golpe (o *hit*) y supondría que el oocito va acumulando errores y pierde la capacidad de restaurarlos, así como de mantener la cohesión las cromátidas hermanas. Cabe destacar que el efecto de la edad no afecta por igual a todos los cromosomas; existe una correlación inversamente proporcional entre la frecuencia de predivisión de cromátidas y el tamaño del cromosoma, es decir, en pacientes de edad materna avanzada se observa una mayor frecuencia de separación de cromátidas prematura en cromosomas de menor tamaño (Sandalinas *et al.*, 2002).

Se han estudiado otros posibles factores que pudieran dar lugar a una mayor predisposición a las aneuploidías como son la exposición a pesticidas, radioterapia, tratamientos hormonales, tabaco, etc., sin embargo no se ha conseguido demostrar la relación directa de ninguno de ellos. Los únicos factores que se consideran hoy en día indiscutiblemente relacionados con las aneuploidías son tres: la edad materna, la recombinación anormal y la existencia de aneuploidías previas.

El desarrollo de las TRA nos ha proporcionado datos sobre la dotación cromosómica en embriones humanos y en productos abortivos que apoyan la existencia de un importante proceso de selección natural que tendría por finalidad contrarrestar el elevado número de alteraciones cromosómicas intrínsecas a la reproducción en nuestra especie. Muchos embriones con desarrollos normales y calificados mediante criterios morfológicos como de buena calidad presentan, en realidad, alteraciones cromosómicas. Munné *et al.* encuentra en pacientes menores de 35 años una tasa de euploidia embrionaria del 44% , la cual disminuiría al 21% por encima de los 41 años (Munné *et al.*, 2007). Fauser afirma que entre un 40 y un

90% de los embriones calificados morfológicamente como de buena calidad son cromosómicamente anormales. Incluso, se postula que estas cifras aumentarían si se analizase un mayor número de cromosomas. Ello podría ayudarnos a entender el por qué de la relativamente constante y baja tasa de implantación por embrión transferido, la cual se sitúa generalmente entre un 20 y un 50% dependiendo de la calidad del laboratorio y de la selección de pacientes realizada (Fauser, 2008). Adicionalmente, la incidencia de abortos bioquímicos tras ciclos de reproducción asistida puede alcanzar un 12-15% (Bellver *et al.*, 2007) y, finalmente, la tasa de abortos clínicos espontáneos en parejas que se someten a TRA oscila entre un 12 y un 40% en función de la técnica empleada, el número de embriones transferidos y la edad (Aytoz *et al.*, 1999; Palmero *et al.*, 2000; Westergaard *et al.*, 2000). La incidencia total de aneuploidías no parece encontrarse aumentada tras la realización de TRA y tampoco concurren diferencias en cuanto al tipo de alteraciones cromosómicas encontradas, las cuales no difieren sustancialmente de las de la población general, a excepción de un aumento de monosomías X y un descenso de las poliploidías tras la realización de técnicas de microinyección espermática (ICSI). (Martínez *et al.*, 2010). Existe la duda de si estas diferencias son por la técnica en sí o un por un riesgo paterno aumentado que hubiera permanecido encubierto de no someterse a estos procedimientos.

Obviamente, no todos los fallos de implantación o todos los abortos se producirán por causas cromosómicas, pero sí un porcentaje importante de los mismos. De hecho, el estudio de la presencia de anomalías cromosómicas en abortos revela una incidencia que oscila entre el 50 y el 70% de los casos (Jacobs and Hassold, 1995). Para acabar de mostrarnos como actúa el proceso de selección natural, se ha establecido que la incidencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos es 10 veces superior a la observada en mortinatos y ésta a su vez, es 10 veces superior a la que se encuentra en recién nacidos vivos, con sólo un 0,6% de anomalías cromosómicas viables (Martin, 2008).

La incidencia de alteraciones cromosómicas es sorprendentemente alta en los gametos humanos. De hecho se estiman en un 21% para los oocitos frente a un 9% de los espermatozoides. Los tipos de alteraciones son diferentes y, mientras que los oocitos sufren una elevada incidencia de alteraciones numéricas, en los espermatozoides las alteraciones suelen ser de tipo estructural. Dado que los embriones aneuploides tienen mayores opciones de supervivencia, la gran mayoría de los productos abortivos son de origen materno (Martin, 2008). A pesar de la elevada incidencia de las aneuploidías y de su gran repercusión clínica, sabemos muy poco de los factores que controlan la disyunción de los cromosomas y dan lugar

a las aneuploidías. Probablemente, un mejor conocimiento del proceso de meiosis en la especie humana nos mostrará algunos de los momentos clave en la génesis de aneuploidías.

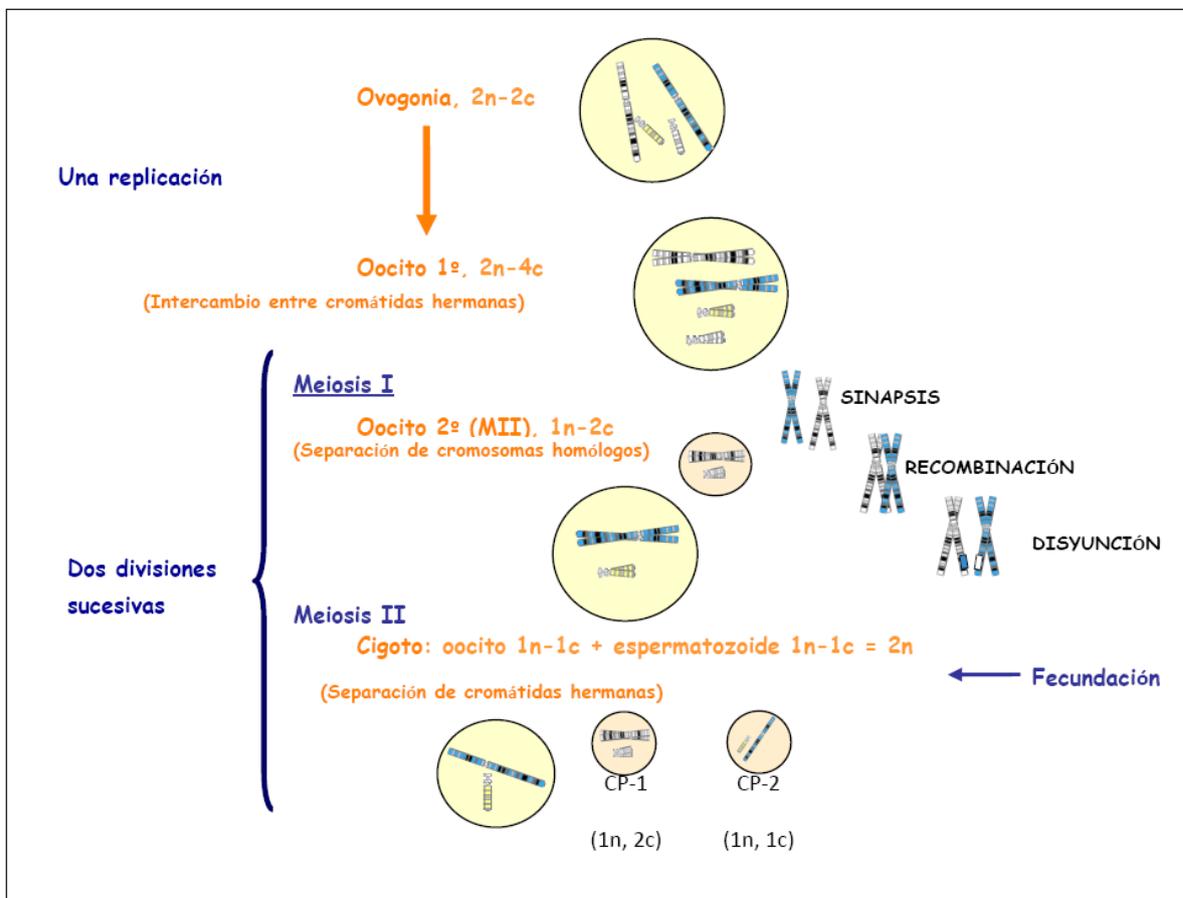


Figura 5. Esquema de la meiosis femenina

La meiosis es el proceso en el que se reduce a la mitad el número de cromosomas en las células somáticas diploides para dar lugar a los gametos haploides (ver Figura 5). De forma general, la meiosis comienza con una duplicación del ADN dando lugar a las cromátidas hermanas, para a continuación producirse dos divisiones sucesivas en las que, en primer lugar se segregan los cromosomas homólogos y, en la segunda división, se produce la segregación de las cromátidas hermanas. Se trata de un proceso coordinado de forma muy fina para que se produzca la exacta repartición de los cromosomas en las células hijas resultantes. Errores en la formación de los microtúbulos (huso meiótico) que aproximan a los cromosomas en la placa meiótica, así como en el apareamiento de los cromosomas homólogos (sinapsis) o en recombinación entre los cromosomas homólogos (*crossing-over* o quiasmas) dan lugar a una segregación anormal y a una diferente dotación cromosómica en las células hijas. Esta

alteración se conoce como “no disyunción meiótica”, y puede producirse tanto en la meiosis I o la meiosis II.

Los errores en la meiosis I son los más frecuentes y la meiosis femenina es la más proclive a errores meióticos, por lo que es mayor la producción de aneuploidías de origen materno que de origen paterno. Esto se debe a que la meiosis femenina presenta la particularidad de una duración muy larga (puede durar de 10 a 50 años, aumentando las posibilidades de errores conforme aumenta su duración). Así, las células germinales dan origen a las oogonias. Estas se transforman en oocitos al iniciar la primera división meiótica y se detienen en su profase I. Este proceso comienza en las semanas 11-12 de gestación. La progresión de la meiosis hasta la etapa de diplotene continúa durante el resto del embarazo y está completa al nacimiento. La meiosis se reanuda años más tarde cuando se produce la madurez sexual y comienzan los ciclos menstruales. De esta forma, los oocitos completan la meiosis I cuando madura su folículo, produciendo un oocito secundario y el primer corpúsculo polar. Después de la ovulación cada oocito continúa hasta la metafase de la meiosis II. La meiosis II se completa sólo si se produce fecundación, lo que resulta en un óvulo maduro fecundado y el segundo corpúsculo polar (Rubio *et al.*, 2010).

1.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

El diagnóstico genético se plantea como una opción para conocer la dotación cromosómica ó génica del embrión antes de que este sea transferido al útero materno y evitar así una interrupción del embarazo. Este diagnóstico puede ser:

a) preconcepcional: consiste en el análisis cromosómico/genético del primer y/o segundo corpúsculo del oocito (sólo ofrece información de la mitad del embrión ya que faltaría la parte correspondiente al espermatozoide)

b) preimplantacional: consiste en el análisis cromosómico/genético de una o varias células (blastómeros) del embrión/blastocisto antes de ser transferido al útero y por tanto antes de la implantación.

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGS; del inglés *preimplantation genetic screening*) permite seleccionar los embriones sanos o cromosómicamente normales que van a ser transferidos al útero y es una alternativa al diagnóstico prenatal (realizado después de la implantación) en parejas con riesgo elevado de transmitir anomalías cromosómicas o genéticas a la descendencia.

La FIV nos permite obtener varios embriones y seleccionar los mejores para realizar su transferencia a la cavidad uterina. A pesar de que los parámetros morfológicos proporcionan una valiosa información para realizar dicha selección, este método no deja de ser subjetivo y no permite conocer la constitución cromosómica de los embriones (Munné *et al.*, 2006a). Este es precisamente el fundamento del PGS, permitir un estudio genético en los embriones antes de su transferencia al útero y, por tanto, antes de que tenga lugar la implantación (Handyside *et al.*, 1990). En condiciones *in vitro*, después de la fecundación, el cigoto humano se divide aproximadamente cada 24 horas durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. La biopsia se puede realizar en diferentes estadios y así, podemos hablar de biopsia de corpúsculo polar (tras la fecundación), biopsia de blastómeros (día 3) y biopsia de blastocistos (día 5).

Actualmente, existe discusión acerca de cuál es el momento idóneo para realizar la biopsia embrionaria. Su realización esta descrita en los distintos momentos del desarrollo embrionario, pudiendo realizarse desde una biopsia del corpúsculo polar hasta la biopsia en estadios avanzados de desarrollo preimplantatorio (blastocisto). Incluso, se ha descrito la

realización sucesiva, primero del corpúsculo polar y posteriormente en día 3, sin afectar a las posibilidades de viabilidad del embrión (Magli *et al.*, 2004). En cualquier caso, la mayor parte de la información de que disponemos proviene de la biopsia en día 3 de desarrollo embrionario, momento en el que habitualmente se realiza. Sin embargo, hay grupos que proponen su ejecución posterior con el fin de poder analizar un mayor número de células y evitar el daño de la masa celular interna de la que deriva el feto; como inconvenientes, existe un menor tiempo para el análisis y se puede producir un error diagnóstico por mosaicismo del trofoectodermo. En cualquier caso, nos referiremos a la biopsia embrionaria de blastómeras, la cual se realiza de forma idónea cuando los embriones tienen 6-8 células, ya que se ha comprobado que en este estadio, la extracción de 1-2 blastómeros no afecta negativamente a su posterior desarrollo hasta blastocisto (Hardy *et al.*, 1990). A continuación, se analizan las células obtenidas y el resultado del estudio genético se obtiene en un plazo máximo de 48 horas, permitiéndose la transferencia embrionaria en el quinto día de desarrollo embrionario, habitualmente en el estadio de blastocisto (ver Figura 6).

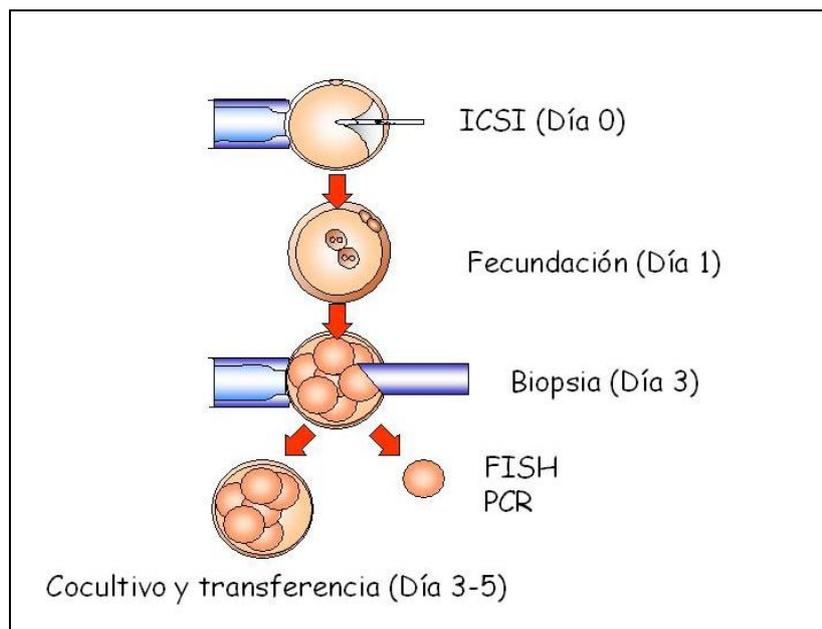


Figura 6. Representación gráfica de un ciclo sometido a PGS.

El PGS se desarrolló, inicialmente, como una opción para concebir recién nacidos sanos en parejas con alteraciones genéticas o enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales. La técnica parece tan lógica y atractiva que, una vez que su plausibilidad técnica fue demostrada (Munné *et al.*, 1993), su eficacia fue asumida y aceptada de forma generalizada. Por ello, su aplicación se extendió a parejas sin problemas genéticos o cromosómicos, pero con riesgo

aumentado de producir embriones con alteraciones en el número de los cromosomas. Es lo que se denomina *screening* de aneuploidías.

El empleo del PGS se asoció con mejores tasas de implantación y menores tasas de aborto (Gianaroli *et al.*, 1999; Munné *et al.*, 2003; Munné *et al.*, 2006a), lo cual propició una gran extensión de la técnica. Además, la transferencia de un menor número de embriones reduce la incidencia de embarazos múltiples. La aplicación clínica del PGS abarca diversas indicaciones. Por un lado tenemos pacientes con abortos de repetición, en los que nos puede ayudar a seleccionar embriones euploides de un pool embrionario con una incidencia aumentada de alteraciones cromosómicas. Algo similar sucede en parejas con fallo de implantación, edad materna avanzada o factor masculino severo, donde son esperables un aumento de aneuploidías. (Vidal *et al.*, 1998; Pellicer *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2003; Pehlivan *et al.*, 2003, 10; Munné *et al.*, 2003).

No obstante, en los últimos años ha ido aumentando una importante controversia en torno a la exactitud diagnóstica y a la eficacia clínica de esta técnica. Para su realización existen tres procesos clave: la realización de la biopsia embrionaria, la fijación del núcleo y el análisis mediante FISH. En la parte de biopsia y fijación, si la técnica no se realiza por profesionales expertos, sus beneficios pueden verse enmascarados por el daño realizado al embrión. (Rubio *et al.*, 2009; Munné *et al.*, 2010). En lo referente al diagnóstico cromosómico mediante FISH, la eficiencia de hibridación de las sondas utilizadas para FISH conviene conocer que no es del 100%, lo que implica que algunos de los embriones analizados sean calificados como no informativos para algunos de los cromosomas analizados y, por lo tanto, no puedan ser seleccionados para la transferencia (Manor *et al.*, 1996; Manor *et al.*, 1998). En este sentido, cabe destacar la importancia de una ronda adicional de hibridación con sondas teloméricas con el fin de reducir el número de embriones calificados de no informativos (Mir *et al.*, 2010; Uher *et al.*, 2009)

Además, los resultados de un ciclo de PGS también van a estar influenciados por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Para ello es necesario que como resultado de la estimulación ovárica se obtengan un número mínimo de oocitos. Vandervorst y colaboradores aconsejan cancelar aquellos ciclos en los que se espere obtener menos de 6 oocitos, ya que las expectativas de transferencia y embarazo se reducen considerablemente (Vandervorst *et al.*, 1998). Actualmente, con la posibilidad de vitrificar oocitos y acumularlos durante ciclos sucesivos, estas limitaciones deben ser reevaluadas. De hecho, en un reciente trabajo se concluye que si somos capaces de acumular un número mayor a 6 oocitos en

pacientes susceptibles de someterse a PGS por edad materna avanzada, duplicamos, al menos, las posibilidades de obtener gestación (Milán *et al.*, 2010)

Otra limitación hace referencia al número máximo de cromosomas que es posible analizar en una única célula y en este sentido se están valorando otras posibilidades, como la hibridación genómica comparada (CGH), y más recientemente los *arrays* de CGH, que permitirían el análisis del complemento cromosómico de una célula en su totalidad (Wilton *et al.*, 2001)

Por último, hay que tener en cuenta la existencia de mosaicismo en embriones humanos desde el estadio de dos células. La incidencia de mosaicismo y su repercusión en un posible error de diagnóstico ha sido muy discutida. Munné y colaboradores (Munné *et al.*, 1995) encontraron que el 39,6% de embriones bloqueados y el 25,2% de embriones fragmentados y/o con desarrollo lento presentaban mosaicismo, pero este porcentaje bajaba a 14,1% en embriones con buena evolución. Además, estudios recientes en los que se han analizado los embriones en su quinto día de desarrollo han confirmado el diagnóstico obtenido con una única célula en día 3 en un 95% de los casos (Mir *et al.*, 2010).

1.4 RELACIÓN ENTRE MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y ANEUPLOIDÍAS

El laboratorio supone una parte crucial para el éxito de las TRA. Durante la corta vida de la especialidad se han producido avances en cuanto a los medios de cultivo, las técnicas empleadas para la fecundación ovocitaria (ICSI), la posibilidad de realizar un diagnóstico genético preimplantacional o las técnicas de criopreservación. Sin embargo, la evaluación morfológica por parte del embriólogo mediante la ayuda del microscopio invertido (Gardner *et al.*, 2000) sigue siendo el método de elección para seleccionar los embriones candidatos a ser transferidos. Este método tiene la ventaja de ser no invasivo pero, por el contrario, es altamente subjetivo, requiere experiencia y existe poca estandarización.

Los parámetros a tener en cuenta son, principalmente, número de células, grado y tipo de fragmentación, simetría y multinucleación. Si nos referimos al estadio de blastocisto entonces tendremos en cuenta el número de células y la morfología de la masa celular interna (IMC), el trofoectodermo y el grado de expansión del blastocelo (Rienzi *et al.*, 2005). Adicionalmente se tienen en cuenta otros parámetros como la morfología ovocitaria (Balaban and Urman, 2006), el patrón pronuclear (Tesarik and Greco, 1999; Nagy *et al.*, 2003; Scott, 2003) y el desarrollo temprano (Sakkas *et al.*, 2001).

El desarrollo de las TRA ha permitido que las parejas que se someten a una FIV dispongan de un mayor número de embriones candidatos a ser transferidos. Una importante limitación de la técnica es la correcta elección de los embriones a transferir, de manera que los elegidos sean los que posean una mayor viabilidad y un mayor potencial de implantación. Sin embargo, la evaluación de los resultados muestra que uno de cada tres ciclos de FIV consigue embarazo y que menos de uno de cada cinco embriones implantan (SART, 2006; Kovalevsky and Patrizio, 2005). Estos datos nos dan una idea clara del escaso valor predictivo del análisis morfológico y explicarían la tendencia, en la mayoría de las ocasiones, a realizar una transferencia embrionaria múltiple.

Como hemos comentado previamente, un número importante de los embriones generados en tratamientos de FIV presentan una constitución cromosómica anómala (Munné *et al.*, 2007; Márquez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2003), y si seleccionamos parejas con mal pronóstico reproductivo, como las bajas respondedoras, mujeres de edad materna avanzada y pacientes con fallos de implantación previos, la aneuploidía se convierte en el hallazgo habitual. En referencia al desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto, sabemos que aproximadamente el 25% de los embriones aneuploides lo alcanzan, mientras que los

euploides lo hacen en un 62% (Rubio *et al.*, 2003). También se ha evaluado la evaluación de distintos tipos de alteraciones cromosómicas; así, un número muy bajo de embriones portadores de monosomías llegan a blastocisto mientras que, por el contrario, los portadores de trisomías alcanzan este estadio en un porcentaje importante. El estudio de los productos abortivos confirma estos hallazgos. (Sandalinas *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2003).

Con todas sus limitaciones, la morfología de los embriones humanos es un parámetro importante que puede resultarnos de ayuda a la hora de seleccionar embriones con menor probabilidad de poseer anomalías cromosómicas. Los embriones dismórficos, los de desarrollo lento y los bloqueados muestran significativamente más poliploidía y mosaicismo que los embriones con una morfología adecuada y un desarrollo normal (Munné *et al.*, 1995, 2004, 2006b; Gianaroli *et al.*, 1999; Márquez *et al.*, 2000).

La incidencia de mosaicismo y su repercusión en un posible error de diagnóstico ha sido muy discutida. Munné *et al.* encontraron que un 39,6% de embriones bloqueados y el 25,2% de embriones fragmentados y/o con desarrollo lento presentaban mosaicismo, pero este porcentaje bajaba a 14,1% en embriones con buena evolución. (Munné *et al.*, 2002). Estudios recientes (Santos *et al.*, 2010) postulan que el grado de mosaicismo desciende progresivamente a medida que avanza el desarrollo embrionario. Así nos encontramos con diferencias significativas entre los resultados obtenidos por FISH en embriones de día 4 frente a los de día 5 y día 8.

1.4.1 Parámetros morfológicos durante los tres primeros días de desarrollo embrionario

Los parámetros morfológicos más frecuentemente relacionados con la existencia de anomalías cromosómicas son:

A) Número de células y velocidad de desarrollo

El número de células óptimo en día 2 es cuatro y en día 3 es siete u ocho células. El número de células en día 3 de desarrollo proporciona información sobre la viabilidad del embrión. Algunos autores (Alikani *et al.*, 2000) relacionaron el número de células con la tasa de llegada a blastocisto y la morfología normal de los mismos. Y en consonancia con lo afirmado, tienen mayor tasa los embriones con 7-9 células, seguidos de los que tienen más de 9 y por último los de menos de 7 células.

El porcentaje de embriones anormales según el número de células en día 3 de desarrollo fue descrito por Magli *et al.* en 2001. Así los embriones de 7-9 células presentaban un 55% de anomalías frente al 75% de los de 4 células y el 79% de los de más de 9 células. En un estudio posterior del mismo grupo, se observó un mayor porcentaje de anomalías cromosómicas en embriones lentos o bloqueados respecto a los embriones que presentan 8 células a las 62 horas de la inseminación. (Magli *et al.*, 2007)

La velocidad de división normal es la de un embrión que dobla su número de células de día 2 a día 3, y es un pronóstico de viabilidad (Gerris *et al.*, 1999). En embriones humanos, los embriones bloqueados (aquellos que no incrementan el número de blastómeras tras 24 horas) presentan más anomalías que los que no lo están (Munné *et al.*, 1995). Parece que algunas alteraciones como la poliploidía, la haploidía y el mosaicismo caótico son más comunes en los embriones bloqueados o con desarrollo lento.

Otros estudios sostienen que el único y más fiable indicador de la viabilidad embrionaria es la morfología en día 5 y no en día 3. (Racowsky *et al.*, 2003).

B) Tamaño celular y simetría

En el embrión normal la forma de los blastómeros va variando desde la esfera inicial del cigoto a los elipsoides del estadio de 8 células. Se considera normal que los blastómeros tengan tamaño similar en los embriones con número par de células. Así pues, en un embrión con 3 células en un segundo día de desarrollo embrionario existen dos posibilidades completamente contrapuestas: o bien hemos sorprendido al embrión antes de la segunda división de la blastómera mayor, o finalmente, esta blastómera se encuentra bloqueada y ya no volverá a dividirse. La observación del embrión nos resolverá la duda.

Una vez producida la segunda división, nos encontramos frecuentemente con asimetrías en las blastómeras que corresponden a distribuciones diferentes del citoplasma. Existen diferentes clasificaciones de la simetría pero, en general, los embriones se pueden considerar subóptimos cuando la asimetría es mayor del 20% (Hardarson *et al.*, 2001).

Los embriones que presentan blastómeros asimétricos son menos viables que los que presentan simetría. Sin embargo, los embriones con 8 células en día 3 pero asimétricos que alcanzan el estadio de blastocisto no ven afectado su potencial de implantación (Racowsky *et al.*, 2003). Los embriones con asimetría presentan mayor incidencia de anomalías post-

meióticas (mosacismo, poliploidía y haploidía) que los simétricos. Además, tienen menor tasa de euploides y similar tasa de aneuploidías (Magli *et al.*, 2007).

c) Fragmentación.

Se desconoce con exactitud cuál es la causa de la fragmentación, pero se supone que debe ser un mecanismo de defensa del embrión para librarse de componentes citoplásmicos dañinos o para mantener cierta relación citoplasma-núcleo. La mayoría de los fragmentos se forman durante la mitosis de las dos primeras divisiones celulares. Los embriones con fragmentación mayor al 15% tienen tasas menores de llegada a blastocisto e implantación que aquellos con menos del 15% (Alikani *et al.*, 2000). La tasa de implantación en embriones de día 3 disminuye a medida que aumenta la fragmentación (Racowsky *et al.*, 2003), si bien, la fragmentación no tiene efecto sobre la implantación una vez que los embriones de 8 células en día 3 alcanzan el estadio de blastocisto.

Las anomalías cromosómicas aumentan desde el 50-60% en embriones no fragmentados hasta el 70-90% en embriones con fragmentación >35% (Munné and Cohen, 1998; Magli *et al.*, 2001). El mosaicismo, la haploidía y la poliploidía aumentan significativamente en particular cuando la fragmentación es del 35% o más.

La clasificación empleada para evaluar los tipos de fragmentación evalúa el tamaño y la distribución de los fragmentos, distinguiendo cuatro tipos; tipo I, fragmentación mínima (suele ser menor del 5%), con uno o dos fragmentos pequeños y muy localizados; tipo II, se encuentran fragmentos pequeños y localizados en una zona determinada y limitada del embrión; tipo III, fragmentos pequeños y dispersos por todo el embrión más o menos homogéneamente; tipo IV, se observan fragmentos grandes, independientemente de su distribución (se suele correlacionar con la degeneración embrionaria).

No parece que exista una correlación obvia entre las anomalías cromosómicas y el tipo de fragmentación pero los últimos hallazgos referentes a la implicación del citoesqueleto en la fragmentación de los embriones de ratón (Alikani *et al.*, 2005) hacen que sea necesaria una revisión sobre el tema. Así otros autores (Magli *et al.*, 2007) encuentran relación entre la fragmentación y su tipo respecto a las anomalías cromosómicas y la viabilidad del embrión. Además, concluyen que siempre es mejor la transferencia de un embrión con 8 células en día 3, independientemente del grado de fragmentación, especialmente si los fragmentos están concentrados en un área del espacio perivitelino.

D) Patrón pronuclear.

Los cigotos con buen patrón pronuclear (aquel con halo positivo, pronúcleos alineados y un número similar de nucléolos polarizados) muestran mayor potencial de implantación y menor tasa de anomalías cromosómicas en los embriones de día 3 (Gámiz *et al.*, 2003). Los patrones anormales están correlacionados con una mayor tasa de bloqueo de los embriones durante el desarrollo, y en aquellos que no se bloquean las posibilidades de alcanzar el estadio de blastocisto son menores (Balaban *et al.*, 2001). Otros estudios muestran que cigotos con pronúcleos de distinto tamaño presentan mayor incidencia de bloqueo en día 3, mayor tasa de mosaicismo (Munné and Cohen, 1998) y menor potencial de desarrollo (Scott, 2003). Así pues, los cigotos con mejor morfología pronuclear dan lugar a un mayor número de embriones euploides y a una mayor tasa de implantación (Gianaroli *et al.*, 2007).

E) Multinucleación

Este fenómeno puede deberse a una división nuclear sin la correspondiente división celular, a la fragmentación del núcleo o a una migración incorrecta de los cromosomas durante la anafase. La multinucleación (MN) puede ocurrir en cualquier momento del desarrollo embrionario, desde la primera división hasta la llegada a blastocisto. Los distintos protocolos de estimulación (dosis de FSH inicial, duración, respuesta ovárica...) así como las condiciones de cultivo pueden influir en la MN (Munné *et al.*, 1997). También pueden incrementar la MN la edad materna, la inmadurez citoplasmática o alteraciones en los espermatozoides

Los embriones con uno o más blastómeros multinucleados en día 2 o día 3 llegan a blastocisto con menor probabilidad que los no multinucleados (Alikani *et al.*, 2000) y poseen menor potencial de implantación (Munné *et al.*, 2003). En cuanto al tipo de MN, los embriones con blastómeros binucleados tienen mayor tasa de gestación que los que presentan blastómeros multinucleados (Meriano *et al.*, 2004; Munné *et al.*, 2003). La probabilidad de aborto también se ve incrementada hasta seis veces en ciclos con embriones multinucleados (Jackson, 1998).

El porcentaje de embriones multinucleados anormales es del 75% en día 2 y del 73% en día 3 (Magli *et al.*, 2001; Munné *et al.*, 2003).

1.4.2 Anomalías en el blastocisto

Algunos autores han propuesto el cultivo prolongado hasta blastocisto como una herramienta para seleccionar embriones con buena morfología y un alto potencial de implantación. Esperar hasta estadios avanzados para realizar la transferencia (día 5 o 6) puede ayudar a excluir ciertas anomalías (Janny and Menezo, 1996; Shapiro *et al.*, 2002), aunque esta estrategia podría ser útil sólo en pacientes donde la incidencia de anomalías cromosómicas esperada sea baja (Magli *et al.*, 2000).

Sin embargo, no debemos pensar que todos los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto son normales. Diversos autores han encontrado alteraciones cromosómicas en blastocistos no seleccionados para la transferencia (Sandalinas *et al.* 2001, Márquez *et al.*, 2000; Bielanska *et al.*, 2002a, 2005). Magli *et al.* (2000) cifraron en un 22% los embriones anormales que llegan a blastocisto frente al 34% de embriones euploides que lo hace. Teniendo en cuenta los datos del estudio de Rubio *et al.*, (2007), la tasa de llegada a blastocisto es del 66% en euploides, 37% en las trisomías, 9% en las monosomías, 21% en las poliploidías, 0% en los haploides y 13% para los mosaicos diploides.

Las monosomías X y 21 se encuentran en el estadio de blastocisto y son compatibles con desarrollos del primer trimestre, concordando estos datos con los que se tienen de los abortos de repetición (Rubio *et al.*, 2003). Las trisomías 15, 16 y 22 son incompatibles con la vida. Un pequeño porcentaje de trisomías 13, 18 y 21 llegan a término, aunque la mayoría acaban en aborto durante el primer o el segundo trimestre de gestación. La mayoría de las trisomías de los cromosomas sexuales llegan a término (Jacobs and Hassold, 1995).

Al revisar la correlación entre morfología y aneuploidía teniendo en cuenta el grado de expansión y la existencia o no de *hatching* del blastocisto, la masa celular interna y el trofoectodermo se observa la existencia de una correlación que, desgraciadamente, no es lo suficientemente fuerte como para suponer un método fiable de selección embrionaria. (Alfarawati *et al.*, 2011)

Como conclusión de este apartado, podemos afirmar que la selección embrionaria basándonos en la morfología es una herramienta útil para conseguir mejores tasas de implantación y gestación. Parece claro que un buen embrión es el que procede de un cigoto con dos pronúcleos y buen patrón, que en su desarrollo presenta 4 células en día 2 y 8 células en día 3, que no posee fragmentación o ésta es menor del 15%, que muestra simetría celular y

que no tiene multinucleación. La técnica de cultivo prolongado nos permite obtener blastocistos con mayor potencial de implantación, pero que no quedan exentos de poder presentar algún tipo de anomalía cromosómica.

1.5 EFECTOS ADVERSOS DE LA EOC

En los últimos años se ha suscitado un intenso debate sobre los riesgos de las TRA y, en concreto, sobre los tratamientos de FIV. Se ha cuestionado sobre todo el efecto adverso de la superovulación ovárica, no sólo por el riesgo de desarrollar el temido síndrome de hiperestimulación ovárica y su consiguiente riesgo para la salud de la paciente, sino también por los posibles efectos negativos que podría tener la elevación de 17β -estradiol (E2) a nivel de receptividad endometrial y calidad ovocitaria/embrionaria (Forman *et al.*, 1988; Pellicer *et al.*, 1996; Gelety *et al.*, 1995; Simón *et al.*, 1995).

En mujeres sometidas a tratamientos de FIV con una alta respuesta a la estimulación ovárica se ha descrito un incremento en el porcentaje de oocitos diploides (Tarín and Pellicer 1990). Cuando la respuesta a la estimulación ovárica es tan elevada que incluso se produce el síndrome de hiperestimulación ovárica, se ha observado que aumenta el riesgo de abortos (38-40%) y de embarazos bioquímicos y se ha sugerido que los altos niveles de E2 observados podrían afectar a la calidad genética de los oocitos obtenidos (Nasseri *et al.*, 1999; Raziell *et al.*, 2002; Bahceci *et al.*, 2006). De modo opuesto, en mujeres sometidas a FIV en las que se observa un envejecimiento ovárico y escasa respuesta a la estimulación ovárica también se asocia un aumento en la incidencia de aneuploidías, como sugieren múltiples estudios, unos de forma directa (Gianaroli *et al.*, 2000), y otros con asociaciones más sutiles, como por ejemplo cuando Nasseri *et al.* postulan niveles elevados de hormona folículo estimulante (FSH) y de E2 en el día 3 del ciclo como predictores de anomalía cromosómica fetal (Nasseri *et al.*, 1999). Estas situaciones antagónicas introducen la idea de que el funcionamiento del ovario es óptimo cuando no se sobrepasan determinados límites, concepto que ha dado lugar al desarrollo de protocolos de estimulación más suaves, como posteriormente veremos, con el fin de evitar respuestas extremas y optimizar resultados. En cualquier caso, cabe recordar la elevada tasa de alteraciones cromosómicas que caben esperar incluso en donantes tras ser sometidas a EOC, con tasas de alteraciones cromosómicas que varían del 42 al 57% (ver Tabla 1).

	Nº donantes	Nº oocitos	Embriones cromosómicamente anormales
Ziebe et al. (2003)	143	144	45%
Reis Soares et al. (2003)	15	108	56,5%
Nelson et al. (2005)	22	289	42%
Munné et al. (2006)	114	1775	57%
Keskintepe et al. (2007)	11	57	56%

Tabla 1. Tasa de alteraciones cromosómicas en donantes.

A nivel uterino, la realidad es que, en la actualidad, tras más de 50 años de empleo de gonadotropinas, seguimos sin conocer cuáles son los pasos exactos que permiten que se produzca la implantación embrionaria y cuál es el rol exacto que juegan distintos niveles de esteroides sexuales. Por ello, resulta complicado conocer si existen niveles estrogénicos insuficientes o deletéreos durante los ciclos de FIV y cuáles son dichos límites. Para intentar iluminar este aspecto, Mitwally *et al.* (2006) realizaron un estudio que muestra que los ciclos asociados a niveles excesivamente altos o excesivamente bajos de E2 dan como resultado tasas de gestación menores que las de las pacientes en las que se alcanzan niveles intermedio-moderados de E2. Estos autores asociaron los malos resultados obtenidos en pacientes con niveles bajos de E2 a la mayor edad de estas mujeres, mientras que los casos con E2 elevado se asociaron a mujeres jóvenes con alta respuesta, incluso con protocolos de estimulación suaves, como sucede en mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Parece obvio que niveles bajos de E2 se asociarán con un menor número de oocitos obtenidos y mal pronóstico (a no ser que sea debido al empleo de algún tipo de medicación adicional con efecto antiestrogénico como por ejemplo, inhibidores de la aromatasa). Menos claro queda el efecto de niveles especialmente elevados de E2, en los que la literatura es contradictoria y, aunque parece existir un efecto nocivo sobre la implantación endometrial (Simón *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2001), algunos autores proponen que éste podría llegar a ser contrarrestado por la elevada cohorte ovocitaria obtenida (Chenette *et al.*, 1990; Sharara and McClamrock, 1999). En cualquier caso, el principal mecanismo propuesto para justificar una disminución de la receptividad endometrial durante una estimulación ovárica es un aumento a la sensibilidad de

la acción de la progesterona que provocaría una aparición precoz de la fase secretora endometrial disminuyendo la ventana de implantación embrionaria (Jacobs *et al.*, 1987).

Conocemos que el desarrollo folicular posterior al estadio pre-antral es dependiente del estímulo de las gonadotropinas y se asocia con un aumento en la producción de estrógenos, principalmente de E2, que alcanza su pico máximo en el estadio preovulatorio, momento en el cual el oocito adquiere su competencia meiótica. Las acciones de los estrógenos en el ovario incluyen la formación de uniones gap, crecimiento, proliferación e inhibición de la apoptosis de células de la granulosa, actividad aromataza, expresión del receptor de la hormona luteinizante, etc. La mayor parte de la información de que disponemos sobre los efectos del E2 durante estos estadios del desarrollo folicular procede de experimentos *in vivo* e *in vitro* en diferentes modelos animales. Diversos ensayos realizados en ratas han demostrado el efecto deletéreo de la estimulación con gonadotropinas sobre la calidad ovocitaria de forma dosis-dependiente. Ertzeid *et al.* describieron una disminución de la capacidad de implantación y de la calidad embrionaria, así como una alteración del desarrollo fetal y embrionario en ratas (1992). Se ha demostrado que la estimulación ovárica produce alteraciones en el huso meiótico (Van Blerkom *et al.*, 2001) y alteraciones en la distribución de los microfilamentos (Lee *et al.*, 2005) y por lo tanto, en la consecución de una meiosis sin errores. En oocitos bovinos se ha mostrado un efecto tóxico en su maduración *in vitro* con dosis elevadas de E2, dando lugar a alteraciones en la formación del huso meiótico y en la segregación de los cromosomas durante la meiosis (Beker-van Woudenberg *et al.*, 2004). El cultivo de embriones de ratón con dosis crecientes de E2 mostró un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario, con niveles decrecientes de blastocistos y de adhesión embrionaria, (Valbuena *et al.*, 2001). También se ha observado un aumento de aneuploidías en la maduración de oocitos de ratón "in vitro" con elevadas concentraciones de FSH. Con todo ello, podemos afirmar que el microambiente hormonal que rodea tanto al oocito como al folículo durante su crecimiento y maduración, modularía el correcto ensamblaje de los microtúbulos del huso meiótico y permitiría la correcta alineación y segregación de los cromosomas durante las diferentes divisiones meióticas.

El estudio de la influencia de la respuesta a la estimulación ovárica sobre la dotación cromosómica embrionaria mediante el empleo del PGS ha sido objeto de diversos estudios. Para aislar dicho efecto de otros posibles factores de confusión se escogió como modelo un programa de donación de óvulos, en los cuales las donantes son mujeres jóvenes y sin problemas de fertilidad. En el estudio de Reis-Soares *et al.* (2003) se comparan los resultados

de la EOC entre donantes altas respondedoras y parejas menores de 35 años en las que se realizó PGS para el estudio de enfermedades ligadas al sexo. La respuesta en donantes permite la obtención de mayor número de embriones con menor dosis de gonadotropinas y, sorprendentemente, el número de alteraciones cromosómicas en los embriones fue también mayor. Posteriormente, Munné *et al.* (2006c) confirmaron con un diseño ampliado los datos de este estudio asociando el aumento de la cohorte ovocitaria por estimulación con el aumento en la incidencia de gonadotropinas. En otro trabajo realizado en mujeres infértiles (Baart *et al.*, 2007), se valoró el efecto de dos protocolos diferentes de estimulación ovárica (estándar y suave o *mild*) en la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones preimplantatorios. Este trabajo observó una menor incidencia de aneuploidías cuando se utilizó el protocolo de estimulación más suave. El objetivo fue emplear dosis menores de gonadotropinas con la intención de obtener un menor número de oocitos y niveles más controlados de E2. Estos autores concluyeron que el rendimiento del ciclo era similar con ambos protocolos de estimulación, ya que el número de blastocistos euploides obtenidos con ambas pautas fue el mismo, de modo que con un protocolo suave de estimulación, aunque el número de oocitos recuperados era menor, no se disminuía el rendimiento del ciclo y sí se reducía el riesgo de desarrollar síndrome de hiperestimulación ovárica. Finalmente, en el trabajo de Haaf *et al.* (2009) se observa un aumento de la tasa de aneuploidía mediante FISH del corpúsculo polar con el aumento en el número de oocitos obtenidos tras EOC en mujeres menores de 40 años sometidas a un primer ciclo de FIV-ICSI.

En consonancia con estos hallazgos, como veremos posteriormente de forma más detallada, en los últimos años se han desarrollado, especialmente en el norte de Europa, protocolos más suaves de estimulación ovárica, e incluso hay autores que están valorando la posibilidad de aprovechar los ciclos naturales con la idea de reducir los riesgos asociados a la FIV (Nargund *et al.*, 2001; Pelinck *et al.*, 2005). En 2004, Ziebe *et al.* compararon la calidad embrionaria en ciclos naturales y ciclos estimulados en una misma paciente y no se encontraron diferencias en los patrones de morfología y desarrollo embrionarios. La evaluación de la calidad embrionaria no se realizó a nivel cromosómico, algo que sí realizó Verpoest *et al.* en 2008 (Verpoest *et al.*, 2008), mostrando que las alteraciones cromosómicas están presentes en pacientes jóvenes incluso en ausencia de estimulación ovárica.

Al explicar los efectos adversos de la EOC, cabe mencionar el riesgo epigenético asociado a las TRA. En los organismos pluricelulares todas las células tienen la misma información genética. Sin embargo, existen diferentes tipos celulares que tienen morfología y funciones

diferentes, por ejemplo, las neuronas son responsables de enviar señales para coordinar el organismo, las células musculares son responsables del movimiento de dicho organismo, etc. Estas diferencias de función y de morfología se deben a que cada tipo celular tiene un contenido concreto en transcritos de ARN y de proteínas, que se consigue a través de la regulación de la expresión de los diferentes genes. Estos mecanismos de regulación de la expresión génica se transmiten meiótica y mitóticamente (de una generación a otra y en las células de un mismo individuo) sin que ocurra un cambio en la secuencia fundamental de bases del ADN. Estos son los denominados mecanismos epigenéticos que no se rigen por las leyes de Mendel.

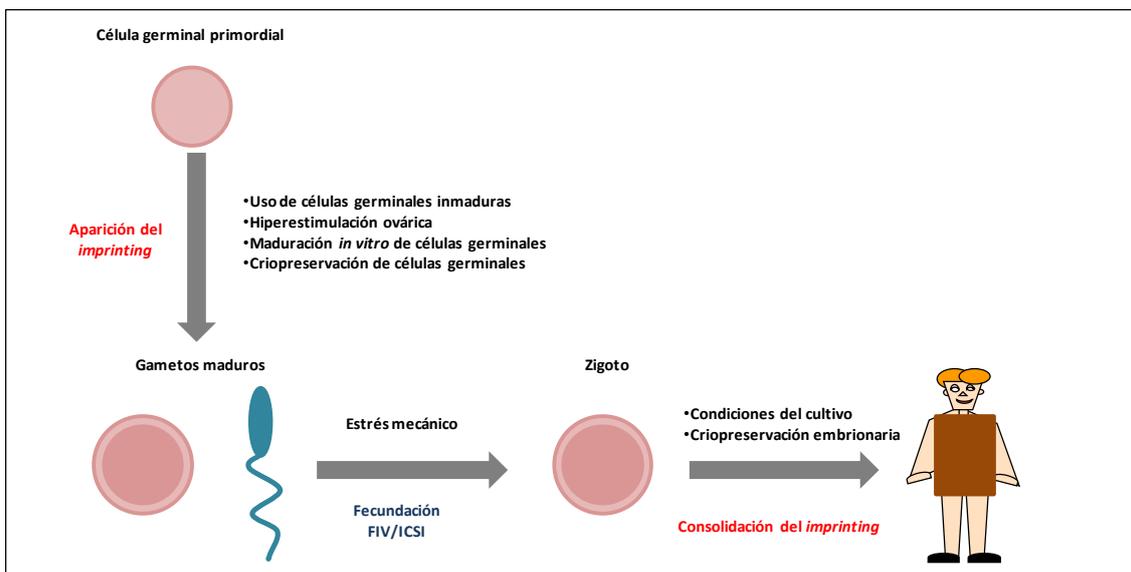


Figura 7. Aparición y consolidación del *imprinting*

El *imprinting* genómico es una forma epigenética de regulación génica que implica la expresión monoalélica de uno de los alelos de un gen dependiendo del origen parental de dichos alelos. O dicho de otro modo, tenemos dos copias de cada gen autosómico que, generalmente, se expresan de forma simultánea de ambos alelos; sin embargo, existe un pequeño subgrupo de genes, cuyos alelos paternos o maternos son silenciados (Manipalviratn *et al.*, 2009). El establecimiento y el mantenimiento del *imprinting* se produce durante la gametogénesis y los primeros estadios del desarrollo embrionario, justo el momento en el que actúan las TRA. Ello llevó a suponer que estas técnicas podrían interferir en el correcto establecimiento y mantenimiento del *imprinting* (ver Figura 7) y que, el hecho de utilizar células germinales inmaduras, la maduración *in vitro* de células germinales, la estimulación ovárica y la criopreservación de estas células, podría interferir en el establecimiento del *imprinting*. El mantenimiento del *imprinting* podría estar afectado por las condiciones de

cultivo y la criopreservación de embriones. Se precisan más estudios sobre cómo pueden afectar las TRA en los errores del *imprinting* y en el desarrollo embrionario. En cualquier caso, cabe recordar que la incidencia absoluta de alteraciones del imprinting es pequeña (<1/12.000 recién nacidos) (Manipalviratn *et al.*, 2009).

1.6 EL DESARROLLO DE LOS PROTOCOLOS SUAVES O *MILD*

La FIV es un método con una efectividad consolidada para el tratamiento de la infertilidad. El aumento de las tasas de gestación ha hecho dirigir nuestra mirada a los posibles efectos indeseables. La FIV supone la inyección diaria de medicación, ecografías, analíticas periódicas, el paso por quirófano para la extracción ovocitaria, visitas frecuentes al centro médico... Todo ello puede condicionar la aparición de distrés emocional en los pacientes. Los protocolos tradicionales son caros, complejos y están asociados a la posibilidad de aparición de efectos secundarios. Además, el empleo de agonistas de la GnRH puede provocar síntomas de ansiedad, depresión y cefaleas (de Klerk *et al.*, 2006), a pesar de lo cual, continúa siendo el protocolo más frecuentemente empleado (Macklon *et al.*, 2006). El concepto de *mild stimulation* o estimulación suave fue introducido por Edwards *et al.* en 1996. Su utilización intenta disminuir el coste de la medicación empleada, la posibilidad de aparición de complicaciones (especialmente el síndrome de hiperestimulación ovárica) y las molestias asociadas al tratamiento, sin producir una afectación de las tasas de gestación (Fauser *et al.*, 1999).

Se plantean fundamentalmente en protocolos con antagonistas, los cuales previenen el pico prematuro de la LH mediante un bloqueo competitivo del receptor de la GnRH. A diferencia de los agonistas, los antagonistas no provocan un aumento inicial de la liberación de gonadotrofinas endógenas, sino que consiguen un bloqueo inmediato y reversible de la función gonadotropa. El inicio de la medicación se empieza más tarde que en los protocolos tradicionales con el fin de aprovechar la elevación fisiológica de la FSH endógena que se produce entre los ciclos hormonales ováricos. Esta elevación de la FSH producirá el reclutamiento folicular inicial y el inicio de la administración de las gonadotrofinas se demorará hasta el día 5 del ciclo, permitiéndose así, un empleo de una dosis menor de FSH exógena y una menor duración del tratamiento (De Jong *et al.*, 2000; Heijnen *et al.*, 2007). Esta estrategia nos permite actuar en el momento en el que la FSH endógena empieza a disminuir sus niveles, no afectándose el reclutamiento y la selección fisiológica iniciales, y permitiendo el desarrollo de múltiples folículos dominantes. Por el contrario, en los protocolos convencionales largos que emplean la desensibilización hipofisaria con agonistas de la GnRH, el reclutamiento y selección folicular naturales desaparecen por completo, permitiendo el crecimiento de folículos en muy diferentes estadios de desarrollo.

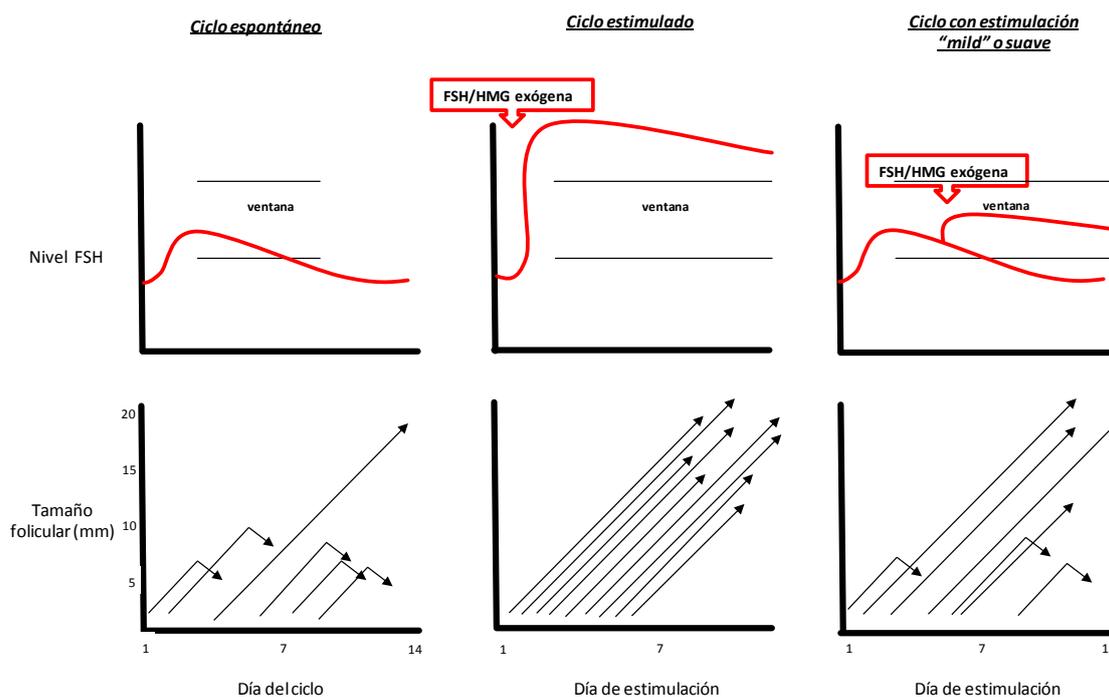


Figura 8. Representación gráfica de los niveles de FSH y su correspondiente desarrollo folicular durante un ciclo espontáneo, un ciclo estimulado y un ciclo con estimulación *mild*.

Este tipo de protocolos se basan en el concepto de "ventana de la FSH". La atresia del cuerpo lúteo en la fase lútea tardía provoca una marcada caída de los niveles de estrógenos, inhibina A y progesterona que, desencadenan un aumento de la secreción pulsátil de GnRH y esta, a su vez, provoca el aumento de la secreción de FSH. Cuando los niveles de FSH alcanzan un determinado nivel se produce el reclutamiento del *pool* de folículos que crecerá en ese ciclo (Hodgen, 1982; Gougeon and Testart, 1990). Posteriormente, en la fase folicular inicial, se produce un aumento de la producción estrogénica secundario a la acción de la FSH sobre la actividad aromatasa de las células de la granulosa. Este mecanismo desencadena un efecto de *feed-back* negativo que pone fin a la elevación de los niveles de FSH. Como consecuencia, el folículo con mayor sensibilidad para la FSH se convierte en el dominante y continúa su desarrollo, mientras que el resto van a la atresia debido a su menor sensibilidad a la FSH, su menor capacidad de síntesis estrogénica y la mayor concentración de andrógenos ováricos (Van Stanbrink *et al.*, 1995). Sobre estos conocimientos de la fisiopatología del eje hipotálamo-hipófisis-ovario se ha establecido el concepto de "ventana de la FSH" en el que se ha ensalzado la importancia de la duración del periodo por encima de la importancia del nivel máximo de FSH alcanzado. Así, si administramos 375 UI de FSH en la fase folicular inicial crecerán folículos pequeños en los días siguientes pero no afectaremos el desarrollo del folículo dominante. Por el contrario, si damos 75 UI de FSH pero durante 5 días se desarrollan múltiples folículos dominantes (Schipper *et al.*, 1998). Además de la duración de la administración de la FSH, es

importante tener en cuenta el momento de inicio de su administración; si comparamos su administración en día 3, 5 y 7 de ciclo, observamos que empezando en día 3 o 5 obtenemos desarrollo folicular múltiple en el 70% de los pacientes, mientras que si lo hacemos en día 7, únicamente lo tendrán el 35% de los pacientes (Hohmann *et al.*, 2001). Es posible que aumentando la dosis de FSH en los pacientes que no han sido capaces de desarrollar un crecimiento folicular múltiple, seamos capaces de conseguir esta respuesta (Cédric-Durnein *et al.*, 2006). Estos conocimientos de la dinámica folicular nos permiten entender mejor los planteamientos que sustentan los protocolos suaves.

Los protocolos de estimulación ovárica convencionales han pretendido, de forma tradicional, aumentar el número de oocitos disponibles con el fin de compensar las ineficiencias del proceso de FIV. La obtención de un escaso número de oocitos se ha asociado con un peores resultados y con el envejecimiento del ovario (Beckers *et al.*, 2002). A pesar de la falta de consenso en cuanto a una definición de baja respuesta, lo cierto es que cuanto menor es el número de oocitos, menores son las tasas de éxito (Keay *et al.*, 1997). Sin embargo, esta misma baja respuesta tras la aplicación de protocolos *mild* o suaves no tiene el mismo significado, de hecho, se asocia con una probabilidad de gestación al menos igual. Esto ha llevado a postular que un bajo número de oocitos obtenidos tras una estimulación suave representa una respuesta fisiológica a una interferencia sutil en la selección del folículo dominante y no una manifestación asociada al envejecimiento ovárico (Hohmann *et al.*, 2003; Heijnen *et al.*, 2007).

Un análisis (Verberg *et al.*, 2007) de qué tipo de pacientes podría no obtener beneficio de estos planteamientos consiguió identificar 4 grupos: aquellos con mayor duración de su infertilidad, los que tienen ciclos cortos, los que poseen infertilidad secundaria y aquellos con elevado índice de masa corporal (IMC). Una mayor duración de la infertilidad supone fallos sutiles y, en muchas ocasiones no diagnosticados, que pueden ser obviados mediante el empleo de protocolos agresivos y que, por el contrario, se ponen de manifiesto con protocolos más suaves. Los ciclos cortos con respuesta ovárica insuficiente pueden ser consecuencia de un acortamiento de la fase folicular en pacientes en los que la selección del folículo dominante había sucedido con anterioridad a la administración de FSH exógena (Klein *et al.*, 2002). En estos casos ya no es posible rescatar a los folículos no dominantes. También es posible que el acortamiento de los ciclos sea una manifestación precoz de la disminución de la reserva y del envejecimiento ovárico. La asociación encontrada con la infertilidad secundaria parece deberse al escaso tamaño de la muestra analizada y no parece tener excesiva plausibilidad

biológica. La escasa respuesta ovárica y la necesidad de mayores dosis y duración del tratamiento en pacientes obesas es conocida (Dechaud *et al.*, 1998). Los grupos reseñados mejorarían sus resultados cambiando el inicio de la administración de FSH exógena desde el día 5 al día 2 de ciclo.

En este tipo de protocolos se intentó establecer, en primer lugar, cual era la dosis mínima eficaz y, al comparar dosis de 100 UI con dosis de 150 UI de FSH, se concluyó que esta última dosis conseguía con mayor efectividad el desarrollo folicular múltiple (de Jong *et al.*, 2000). En un estudio prospectivo randomizado posterior con 142 pacientes se comparó la eficacia de un protocolo suave (inicio de 150 UI de FSH en día 5 del ciclo y empleo de antagonistas) con la de un protocolo con antagonistas tradicional (inicio de 150 UI de FSH en día 2) y otro largo con la misma dosis de gonadotropinas diarias. Este estudio mostró tasas de gestación comparables en el grupo de estimulación suave con respecto al que empleó el protocolo largo, con una menor dosis total de medicación y menor duración del tratamiento (Hohmann *et al.*, 2003). Posteriormente, un nuevo estudio intentó unir el concepto de estimulación suave al de transferencia embrionaria de un solo embrión. Se incluyeron 404 pacientes y se vieron resultados al cabo de un año frente a una estimulación con protocolo largo y transferencia de dos embriones. Los resultados mostraron que la estimulación suave empleaba una menor cantidad de medicación a consecuencia de una menor duración del tratamiento. Además, se redujo el número de gestaciones gemelares y sus costes asociados sin afectar la posibilidad de recién nacidos vivos tras un año de tratamiento (Heijnen *et al.*, 2007). Finalmente, otro estudio trató de explicar los buenos resultados de esta estrategia mediante el empleo del PGS y obtuvo una proporción mayor estadísticamente significativa de embriones euploides en el protocolo de estimulación suave con 150 UI diarias de FSH que se empiezan a administrar en día 5 del ciclo en comparación con otro largo y 225 UI diarias de FSH (Baart *et al.*, 2007). Estudios de coste-efectividad de este tipo de planteamientos han mostrado su superioridad en dichos términos, pero su verdadera ventaja en términos económicos y de calidad de vida es la disminución de la gestaciones múltiples y su comorbilidad asociada (Polinder *et al.*, 2008).

Estudio	Diseño	Criterios de inclusión	Protocolo a estudio	Protocolo de comparación	Resultados
Hohman <i>et al.</i> (2003)	ECR unicéntrico. Nov 99- may 01	Ciclos regulares Edad 20-38 IMC 19-29 Ciclos FIV previos ≤ 3	150 UI de FSH empezando en d5; antagonista si folículo mayor alcanza 14 mm	1. 150 UI de FSH empezando en d2; antagonista si folículo mayor alcanza 14 mm 2. Protocolo largo con agonistas y 150 UI de FSH	Menor duración del ciclo y menor dosis de FSH. Mayor tasa de cancelación. Igual tasa de gestación entre los 3 grupos
Heijnen <i>et al.</i> (2007)	ECR bicéntrico. Feb 02- mar 04	Ciclos regulares Edad ≤ 38 IMC 18-28 Hijo previo tras FIV o no ciclos FIV previos	150 UI de FSH empezando en d5; antagonista si folículo mayor alcanza 14 mm. Combinado con transfer único	Protocolo largo con agonistas y 150 UI de FSH	Menor cantidad de gestaciones múltiples. Menor coste del tratamiento. Más ciclos por paciente. Igual tasa de gestación al cabo de 1 año de tratamiento.
Baart <i>et al.</i> (2007)	ECR bicéntrico. Dic 02-ago 05	Ciclos regulares Edad ≤ 38 IMC 19-29 Espermiograma > 5 mill/ml No ciclos FIV previos con transfer	150 UI de FSH empezando en d5; antagonista si folículo mayor alcanza 14 mm	Protocolo largo con agonistas y 225 UI de FSH	Menor número de oocitos y embriones Igual número de embriones euploides por ciclo. Menor proporción de mosaicismo embrionario

Tabla 2. Análisis de los estudios que han desarrollado la estimulación *mild* o suave.

Un reciente metaanálisis sobre este tipo de protocolos postula que el número óptimo de oocitos obtenidos en un ciclo de FIV dependerá del régimen de estimulación ovárica empleado. Por tanto, cabe recalcar que en estos protocolos suaves no debemos tener miedo a obtener un menor número de oocitos, ya que habremos conseguido seleccionar una cohorte homogénea de oocitos de buena calidad mediante dos mecanismos: la escasa interferencia con la selección folicular fisiológica y la minimización de la exposición de los folículos en crecimiento a los potenciales efectos negativos de las gonadotropinas exógenas en dosis elevadas (Verberg *et al.*, 2009a).

En la estimulación ovárica convencional el número óptimo de oocitos a obtener se sitúa entre 8 y 15 (Fauser *et al.*, 2010). Un número muy bajo de oocitos supone que el *pool* de folículos ováricos está disminuido a causa de un envejecimiento ovárico. Por tanto, si aumentamos el número de oocitos aumentamos la posibilidad de seleccionar el/los mejores embrion/es para ser transferidos. Sin embargo, por encima de un determinado punto las tasas de gestación se ven afectadas debido a los efectos deletéreos del desarrollo de un gran número de folículos, y sus niveles hormonales suprafisiológicos concomitantes, sobre la calidad ovocitaria y embrionaria (Simon *et al.*, 1995), así como sobre la receptividad

endometrial y la función del cuerpo lúteo (Devroey *et al.*, 2004; Tarlatzis *et al.*, 2006). Así pues, se ha mostrado una correlación negativa entre la dosis total de FSH empleada y las posibilidades de gestación (Strandell *et al.*, 2000). En este estudio se sugiere una asociación entre el envejecimiento ovárico y la dosis total de FSH empleada. En el caso de la estimulación suave estos efectos parecen presentarse cuando se obtienen más de 9 oocitos (Verberg *et al.*, 2009b). Esta hiperrespuesta ovárica en el grupo con estimulación suave y su menor tasa de gestación asociada, podrían ser consecuencia de la aparición de una elevación prematura de los niveles de LH. Su aparición, a consecuencia de niveles elevados de estradiol durante la estimulación ovárica inicial, tiene demostrados efectos negativos sobre la tasa de gestación evolutiva (Humaidan *et al.*, 2002).

Posibles inconvenientes de este tipo de protocolos son el aumento de las tasas de cancelación, la posible disminución del número de embriones disponibles para la transferencia, la no transferencia o la no existencia de embriones para su criopreservación. Cuando este tipo de planteamientos no consiguen gestación, los pacientes suelen preferir cambiarlo en futuros ciclos (Højgaard *et al.*, 2001). Además, los estudios que exploran estos planteamientos suelen centrarse en pacientes con buen pronóstico y, *a priori*, con menores posibilidades de aneuploidías, no siendo quizá extrapolables los resultados a pacientes con reserva ovárica comprometida.

La evidencia de los potenciales efectos negativos de la estimulación ovárica proviene tanto de la experimentación animal como en humanos. Dicho efecto nocivo puede ser consecuencia de una interferencia con la selección natural de oocitos de buena calidad o de la exposición de los folículos en crecimiento a los potenciales efectos deletéreos de la estimulación ovárica.

Tras la exposición a altas dosis de gonadotropinas durante la maduración *in vitro* de oocitos se ha comprobado la existencia de un mayor número de alteraciones morfológicas y cromosómicas (van Blerkom y Davis, 2001; Roberts *et al.*, 2005). También se ha comprobado la existencia de peores tasas de implantación en caso de elevados niveles de estradiol (Valbuena *et al.*, 1999). Se ha propuesto que la estimulación ovárica puede afectar a los mecanismos envueltos en mantener una adecuada segregación cromosómica (Munné *et al.*, 1997). Un reciente ensayo clínico randomizado, mencionado previamente, ha mostrado una proporción significativamente mayor de embriones euploides en el grupo con estimulación suave (63 vs 45%), lo que sugiere que los oocitos y embriones extra obtenidos son de peor calidad. La estimulación suave consiguió un menor número de oocitos y embriones estadísticamente

significativo, pero no hubo diferencias en el número de embriones cromosómicamente normales obtenidos por paciente (1,8). Además, la proporción de mosaicismo embrionario también se vio afectada en el caso de la estimulación convencional (65 vs 37%), lo cual sugiere que las anomalías en la constitución cromosómica se producen a consecuencia de errores en la segregación mitótica de los estadios embrionarios iniciales. (Baart *et al.*, 2007).

Tras producirse el reclutamiento folicular inicial y el crecimiento del *pool* de folículos, el oocito pasa de un diámetro de 35 a 120 μm . Su crecimiento y maduración se produce en relación con el del folículo, existiendo señales bidireccionales entre el oocito y las células de la granulosa (Eppig, 2001). Los oocitos deben de conseguir una madurez tanto en su núcleo como en el citoplasma para posteriormente ser capaces de permitir un adecuado desarrollo embrionario (Albertini *et al.*, 2003). Recientemente, la experimentación con ratones ha demostrado que alteraciones de las señales que regulan la foliculogénesis pueden alterar los estadios tardíos del crecimiento ovocitario, aumentando el riesgo de alteraciones en la segregación cromosómica de las posteriores divisiones meióticas (Hodges *et al.*, 2002). La inactivación de la subunidad proteica del complejo sinaptonémico meiótico (SYCP3) en un modelo murino reveló un aumento de errores de segregación en la primera división meiótica y, también, un aumento de errores en la segregación mitótica en las divisiones embrionarias iniciales (Yuan *et al.*, 2002; Lightfoot *et al.*, 2006). Estos hallazgos van en consonancia con el trabajo de Baart en el que el aumento de la proporción de embriones anormales parece deberse a un aumento de errores en la segregación mitótica, que conduce a mosaicismos embrionarios.

Recientemente, se han intentado exportar las bondades de los protocolos *mild* a otras formas de estimulación, como muestra el trabajo de Fernández-Shaw *et al.* en el que, tras realizar una EOC con protocolo largo, se consiguen resultados similares en cuanto a número de embriones óptimos para la transferencia y tasa de implantación con dosis de FSHr de 100 UI *versus* 150 UI. El trabajo persigue disminuir tanto los costes asociados a la medicación como los riesgos asociados a la transferencia de un mayor número de embriones, sin producir una afectación de la tasa de gestación.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las altas expectativas gracias a las bondades que las gonadotropinas parecían ofrecer se vieron parcialmente truncadas por la preocupación sobre el posible efecto deletéreo de las mismas sobre la calidad ovocitaria y embrionaria, no sólo desde el punto de vista morfológico y estructural sino también cromosómico. Se cree posible que las gonadotropinas afecten al proceso de segregación cromosómica durante la meiosis de una forma dosis dependiente (Baart *et al.*, 2007.; Tarín *et al.*, 1990) Esto puede explicar el por qué las tasas de éxito no son superiores en las TRA a pesar de los grandes avances tecnológicos disponibles hoy en día en los laboratorios de reproducción asistida. Es este punto en concreto el que ha llamado nuestra atención y ha permitido diseñar el presente trabajo con el fin de dilucidar si las dosis altas de gonadotropinas se asocian con una mayor incidencia de alteraciones cromosómicas.

Los estudios previos que han empleado el PGS para intentar dilucidar si una alta respuesta durante un ciclo FIV supone un aumento de aneuploidías muestran resultados contradictorios. Por ejemplo, Gianaroli *et al.* (2000) obtuvo una incidencia similar de embriones cromosómicamente anormales independientemente del tamaño de la cohorte ovocitaria obtenida, en pacientes que habían sido clasificadas como de mal pronóstico por edad materna avanzada o por fallos de implantación (3 o más ciclos FIV sin conseguir gestación). De modo opuesto, la biopsia del corpúsculo polar muestra un aumento en la incidencia de aneuploidías tras EOC en las mujeres menores de 40 años cuando su respuesta supone la obtención de más de 10 oocitos (Haaf *et al.*, 2009)

La tendencia actual es la realización de protocolos menos agresivos con el convencimiento de que las estimulaciones suaves o los ciclos naturales pueden ayudarnos a disminuir la incidencia de aneuploidías y minimizar los efectos indeseables asociados a la FIV tradicional. Estos protocolos no afectan los resultados en términos de tasas de gestación (Verberg *et al.*, 2009) y, además, podrían evitar la obtención de un *pool* embrionario adicional con escasas posibilidades de viabilidad; así parece deducirse del estudio de Baart *et al.* (2007) en el que muestra la existencia de una limitación en el número medio de embriones euploides que es posible obtener por cohorte ovocitaria y estimulación (dos), independientemente del número de oocitos obtenidos. Sin embargo, la realidad es que las alteraciones cromosómicas parecen intrínsecas al propio proceso de meiosis humano, como parece demostrar el hallazgo de un 36,4% de aneuploidías en ciclos no estimulados (Verpoest *et al.*, 2008) o la ausencia de

diferencias en la morfología embrionaria al comparar ciclos naturales con ciclos estimulados (Ziebe *et al.*, 2004)

Reis Soares *et al.* en 2003 describió una alta tasa de aneuploidías en donantes con alta respuesta que afectaba al 56,5% de sus embriones tras haber obtenido una media de 25,9 oocitos por punción. En el grupo de comparación, mujeres menores de 35 años en las que se realizaba PGS por enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales, se obtuvo una tasa de aneuploidías del 37,3% con una media de oocitos obtenida mucho menor (14,8). Munné *et al.* en 2006 confirmó cifras similares de aneuploidías en donantes (57%) comparables con las que existen en pacientes infértiles con un rango de edades similar. Finalmente, Keskinetepe *et al.* (2007) refiere cifras similares (56%). Todos estos resultados sugieren que el aumento en la tasa de alteraciones cromosómicas puede ir ligado al aumento en la respuesta a las gonadotropinas.

La alta respuesta a la estimulación ovárica determina la recuperación de un número elevado de oocitos que provienen de folículos en diferentes grados de desarrollo. Aunque de folículos de pequeños diámetros se pueden obtener oocitos con madurez nuclear, la hipótesis de que el incremento de la frecuencia de aneuploidías en pacientes con alta respuesta se deba a la inmadurez citoplasmática permite suponer que dichos oocitos maduros serían más propensos a dar lugar a oocitos con defectos en la formación del huso meiótico y en la alineación de los cromosomas en la placa meiótica y por tanto, dar lugar a embriones cromosómicamente anormales. La hipótesis de trabajo del presente proyecto es que una dosis mayor de gonadotropinas condicionará una mayor respuesta y la recuperación de un mayor número de óvulos que podrían dar origen a un mayor porcentaje de embriones cromosómicamente anormales. Independientemente de la dosis y la respuesta, creemos posible que el número final de embriones cromosómicamente normales disponibles para transferencia por ciclo de estimulación sea similar con ambas estrategias de estimulación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal:

Evaluar el efecto de la disminución de las dosis de gonadotropinas en la incidencia de alteraciones cromosómicas.

3.2 Objetivos secundarios:

1.- Evaluar el efecto de la disminución de las dosis de gonadotropinas en los niveles de estradiol y el número de oocitos obtenidos en donantes de óvulos jóvenes, con cariotipo normal, sin problemas de fertilidad y con una alta respuesta a la EOC.

2.- Valorar si la estimulación ovárica con protocolos más suaves, y la disminución en el nivel de estradiol en estos ciclos, tiene una repercusión directa en la calidad embrionaria en cuanto a la morfología y al desarrollo embrionario.

3.- Analizar y comparar la eficiencia total del ciclo de estimulación ovárica, comparando el número total de blastocistos cromosómicamente normales que se obtienen al final del ciclo con cada uno de los protocolos de estimulación utilizados, así como los resultados clínicos en términos de gestación evolutiva y recién nacidos vivos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO

Estudio prospectivo de cohortes en el que se realiza PGS en los embriones resultantes de dos regímenes de estimulación realizados de forma consecutiva sobre un total de 32 donantes: en el primer ciclo (dosis estándar), las donantes fueron estimuladas con un protocolo largo con 225 UI/día de FSHr y, en el segundo ciclo, las mismas donantes recibieron una dosis diaria de gonadotropinas un 30% menor (150 UI/día de FSHr). El intervalo entre ambos ciclos fue de al menos 3 meses. De las 22 pacientes que completaron ambos ciclos, el intervalo de tiempo entre ambos ciclos fue de 3 meses para 7 donantes, de 6 meses para 6 de ellas y de más de un año para el resto.

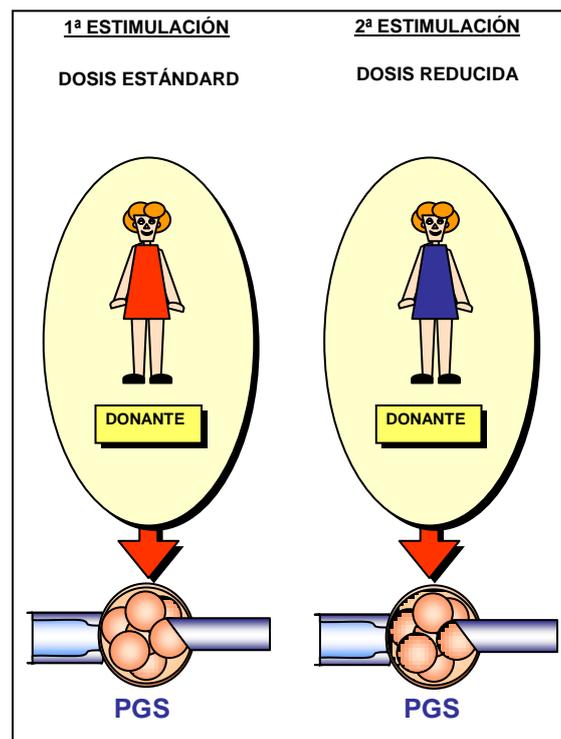


Figura 9. Diseño del estudio; cada donante será sometida a dos estimulaciones con distinta dosis. Los embriones serán sometidos a PGS

4.2 LUGARES DE EJECUCIÓN

Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad (IU-IVI). Valencia.

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Alicante.

Este estudio fue sometido a valoración por el comité ético del IU-IVI, Valencia, que concedió su aprobación para la realización del mismo (ver documentación adjunta en el apartado 8.1).

4.3 SUJETOS DE ESTUDIO:

4.3.1 Donantes de óvulos:

Se han incluido un total de 32 donantes de óvulos, sanas, con cariotipo normal, con edad entre 18 y 35 años, que realicen la donación de forma anónima y altruista, y que previamente hayan tenido una alta respuesta a un protocolo largo de estimulación ovárica (>20 oocitos y/o niveles de estradiol el día de la hCG >3000 pg/mL) sin que hayan desarrollado síndrome de hiperestimulación ovárica moderado o severo. Las mujeres deberán tener un índice de masa corporal (IMC) normal (18-25 Kg/m²) y ciclos menstruales de duración normal (26-34 días). Todas las mujeres deben cumplir los criterios de inclusión del programa de donación de oocitos del IVI, que incluye la realización de una exploración física general y ginecológica normales, ausencia de enfermedades hereditarias familiares, cariotipo normal, negatividad en el estudio del síndrome de X-frágil y ausencia de exposición previa a radiaciones, productos tóxicos o drogas intravenosas. No se podrá haber llevado medicación de efecto endocrino (incluyendo gonadotropinas o anticonceptivos orales) durante los 3 meses previos.

Se excluirá del estudio aquellas donantes con dos o más abortos espontáneos previos y/o con síndrome de ovario poliquístico definido por la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: hiperandrogenismo clínico o analítico (Testosterona mayor de 1,9 ng/mL), alteración menstrual tipo oligo-amenorreas y patrón ecográfico característico (12 o más folículos de 2-9 mm). Previo consentimiento informado (ver documentación adjunta en el apartado 8.2), estas donantes se someterán a dos ciclos consecutivos de estimulación ovárica para donación ovocitaria.

La supresión con análogos de la GnRH se realizará de forma constante, comenzando en la fase lútea previa al ciclo de estimulación con 0,5 mg de acetato de leuprorelina (PROCRIN®, Abbot, Madrid, España) hasta la menstruación siguiente. Previamente al inicio del tratamiento se comprobará la quiescencia ovárica mediante ecografía transvaginal. Con la regla se disminuirá la dosis de agonista a la mitad (0,25 mg) y se iniciarán las gonadotropinas según el protocolo correspondiente, que se detalla a continuación. Los óvulos obtenidos serán destinados en cada ciclo a una paciente receptora de oocitos.

Ciclo con dosis estándar: 225 UI de FSH recombinante (Gonal F®, Merck-Serono, Alemania; o Puregon®, Organon, Madrid, España) durante los 5 primeros días, momento en el

cual se ajustará la dosis, de forma individualizada y si es necesario, en función de los niveles de estradiol (E_2): si E_2 es < 400 pg/ml la dosis se aumenta a 300 UI/día; si E_2 se encuentra entre 400 y 600 pg/ml la dosis se mantiene constante; si E_2 es > 600 pg/ml, la dosis se disminuye a 150 UI/día.

Ciclo con dosis reducida: 150 UI de FSH recombinante (Gonal F®, Merck-Serono, Alemania; o Puregon®, Organon, Madrid, España) durante los 5 primeros días. En este protocolo la dosis de FSHr nunca se aumenta independientemente de la respuesta existente, pero sí se reduce en caso de niveles de $E_2 > 600$ pg/ml.

Inicialmente, 32 donantes fueron sometidas a la estimulación estándar, pero durante el ciclo con dosis reducida, 10 fueron canceladas por respuesta insuficiente para el programa de donación de oocitos del IVI (definido como menos de 5 folículos mayores de 18 mm el día de la administración de la hCG). Cuando la población folicular alcance un tamaño de 18-19 mm de diámetros medios, se administrarán 250 microgramos de coriogonadotropina alfa recombinante (hCG; Ovitrelle®, Merck-Serono, Alemania). Por tanto, 22 donantes completaron de forma satisfactoria ambos protocolos de estimulación (ver Figura 10).

La punción folicular se realizará 36 horas después de la administración de la hCG bajo sedación general y guía mediante ecografía transvaginal. Los niveles de E_2 y progesterona se midieron el día de la administración de la hCG.

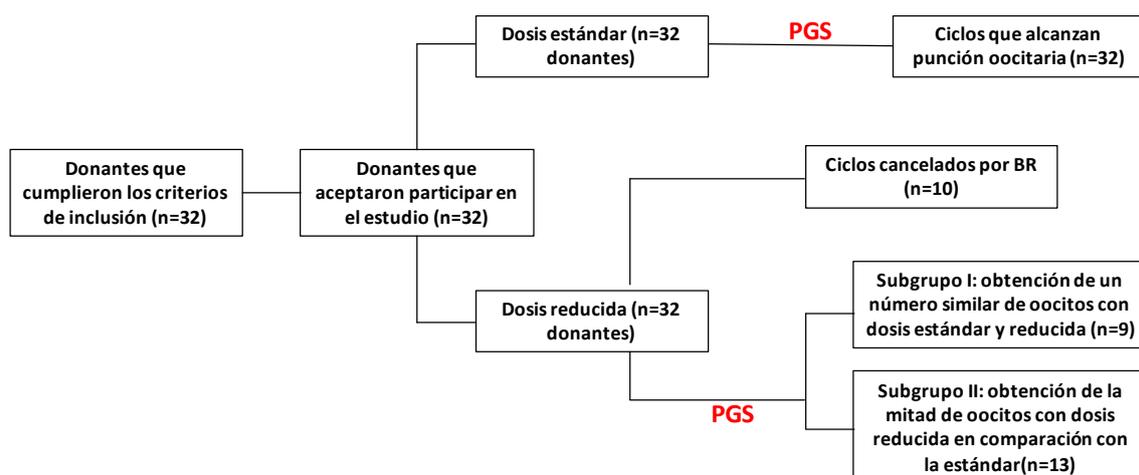


Figura 10. Flujo de las participantes a lo largo del estudio.

4.3.2 Receptoras de óvulos:

Se considerarán criterios de exclusión para las pacientes receptoras de oocitos: fallo repetido de implantación embrionaria en ciclos previos (siempre que se mantenga la misma pareja) definido como fallo de gestación clínica a la transferencia de al menos 2 embriones de buena calidad por ciclo durante tres ciclos o 10 embriones en total, parejas con factor masculino severo definido como la presencia de un porcentaje igual o menor al 5% de formas normales y/o un recuento inferior o igual a 5 millones de espermatozoides por ml o uso de muestras tomadas de biopsia de testículo. También serán excluidas aquellas parejas que tengan indicado el PGS por otra causa. Previo consentimiento informado se procederá a la realización de un ciclo de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con PGS de los embriones obtenidos para la evaluación de los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y. El procedimiento de biopsia y análisis cromosómico se detalla a continuación.

4.4 BIOPSIA Y CULTIVO EMBRIONARIO

Cronología de un ciclo de FIV con PGS:

Día 0: aspiración folicular e ICSI

Día 1: valorar fecundación a las 18-20 horas

Día 2: valorar desarrollo embrionario a las 24 horas

Día 3: biopsia embrionaria de los embriones evolutivos. Comienza el análisis genético mediante FISH o PCR

Día 4: valorar desarrollo embrionario

Día 5: seleccionar para la transferencia los embriones normales o no afectados con buena evolución

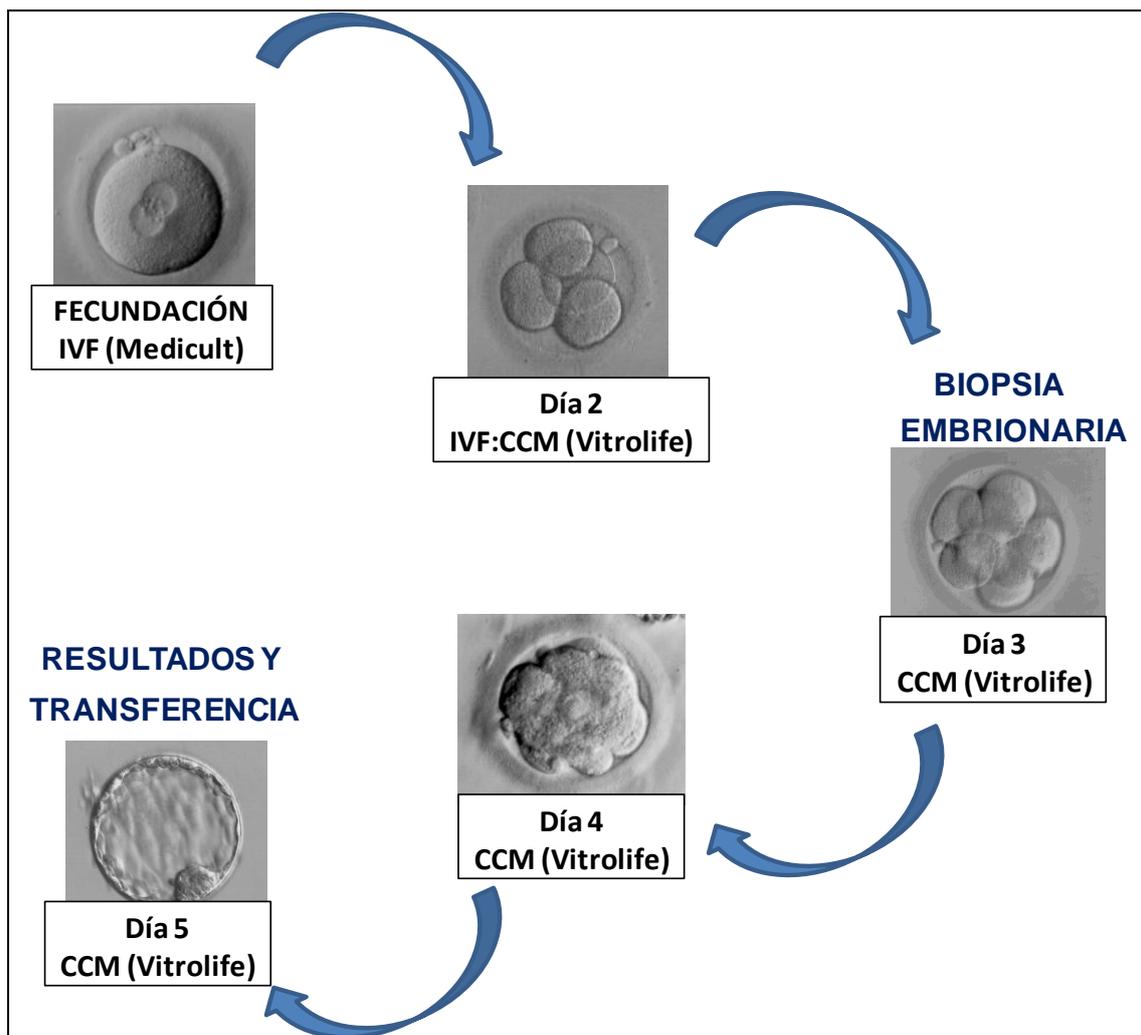


Figura 11. Desarrollo embrionario y medios de cultivo utilizados en un ciclo de PGS

Tras la punción folicular, los oocitos correctamente fecundados serán colocados en cocultivo con células epiteliales de endometrio desde el día 2 (Mercader et al, 2006) de su desarrollo hasta el momento de la transferencia o congelación de los mismos (día 5). Los medios de cultivo utilizados serán IVF y CCM (Vitrolife, Scandinavian IVF, Suecia) (ver Figura 11).

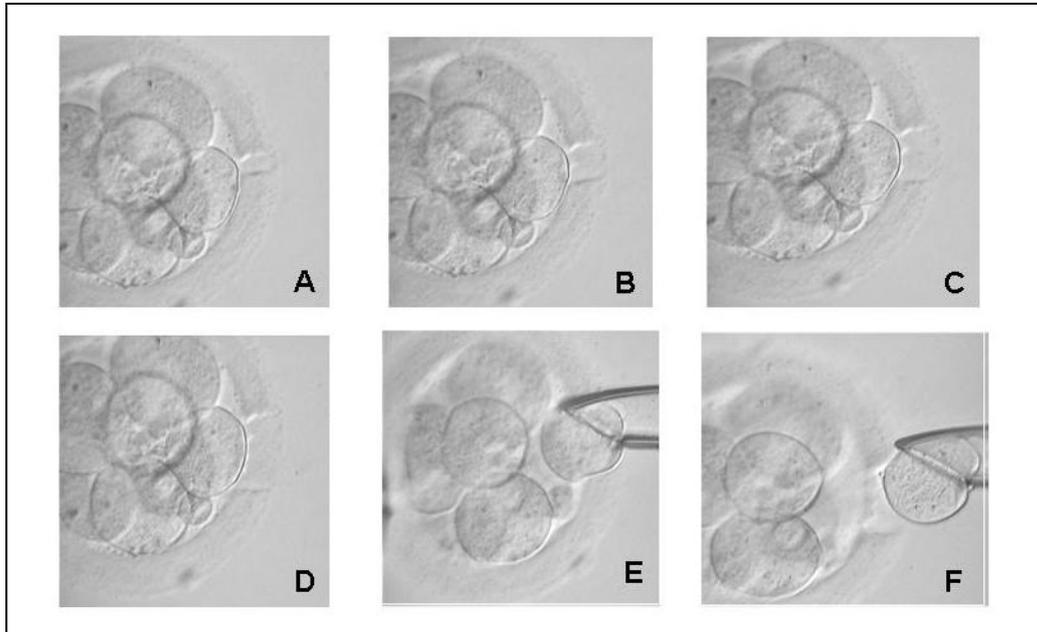


Figura 12. Biopsia embrionaria con láser

La biopsia se realizará en un medio sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (G-PGD, Vitrolife, Scandinavian IVF, Suecia), suplementado con albúmina. Brevemente (ver Figura 12), para la biopsia se sujeta el embrión con la pipeta *holding* de modo que en la posición de las 3 horarias quede un blastómero con núcleo único claramente visible. Para realizar un orificio en la zona pelúcida se utilizan varios pulsos de láser, con el resultado de un orificio no superior a $35\ \mu\text{m}$. Se aspiran uno o dos blastómeros con núcleo único y visible y se libera al embrión de la pipeta de sujeción. Concluida la biopsia, se retiran los embriones de la placa de biopsia y se lavan repetidas veces en una placa con medio de cultivo para eliminar los restos de medio de biopsia sin Ca^{2+} y Mg^{2+} antes de colocar de nuevo en la placa de cocultivo.

Los blastómeros extraídos permanecen en la placa de biopsia hasta el momento de la fijación, que se realiza de forma individual en un portaobjetos utilizando la solución de fijación compuesta por metanol: ácido acético glacial en proporción 3:1. Se deposita el blastómero sobre el portaobjetos con un volumen mínimo de medio o solución hipotónica y se dejan caer

gotas de la solución de fijación sobre la célula hasta que el núcleo queda extendido y sin restos de citoplasma (ver Figura 13).

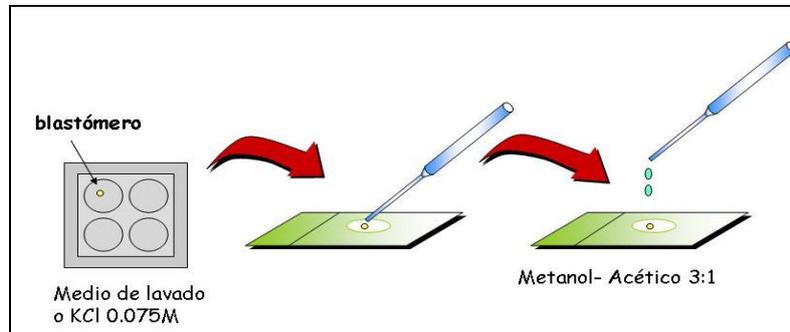


Figura 13. Fijación de las blastómeras durante el FISH

4.5 HIBRIDACIÓN "IN SITU" FLUORESCENTE (FISH):

En una primera ronda de hibridación se analizarán los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 con el kit comercial MultiVysion PB (Vysis, Inc. Downers Grove, IL.USA). Para ello se coloca la sonda sobre el portaobjetos, con un cubre de 10mm y se co-desnaturaliza en placa calefactora (Thermobrite, Vysis Inc. IL.USA) durante 4 minutos a 73°C, para hibridar a continuación entre 3 y 5 horas. Las señales de hibridación se analizan con microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados. En una segunda ronda de hibridación se analizan los cromosomas 15, X e Y con el kit MultiVysion 4 Custom Color (Vysis, Inc. Downers Grove). Se coloca la mezcla de las sondas sobre el área de hibridación y tras colocar de nuevo cubre de 10 mm se codesnaturalizan de nuevo a 73°C y se dejan hibridar durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de hibridación se evalúan las señales con microscopio de fluorescencia.

Los núcleos con señales no concluyentes o con ausencia de señal para cualquiera de los cromosomas analizados fueron reanalizados mediante el empleo de pruebas subteloméricas (Mir et al, 2010).

Los embriones se definieron como normales cuando todas las blastómeras analizadas del embrión (una o dos) mostraban dos puntos claros y separados para cada uno de los cromosomas autosómicos y para los cromosomas sexuales.

Los embriones fueron considerados anormales cuando todas las blastómeras analizadas del embrión (una o dos) mostraban un número diferente de señales fluorescentes.

Se consideraron como embriones con mosaicismo aquellos con dos células mostrando un número discordante de señales para uno o más cromosomas

FISH secuencial

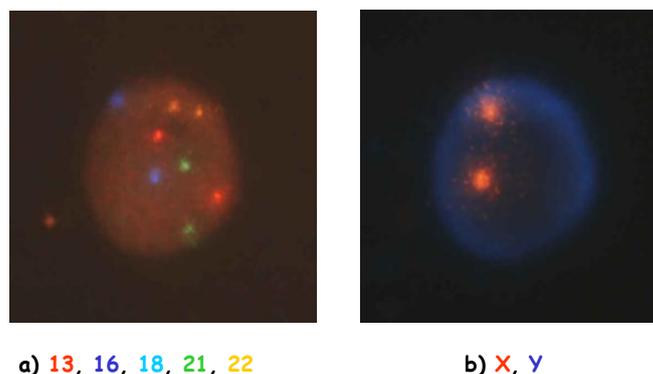


Figura 14. FISH secuencial; la imagen representa la secuencia de señales de hibridación en dos rondas consecutivas sobre un mismo blastómero y correspondería con un embrión normal para los cromosomas analizados.

4.6 VARIABLES ANALIZADAS

Donantes: dosis de gonadotropinas usadas, duración de la estimulación en días, nivel de E2 el día de la administración de la hCG, número total de oocitos obtenidos en la punción, número de oocitos en metafase II (MII), metafase I y en vesícula germinal, tasa de fecundación, número de embriones en D3 del desarrollo, número de embriones biopsiados, número de embriones informativos, número y porcentaje de embriones cromosómicamente normales, número y porcentaje de embriones cromosómicamente anormales, número y porcentaje de embriones mosaicos, calidad embrionaria en los diferentes estadios y tasa de blastocistos.

Receptoras: número de embriones transferidos, número de embriones congelados, tasa de gestación, tasa de implantación, tasa de aborto, tasa de embarazo evolutivo y de niño en casa.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS:

Para el análisis de los datos se utilizará el programa estadístico SPSS v.19. En todas las pruebas estadísticas realizadas con las variables de resultados se utilizará un nivel de significación estadística de 0,05. Para el tratamiento estadístico de los datos, se tendrán en cuenta las siguientes fases con sus respectivas acciones:

Fases	Acción
1. Revisión de los datos	Se emplearán tablas de frecuencia para detectar anomalías en la introducción de cada una de las variables del estudio, para corroborar que los totales de cada variable son iguales al número de pacientes incluidos en el estudio. Adicionalmente, se verificará si la distribución de ciertas variables como edad (construida con la fecha de nacimiento y la fecha de inclusión en el estudio), es la esperada (identificación de errores sistemáticos) para detectar la necesidad de hacer ciertas agrupaciones o dividir en diferentes categorías algunas variables (necesidad de recodificación)
	Para las variables cuantitativas, se determinará la DE en relación a la media y la distribución de percentiles para determinar los análisis estadísticos más adecuados a realizar en base a la distribución de los datos
	Se chequeará, mediante análisis de frecuencias, que todos los sujetos incluidos en la base de datos cumplen con los criterios de inclusión
	Se verificará la necesidad de transformar variables cuantitativas en categóricas o cualitativas en determinados supuestos (significación clínica)
	Se emplearán tablas de contingencia para detectar casos repetidos o incongruentes
2. Análisis	Identificación de conjunto de datos
	Descriptivo de la muestra con determinación de media, desviación estándar (DE) en variables cuantitativas y frecuencias, porcentajes relativos y porcentajes absolutos en variables cualitativas.
	Identificación de la posible relación entre variables cualitativas: Prueba de Ji-Cuadrado
	Medidas de asociación por grupos
	Comparación de dos grupos respecto a una variable cuantitativa: t de Student (o la prueba no paramétrica equivalente, U de Mann-Whitney)
	Comparación de una variable cuantitativa en más de dos grupos: análisis de

	<p>la varianza (o la prueba no paramétrica equivalente del análisis de la varianza, Kruskal-Wallis). En el caso de diferencias significativas en la distribución de los tres grupos, se realizará la comparación posterior para detectar cuál de ellos es el que difiere: técnica de comparación múltiple de Bonferroni (o la prueba de Mann-Whitney cuando haya que realizar comparaciones dos a dos, o de Wilcoxon cuando haya que comparar datos apareados, con un test no paramétrico)</p>
	<p>Asociación entre pares de variables cuantitativas: correlación de Pearson (o la correlación de Spearman cuando se requiera una prueba no paramétrica)</p>
	<p>Se determinarán valores y rango de valores muestrales, nivel de significación, valores medios y porcentajes, con sus respectivos intervalos de confianza</p>
	<p>Se determinarán las respuestas por grupos en los casos de análisis de grupos, con las respectivas p-valor</p>
	<p>Se efectuará un análisis multivariante, cuando hayan variables categóricas confusoras o modificadoras del efecto, o para detectar relaciones entre variables que pueden estar enmascaradas por otras relaciones más fuertes y que actúan como factor de confusión</p>

Tabla 3. Análisis estadístico

5. RESULTADOS

Un total de 32 donantes cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio. De ellas, únicamente 22 pacientes completaron ambos ciclos de estimulación debido a la aparición de baja respuesta en 10 donantes en el ciclo con dosis reducida (ver Figura 15).

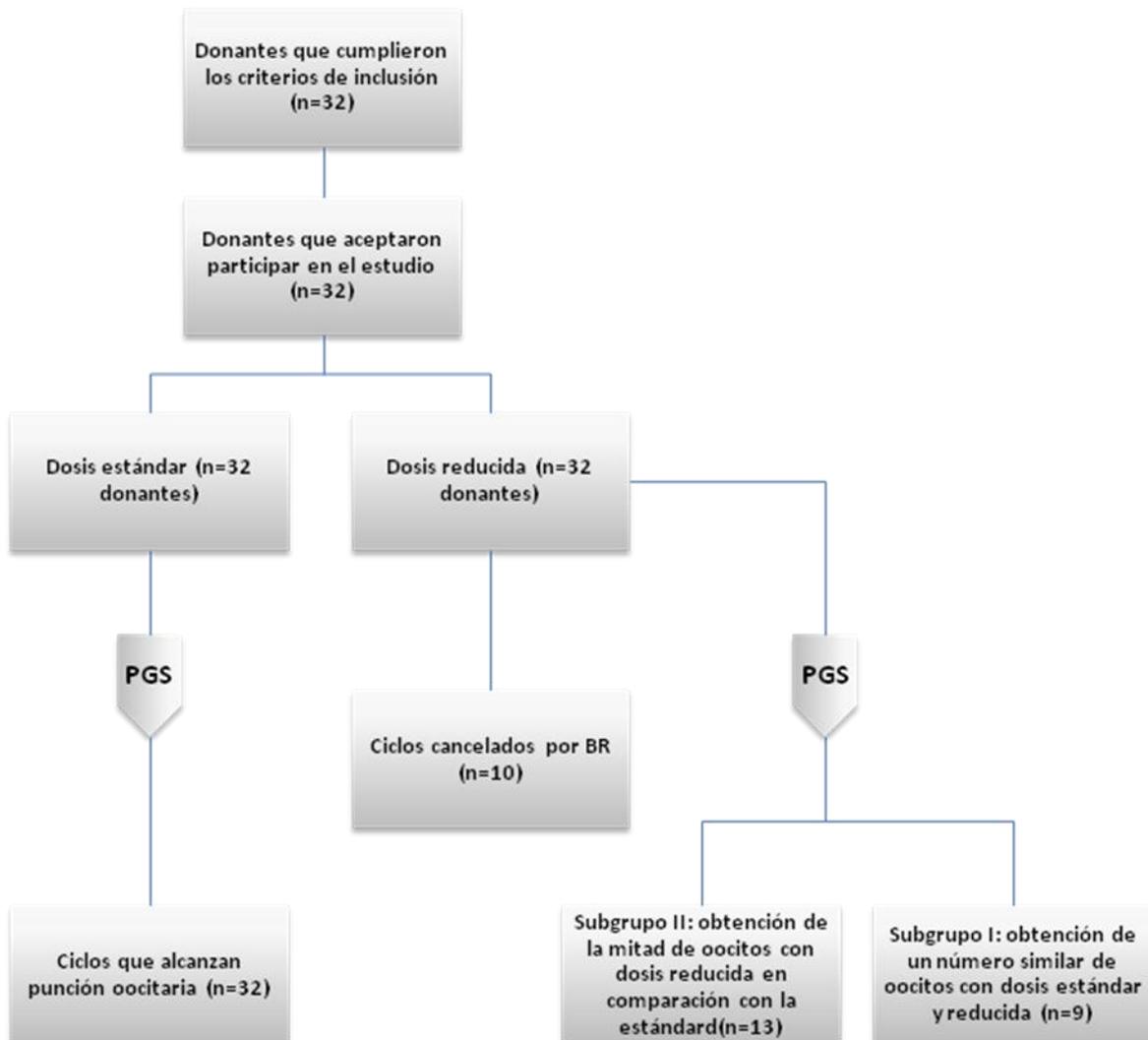


Figura 15. Flujo de las pacientes a través del estudio

Como ha sido explicado en el apartado de material y método, la intención fue mantener la dosis de gonadotropinas de forma constante a lo largo de la estimulación. Sin embargo, se contempló la posibilidad de modificarla en función de la respuesta individual con el fin de evitar la aparición de complicaciones como son, fundamentalmente, tanto el síndrome de hiperestimulación ovárica como una baja respuesta. Así pues, en las 22 donantes que completaron ambos ciclos de estimulación, fue necesario disminuir la dosis en ocho ocasiones a partir del quinto día de estimulación durante el empleo de la dosis estándar, mientras que no fueron necesarias modificaciones en el grupo de dosis reducida. De las 10 donantes en las que se canceló el ciclo con dosis reducida debido a baja respuesta, fue ya necesario aumentar la dosis durante el ciclo estándar en tres de ellas.

Al analizar la respuesta que se produjo tras la administración de la dosis reducida, diferenciamos dos subgrupos; en el subgrupo I se incorporaron aquellas pacientes en las que se obtuvo un número similar de oocitos con ambos esquemas de estimulación; en el subgrupo II quedaron aquellas donantes en las que se obtuvo, aproximadamente, la mitad de oocitos con dosis reducida de la que se había obtenido previamente con dosis estándar.

El PGS se llevó a cabo en los todos los casos, con la excepción de los ciclos que fueron cancelados por baja respuesta, en los que, no se llegó al momento de la punción.

5.1 DONANTES CON AMBOS CICLOS COMPLETADOS

En las donantes con ambos ciclos completados, se realizaron comparaciones entre la dosis estándar y la dosis reducida (ver Tabla 4). La reducción en cuanto a la administración diaria de gonadotropinas de 225 a 150 UI (228,6 vs 144,9; $p=0.0086$) y en cuanto a la administración total de gonadotropinas (2211,4 vs 1579,9 UI; $p=0.0499$) conllevó un nivel de E2 menor el día de la administración de la hCG (3056,4 vs 2074,3 pg/ml; $p=0.0019$) y un menor número medio de oocitos obtenidos (23,9 vs 14,7, $p<0,0001$). Igualmente, el número de oocitos en estadio adecuado para ser fecundados (MII o metafase II) fue significativamente inferior (19,5 vs 11,9, $p<0,0001$). Un total de 50 mujeres recibieron donación de oocitos procedentes de estos ciclos, existiendo un número mayor de receptoras en los ciclos con dosis estándar (27 vs 23 receptoras) debido a la mayor disponibilidad de oocitos.

La evolución embrionaria mostró una tasa mayor de fecundación con la dosis reducida (70,3 vs 77,1%; $p = 0,0312$), un mayor porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto tras ser biopsiados (66,8 vs 75,6%; $p = 0,0441$) y un mayor porcentaje de embriones cromosómicamente normales que alcanzaron el estadio de blastocisto con respecto al número total de oocitos MII obtenidos en cada donante de óvulos (16,1 vs 22,5; $p=0,0236$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de embriones que presentaron mosaicismo ni alteraciones cromosómicas cuando estos datos hacían referencia al % de embriones anormales en día 3 de desarrollo (52,4 vs. 50,0). Finalmente, el número de embriones cromosómicamente normales disponibles por ciclo de estimulación no mostró diferencias significativas entre los dos grupos (3,1 con dosis estándar vs. 2,7 con dosis reducida).

En las receptoras, tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto a la tasa de implantación, gestación o abortos, y el número de recién nacidos vivos fue similar con ambos protocolos de estimulación.

	Dosis estándar	Dosis reducida	p
Nº de donantes (edad media; DE)	22 (26,6; 3,9)	22 (26,6; 3,9)	NS
Nº de receptoras (edad media; DE)	27 (41,2; 4,9)	23 (40,5; 4,6)	NS
Dosis media diaria de gonadotropinas (UI, DE)	228,6 (101,1)	144,9 (100,3)	p=0.0086
Duración media de la estimulación (días, DE)	10,2 (1,7)	11,7 (1,7)	p=0.0055
Dosis media total de gonadotropinas (UI, DE)	2211,4 (1059,7)	1579,9 (1014,4)	p=0.0499
E2 medio el día de hCG (pg/ml, DE)	3056,4 (1001,5)	2074,3 (959,3)	p=0.0019
Nº de oocitos obtenidos (media; DE)	525 (23,9; 7,0)	324 (14,7; 7,0)	p<0.0001
Nº de MII obtenidos (media; DE)	428 (19,5; 4,7)	262 (11,9; 3,3)	p<0.0001
Nº de cigotos con 2 pronucleos (%)	301 (70,3)	202 (77,1)	p = 0,0312
Nº de embriones biopsiados en día 3 (%)	208 (69,1)	152 (75,2)	NS
Nº de embriones anormales/informativos (%) ¹	107/204 (52,4)	74/148 (50,0)	NS
Nº de embriones con mosaicismo (%) ²	37/106 (34,9)	17/63 (26,6)	NS
Nº de blastocistos/embriones biopsiados (%)	139/208 (66,8)	115/152 (75,6)	p = 0,0441
Nº de blastocistos cromosómicamente normales (% por MII)	69 (16,1)	59 (22,5)	p=0,0236
Nº medio de blastocistos cromosómicamente normales por donante (DE)	3,1 (1,9)	2,7 (1,9)	NS
Media de embriones transferidos / donante (DE)	1,7 (1,0)	1,6 (1,0)	NS
Nº de gestaciones/transfer (%)	14/25 (56)	12/23 (52,2)	NS
Nº de abortos (%)	4 (28,6)	3 (25,0)	NS
Tasa de implantación (%)	16/49 (32,6)	15/44 (34,1)	NS
Nº de recién nacidos	13	11	NS

Tabla 4. EOC en las 22 donantes en las que se completaron ambos ciclos de estimulación.

Las comparaciones entre dosis estándar y dosis reducida se realizaron mediante t-Student y test exacto de Fisher

¹ Se definieron como embriones informativos aquellos con resultado informativo tras el análisis con FISH

² Resultado discordante entre dos blastómeras cuando se analizaron dos células

La Tabla 5, analiza con mayor detalle la evolución embrionaria en base a parámetros morfológicos en los estadios de desarrollo previos a la biopsia embrionaria. En ella observamos, características similares en cuanto a ambos protocolos de estimulación.

Con respecto al día 2 de desarrollo embrionario, el número medio de células (3,9 vs. 3,9), así como los porcentajes de fragmentación (7,64 vs. 7,25) fueron similares con ambos protocolos tras la estimulación con dosis estándar y dosis reducidas respectivamente. La multinucleación de las blastómeras fue escasa en ambos protocolos de estimulación y nos e observaron diferencias significativas, con 12,3% embriones con alguna célula multinucleada en el grupo de estándar y 9,9% de embriones multinucleados en el grupo de dosis reducida.

En día 3 de desarrollo embrionario, la evolución de la morfología embrionaria tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados. El número medio de células fue 7,9 con dosis estándar y 7,8 con dosis reducida. El porcentaje de fragmentación fue de 8,3 vs. 7,8 y el porcentaje de embriones que presentaron multinucleación fue también similar con ambos protocolos de estimulación (15,8 vs. 17,7).

	Dosis estándar	Dosis reducida	p
Día 2			
Nº de células (media; DE)	3,9 (0,8)	3,9 (0,8)	NS
Fragmentación (%; DE)	7,6 (5,5)	7,2 (6,4)	NS
% Multinucleación	12,3	12,3	NS
Día 3			
Nº de células (media; DE)	7,9 (1,4)	7,8 (1,4)	NS
Fragmentación (%; DE)	8,3 (5,9)	9,0 (7,0)	NS
% Multinucleación	15,8	17,7	NS

Tabla 5. Comparación de la morfología embrionaria en las 22 donantes en las que se completaron ambos ciclos de estimulación.

Las comparaciones entre dosis estándar y dosis reducida se realizaron mediante t-Student y Chi-cuadrado

En las 22 donantes que completaron ambos protocolos de estimulación (dosis estándar y dosis reducida), el número medio de oocitos de diferencia entre la estimulación estándar y la reducida fue de 8. Ahondando en lo previamente comentado, en función del tipo de respuesta obtenido, clasificamos a las donantes en dos subgrupos distintos:

Subgrupo I: 9 donantes con diferencias por debajo de la media (número similar de oocitos obtenidos con ambos protocolos).

Subgrupo II: 13 donantes con diferencias por encima de la media (obtención de aproximadamente la mitad de oocitos al realizar la estimulación con dosis reducida).

Al comparar ambos subgrupos, no se observaron diferencias en cuanto a niveles hormonales basales, recuento de folículos antrales, historia reproductiva previa, ni características demográficas.

Tras realizar la categorización en estos dos subgrupos, tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre ambos, ni cuando se administró el esquema con dosis estándar o con dosis reducida, en cuanto a las dosis medias diaria de gonadotropinas, los días de estimulación o las dosis totales de gonadotropinas.

En los siguientes apartados se muestran los resultados en ambos subgrupos de acuerdo a los dos protocolos de estimulación utilizados.

5.1.1 Donantes con número similar de oocitos en ambos protocolos de estimulación (subgrupo I)

En el **subgrupo I** (ver Tabla 6), la leve diferencia existente en el número de oocitos obtenidos no alcanzó la significación estadística. A pesar de ello, los niveles de estradiol fueron significativamente mayores cuando se empleó el protocolo estándar (2575,4 vs. 2112,7 pg/ml; $p < 0,0001$). La administración del protocolo con dosis reducida supuso un aumento de las tasas de fecundación (71,4 vs. 82,3%; $p = 0,0269$) con un aumento del porcentaje de blastocistos cromosómicamente normales por oocitos MII (11,4 vs. 20,2; $p = 0,0387$), resultando en un número medio de blastocistos normales mayor (1,8 vs. 2,7; $p > 0,05$), un aumento en las tasas de implantación (28,6 vs 42,1%; $p > 0,05$) y en la consecución del doble de recién nacidos vivos por donante (3 vs. 6).

	Dosis estándar	Dosis reducida	P
Nº de donantes (edad media; DE)	9 (27,4; 4,1)	9 (27,4; 4,1)	-
Nº de receptoras	9	9	-
Edad media de receptoras (DE)	39,9 (5,3)	41,3 (4,3)	NS
E2 medio el día de hCG (pg/ml, DE)	2575,4 (994,3)	2112,7 (1004,7)	<0,0001
Nº de MII obtenidos (media; DE)	140 (15,5; 5,4)	119 (13,2; 5,3)	NS
Nº de cigotos con 2 pronucleos (%)	100 (71,4)	98 (82,3)	0,0269
Nº de embriones anormales/informativos ¹ (%)	38/58 (65,5)	29/57 (50,9)	NS
Nº de embriones con mosaicismo ² (%)	10/23 (43,5)	6/22 (27,3)	NS
Nº de blastocistos/embriones biopsiados (%)	36/58 (62,1)	42/58 (72,4)	NS
Nº de blastocistos cromosómicamente normales (% por MII)	16 (11,4)	24 (20,2)	0,0387
Media de blastocistos cromosómicamente normales por donante (DE)	1,8 (1,5)	2,7 (1,5)	NS
Nº de gestaciones/transfer (%)	4/8 (50,0)	6/10 (60)	NS
Nº de abortos (%)	2 (50,0)	1 (16,7)	NS
Tasa de implantación (%)	4/14 (28,6)	8/19 (42,1)	NS
Nº de recién nacidos	3	6	-

Tabla 6. Resultados en el subgrupo de 9 donantes en el que los dos protocolos de estimulación consiguieron un número similar de oocitos MII (subgrupo I)

Las comparaciones entre dosis estándar y dosis reducida se realizaron mediante t-Student y test exacto de Fisher.

¹ Se definieron como embriones informativos aquellos con resultado informativo tras el análisis con FISH

² Resultado discordante entre dos blastómeras cuando se analizaron dos células

La comparación del desarrollo embrionario en los estadios previos a la biopsia embrionaria, muestra de forma global que los parámetros morfológicos fueron similares en día 2 y día 3 de desarrollo.

En día 2, se observó un número similar de células (3,7 con dosis estándar vs. 4,0 con dosis reducida). El porcentaje de fragmentación también fue similar entre ambos grupos (9,8 vs. 10,1 respectivamente) y se apreció una tendencia hacia una disminución del porcentaje de embriones con multinucleación cuando se utilizó el protocolo con dosis reducidas, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (11,3 vs. 5,3).

En día 3, tampoco se observaron diferencias destacables en los parámetros morfológicos analizados. El número medio de células fue similar con ambos protocolos de estimulación (7,7 vs. 7,7), así como el porcentaje de fragmentación (11,4 vs. 11,0) y el porcentaje de embriones que presentaron multinucleación (7,5 vs. 5,3).

	Dosis estándar	Dosis reducida	p
Día 2			
Nº de células (media; DE)	3,7 (1,0)	4,0 (0,9)	NS
Fragmentación (%; DE)	9,8 (6,1)	10,14 (7,0)	NS
% Multinucleación	11,3	5,3	NS
Día 3			
Nº de células (media; DE)	7,7 (1,1)	7,7 (1,5)	NS
Fragmentación (%; DE)	11,4 (6,1)	11,0 (7,1)	NS
% Multinucleación	7,5	5,3	NS

Tabla 7. Comparación de la morfología embrionaria en el subgrupo de 9 donantes en el que los dos protocolos de estimulación consiguieron un número similar de oocitos MII (subgrupo I)

Las comparaciones entre dosis estándar y dosis reducida se realizaron mediante t-Student y Chi-cuadrado

Los porcentajes de alteraciones cromosómicas fueron del 65,5% con el protocolo estándar y del 50,9% con dosis reducidas, mientras que los porcentajes de embriones con mosaicismo cuando se analizaron 2 células fueron del 43,5 y del 27,3%, respectivamente (las diferencias no alcanzaron la significación estadística). En este subgrupo, cuando se analizaron de forma individualizada las alteraciones cromosómicas, observamos un aumento estadísticamente significativo de las aneuploidías del cromosoma 13 ($p = 0,0105$) y una clara tendencia hacia mayores tasas de aneuploidías para todos los cromosomas analizados con el protocolo estándar (ver Figura 16).

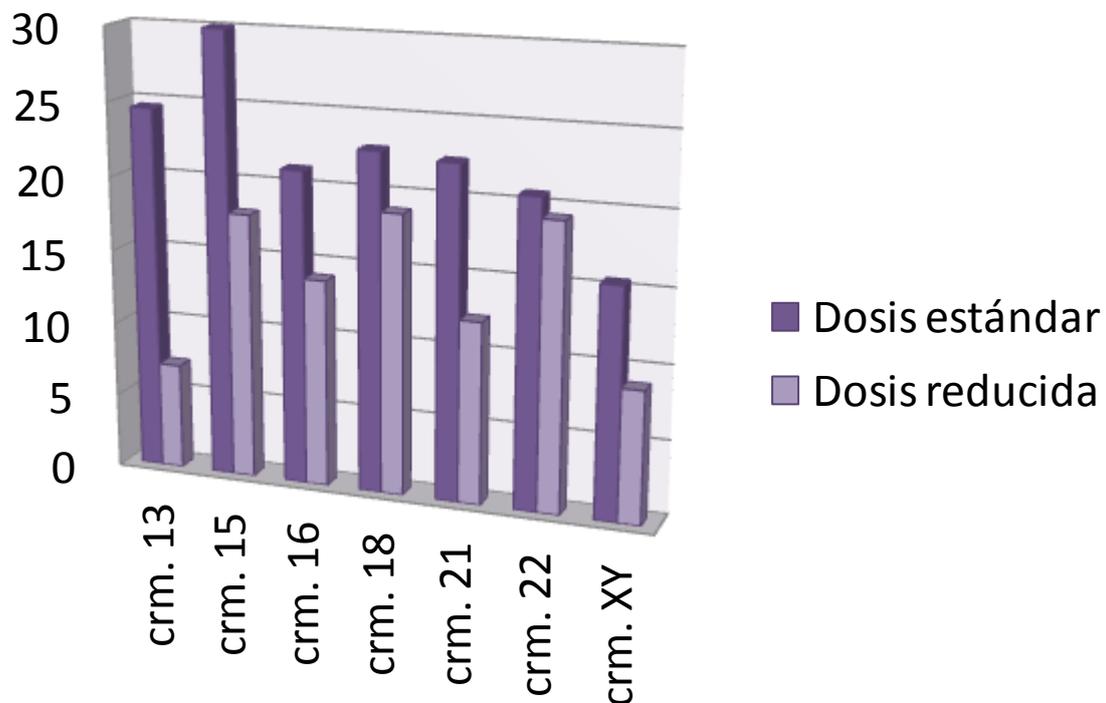


Figura 16. Análisis individual de anomalías cromosómicas para cada cromosoma estudiado en el subgrupo I (ambos protocolos con similar número de oocitos MII obtenidos)

Análisis estadístico mediante Chi-cuadrado

5.1.2 Donantes con disminución del número de oocitos tras estimulación con dosis reducida (subgrupo II)

En el subgrupo II (ver Tabla 8), con el protocolo de dosis reducida la disminución en los niveles séricos de estradiol fue mucho más marcada que en el subgrupo previo (>1.300 pg/ml de diferencia media, pasando de unos niveles medios de 3389,3 a otros de 2047,8 pg/ml) y se acompañó de una importante diferencia en cuanto al número de MII obtenidos (22,1 con dosis estándar vs 11 con dosis reducida; $p < 0,0001$).

Sin embargo, al analizar la evolución embrionaria y las tasas obtenidas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados. Así, las tasas de fecundación fueron similares (69,8 vs 72,7%), el porcentaje de embriones que llegan al estadio de blastocisto del total de embriones biopsiados fue algo mayor con la dosis reducida (68,7 vs 77,6%), y el número medio de blastocistos cromosómicamente normales por donante fue mayor para la dosis estándar (4,1 vs 2,7).

	Dosis estándar	Dosis reducida	p
Nº de donantes (edad media; DE)	13 (26,0; 4,0)	13 (26,0; 4,0)	-
Nº de receptoras	18	14	-
Edad media de receptoras (DE)	41,9 (4,5)	40,0 (4,7)	NS
E2 medio el día de hCG (DE)	3389,3 (1001,5)	2047,8 (959,3)	0,0019
Nº de MII obtenidos (media; DE)	288 (22,1; 5,8)	143 (11,0; 5,6)	<0.0001
Nº de cigotos con 2 pronucleos (%)	201 (69,8)	104 (72,7)	NS
Nº de embriones anormales/informativos ¹ (%)	69/146 (47,3)	45/91 (49,4)	NS
Nº de embriones con mosaicismo (%) ²	27/83 (32,5)	11/41 (26,8)	NS
Nº de blastocistos/embriones biopsiados (%)	103/150 (68,7)	73/94 (77,6)	NS
Nº de blastocistos cromosómicamente normales (% per MII)	53 (18,4)	35 (24,5)	NS
Media de blastocistos cromosómicamente normales por donante (DE)	4,1 (1,9)	2,7 (1,9)	NS
Nº de gestaciones/transfer (%)	10/17 (58,8)	6/13 (46,1)	NS
Nº de abortos (%)	2 (20,0)	2 (33,3)	NS
Tasa de implantación (%)	12/35 (34,3)	7/25 (28,0)	NS
Nº de recién nacidos	10	5	-

Tabla 8. Resultados en el subgrupo de 13 donantes en el que se obtuvo aproximadamente la mitad de oocitos MII con dosis reducida (subgrupo II).

¹ Se definieron como embriones informativos aquellos con resultado informativo tras el análisis con FISH

² Resultado discordante entre dos blastómeras cuando se analizaron dos células

Finalmente, las tasas de gestación (58,8 vs 46,1%) y de implantación (34,3 vs 28%) fueron mejores para la dosis estándar, resultando en el doble de recién nacido vivos (10 vs 5).

La comparación de la morfología embrionaria muestra una evolución similar para ambos grupos (ver Tabla 9).

En día 2, se observó un número similar de células (3,9 con dosis estándar vs. 3,9 con dosis reducida). El porcentaje de fragmentación también fue similar entre ambos grupos (6,9 vs. 5,3 respectivamente) y también el porcentaje de embriones con multinucleación (12,3 vs. 13,4).

En día 3, tampoco se observaron diferencias destacables en los parámetros morfológicos analizados. El número medio de células fue similar con ambos protocolos de estimulación (8,0 vs. 7,9), así como el porcentaje de fragmentación (7,2 vs. 7,6) y el porcentaje de embriones que presentaron multinucleación (18,7 vs. 21,4).

	Dosis estándar	Dosis reducida	p
Día 2			
Nº de células (media; DE)	3,9 (0,8)	3,9 (0,7)	NS
Fragmentación (%; DE)	6,9 (5,1)	5,2 (5,1)	p= 0.02
% Multinucleación	12,3	13,4	NS
Día 3			
Nº de células (media; DE)	8,0 (1,5)	7,9 (1,2)	NS
Fragmentación (%; DE)	7,2 (5,5)	7,6 (6,7)	NS
% Multinucleación	18,7	21,4	NS

Tabla 9. Comparación de la morfología embrionaria en el subgrupo de 13 donantes en el que se obtuvo aproximadamente la mitad de oocitos MII con dosis reducida (subgrupo II).

Las comparaciones entre dosis estándar y dosis reducida se realizaron mediante t-Student y Chi-cuadrado

Los porcentajes de alteraciones cromosómicas fueron del 47,3% con el protocolo estándar y del 49,4% con dosis reducidas, mientras que los porcentajes de embriones con mosaïcismo cuando se analizaron 2 células fueron del 32,6 y del 26,8%, respectivamente (las diferencias no alcanzaron la significación estadística). En este subgrupo, cuando se analizaron de forma individualizada las alteraciones cromosómicas no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los cromosomas analizados. Únicamente, podemos observar una ligerísima tendencia hacia mayores tasas de aneuploidía con la dosis reducida en el caso de los cromosomas autosómicos (ver Figura 17).

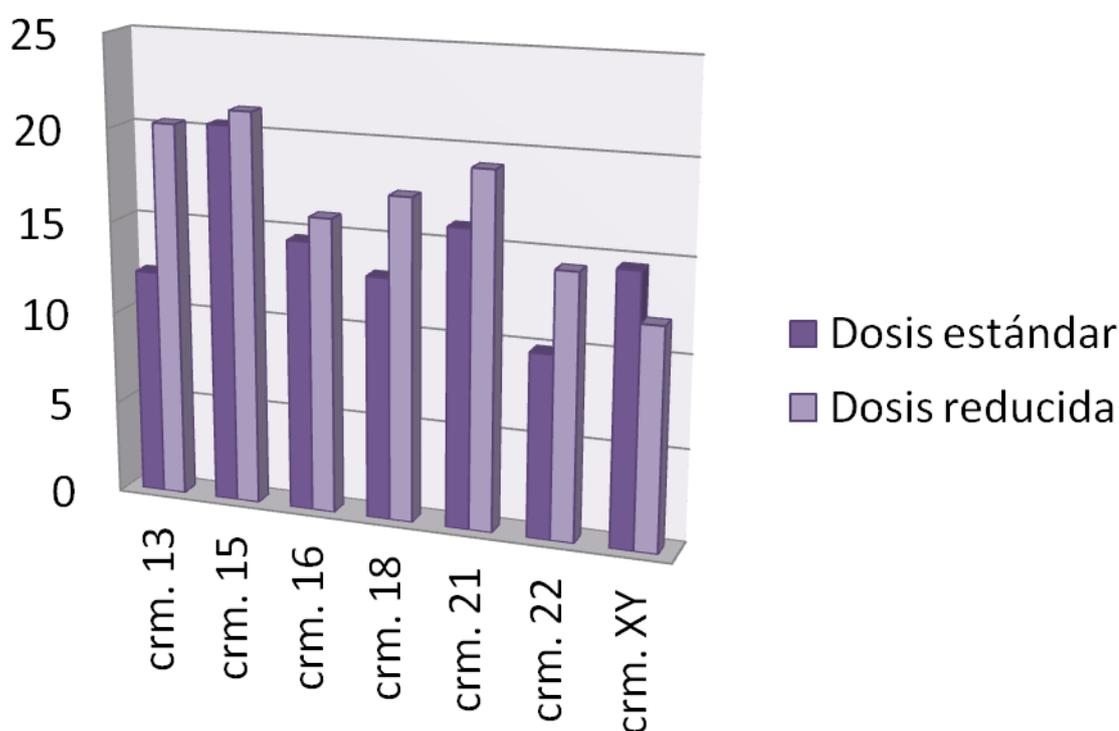


Figura 17. Análisis individual de anomalías cromosómicas para cada cromosoma estudiado en el subgrupo II (disminución del número de oocitos con dosis reducida)

Análisis estadístico mediante Chi-cuadrado

5.2 DONANTES CON CANCELACIÓN DEL CICLO DE DOSIS REDUCIDAS

La edad media de este grupo fue de 25,3 años frente a los 26,6 años del grupo que completó ambos ciclos, aunque no se alcanzó significación estadística. El recuento basal de folículos antrales tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (18,8 vs 18,7). Como ya hemos comentado, en este grupo, fue ya necesario aumentar la dosis durante el ciclo estándar en tres de las donantes.

En la **tabla 7**, se describen las características del ciclo de estimulación estándar en las 10 donantes incompletas y en sus correspondientes receptoras. Las características de la estimulación son similares a la del resto de donantes, con una dosis media diaria de gonadotropinas (245 vs 228 UI, $p > 0,05$) y una dosis total mayor (2260 vs 2211 UI, $p > 0,05$), como ya ha sido comentado, con respecto a las donantes con ambos esquemas completados. Paradójicamente, la duración del ciclo de estimulación fue algo menor ($9,2 \pm 0,8$ vs $10,2 \pm 1,7$ días, $p = 0,044$). El número de oocitos obtenidos ligeramente menores ($21,2 \pm 6,0$ vs $23,9 \pm 7,0$, $p > 0,05$) y los niveles medios de estradiol alcanzados durante la estimulación fueron similares ($3034,7$ vs 3056 pg/ml, $p > 0,05$).

En cuanto a la evolución embrionaria, las tasas de fecundación fueron de un 75,9%, con un 66,7% de embriones biopsiados en el tercer día de desarrollo embrionario y un 15,8% de blastocistos cromosómicamente normales por oocito en metafase II obtenido en el momento de la punción. A pesar de un número de blastocistos cromosómicamente normales por donante similar al de la estimulación estándar de las donantes con ambos ciclos completos ($2,9 \pm 1,2$ vs $3,1 \pm 1,9$, $p > 0,05$), las tasas de gestación (81,8 vs 56,0%) e implantación (45,0 vs 32,6%) fueron mejores en las donantes incompletas, aunque no se alcanzó la significación estadística.

DOSIS ESTANDAR	Donantes Incompletas	Donantes Completas	P
Edad media de las donantes (DE)	25,3 (3,1)	26,6 (3,9)	NS
Nº de receptoras	10	27	-
Edad media de las receptoras (DE)	41,0 (3,6)	41,2 (4,9)	NS
Dosis diaria media de gonadotropinas (UI, DE)	245,0 (52,4)	228 (10,1)	NS
Duración media de la estimulación (días, DE)	9,2 (0,8)	10,2 (1,7)	0,044
Dosis media total (UI, DE)	2260 (537,9)	2211,4 (1059,7)	NS
E2 medio el día de hCG (pg/ml, DE)	3034,7 (1174,3)	3056,4 (1001,5)	NS
Nº total de oocitos obtenidos	212	525	-
Nº medio de oocitos obtenidos por donante (DE)	21,2 (6,0)	23,9 (7,0)	NS
Nº total de oocitos MII obtenidos	183	428	-
Nº medio de MII obtenidos por donante (DE)	18,3 (4,0)	19,5 (4,7)	NS
Nº de cigotos con 2 pronucleos (%)	132 (75,9)	301 (70,3)	NS
Nº de embriones biopsiados en día 3 (%)	88 (66,7)	208 (69,1)	NS
Nº de embriones anormales/informativos (%)*	49/82 (59,7)	107/204 (52,4)	NS
Nº de embriones con mosaicismo (%) **	20/48 (41,7)	37/106 (34,9)	NS
Nº de blastocistos/embriones biopsiados (%)	66/88 (75)	139/208 (66,8)	NS
Nº de blastocistos cromosómicamente normales (% por MII)	29 (15,8)	69(16,1)	NS
Nº medio de blastocistos cromosómicamente normales por donante (DE)	2,9 (1,2)	3,1 (1,9)	NS
Media de embriones transferidos por donante (DE)	1,8 (0,4)	1,7 (1,0)	NS
Nº de gestaciones/transfer (%)	9/11 (81,8)	14/25 (56)	NS
Nº de abortos (%)	2 (22)	4 (28,6)	NS
Tasa de implantación (%)	9/20 (45)	16/49	NS
Nº de recién nacidos	7	13	-

Tabla 10. EOC en las 10 donantes en las que únicamente se completó el protocolo con dosis estándar debido a baja respuesta durante el ciclo con dosis reducida.

*Se definieron como embriones informativos aquellos con resultado informativo tras el análisis con FISH

**Resultado discordante entre dos blastómeras cuando se analizaron dos células

6. DISCUSIÓN

6.1 ACERCA DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

Este estudio fue diseñado partiendo de la base de que mayores dosis de gonadotropinas durante el proceso de EOC afectan en mayor grado al proceso de segregación cromosómica durante la meiosis. (Baart *et al.*, 2007; Tarín *et al.*, 1990). Diversos estudios realizados con anterioridad habían presentado resultados contradictorios a este respecto; así Gianaroli *et al.* (2000) obtuvo una incidencia similar de embriones cromosómicamente anormales independientemente del tamaño de la cohorte ovocitaria obtenida, en pacientes que habían sido clasificadas como de mal pronóstico por edad materna avanzada o por fallos de implantación (3 o más ciclos FIV sin conseguir gestación). (Gianaroli *et al.*, 2000; Haaf *et al.*, 2009). De modo opuesto, Baart *et al.* (2007) encontraron una menor tasa de aneuploidías cuando la estimulación fue suave o *mild* y se obtuvo un menor número de oocitos. En esta misma línea, Haaf *et al.* encontraron un aumento en la incidencia de aneuploidías tras EOC en las mujeres menores de 40 años cuando su respuesta supuso la obtención de más de 10 oocitos mediante biopsia del corpúsculo polar (Haaf *et al.*, 2009).

En cualquier caso, existe plausibilidad biológica en suponer que la cohorte folicular que se pone en marcha al inicio de cada ciclo ovárico va siendo seleccionada en base a criterios fisiológicos por parte del ambiente hormonal existente. En ello se basa el funcionamiento habitual del ovario que consigue ofrecer uno de los mejores oocitos existentes cada mes. Y hablamos de uno de los mejores porque, de los estudios realizados sobre ciclos naturales, hemos aprendido que también en ellos se produce una considerable tasa de alteraciones cromosómicas (Verpoest *et al.*, 2008) y que no existen diferencias en la morfología embrionaria al comparar ciclos naturales con ciclos estimulados (Ziebe *et al.*, 2004) El hecho de que la principal causa de los abortos sea, también, las alteraciones cromosómicas, apoya la idea de que en condiciones fisiológicas son frecuentes los errores en la meiosis humana. Nuestra hipótesis supone que, en cualquier caso, una EOC agresiva afectará estos procesos en mayor medida que una estimulación suave. Este concepto intuitivo de que dosis excesivas de gonadotropinas durante la estimulación aumentarán el número de oocitos a costa de rescatar de la atresia oocitos de menor calidad, ha ofrecido la base de las nuevas tendencias de estimulación suave y, aunque, parece improbable que la selección se produzca con exactitud matemática, sí vemos factible que cantidad y calidad puedan ir difícilmente unidos de la mano.

Los resultados de las TRA se encuentran estancados a pesar de los grandes avances tecnológicos disponibles hoy en día en nuestros laboratorios. Ello ha supuesto que algunos grupos focalicen su atención en intentar desarrollar protocolos que interfieran en menor medida con el quehacer diario de las pacientes y con el funcionamiento fisiológico de sus ovarios. Así, se han desarrollado los protocolos de estimulación suave o *mild*, los cuales no afectan los resultados en términos de tasas de gestación (Verberg *et al.*, 2009) y, además, podrían evitar la obtención de un pool embrionario adicional con escasas posibilidades de viabilidad; así parece deducirse del estudio de Baart *et al.* (2007) en el que muestra la existencia de una limitación en el número medio de embriones euploides que es posible obtener (aproximadamente dos) por cohorte ovocitaria y estimulación, independientemente del número de oocitos obtenidos.

Ahondando en el mecanismo fisiológico, sabemos que la alta respuesta a la estimulación ovárica determina la recuperación de un número elevado de oocitos que provienen de folículos en diferentes grados de desarrollo. Aunque de folículos de pequeños diámetros se pueden obtener oocitos con madurez nuclear, la hipótesis de que el incremento de la frecuencia de aneuploidías en pacientes con alta respuesta se deba a la inmadurez citoplasmática permite suponer que dichos oocitos maduros serían más propensos a dar lugar a oocitos con defectos en la formación del huso meiótico y en la alineación de los cromosomas en la placa meiótica y por tanto, dar lugar a embriones cromosómicamente anormales. La hipótesis de trabajo del presente proyecto es que una dosis mayor de gonadotropinas condicionará una mayor respuesta y la recuperación de un mayor número de oocitos que podrían dar origen a un mayor porcentaje de embriones cromosómicamente anormales. Independientemente de la dosis y la respuesta, creemos posible que el número final de embriones cromosómicamente normales disponibles para transferencia por ciclo de estimulación sea similar con ambas estrategias de estimulación, como ya fue observado por Baart *et al.* (2007).

Reis Soares *et al.* en 2003 describió una alta tasa de aneuploidías en donantes que afectaba al 56,5% de sus embriones tras haber obtenido una media de 25,9 oocitos por punción. En el grupo de comparación, mujeres menores de 35 años en las que se realizaba PGS por enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales, se obtuvo una tasa de aneuploidías del 37,3% con una media de oocitos obtenida mucho menor (14,8). Munné *et al.* en 2006 confirmó cifras similares de aneuploidías en donantes (57%) comparables con las que existen en pacientes infértiles con un rango de edades similar. Finalmente, Keskintepe *et al.* (2007)

refiere cifras similares (56%). Todos estos resultados sugieren que el aumento en la tasa de alteraciones cromosómicas puede ir ligado al aumento en la respuesta a las gonadotropinas.

Muchos de los profesionales que nos hemos adentrado en el campo de la reproducción humana, creemos firmemente que es necesario individualizar los tratamientos; no vale cualquier tipo de estimulación para todos los pacientes, ni existen protocolos estándar que puedan ser aplicados de forma universal. Así pues, en este estudio podemos ver los resultados de la aplicación de protocolos “rígidos” sobre una población de donantes con una respuesta óptima previa. Es fácil apreciar que, incluso sobre esta población, los resultados son dispares, siendo complicado predecir cuál será la respuesta en cuanto a número de oocitos y la evolución embrionaria con la aplicación de distintos protocolos.

6.2 ACERCA DEL DISEÑO DEL ESTUDIO

6.2.1 Elección del modelo de donación ovocitaria

La finalidad de la capa funcional del endometrio es prepararse para la implantación del blastocisto. Para ello sufre de forma secuencial procesos de proliferación, secreción y degeneración. Los esteroides ováricos son un factor fundamental para la reconstrucción y el crecimiento del endometrio a partir de su capa basal.

La estimulación ovárica controlada supone el empleo exógeno de gonadotropinas con el fin de evitar el proceso de dominancia y permitir el desarrollo de un número mayor de folículos. Esto supone pasar de unos niveles estrogénicos que se sitúan en alrededor de 200 pg/ml durante un ciclo natural, a unos niveles medios significativamente mayores. Dichos niveles se sitúan, en nuestro trabajo, alrededor de los 3000 pg/ml para los ciclos con dosis estándar y sobre los 2000 pg/ml para los ciclos con dosis reducida.

Los niveles suprafisiológicos que se alcanzan durante los ciclos de estimulación tienen efectos deletéreos a nivel endometrial que se traducen en una disminución de la receptividad uterina. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar este hecho pero se piensa que el mecanismo fundamental es un aumento de sensibilidad a la progesterona que podría conducir a un desarrollo secretor precoz (Marchini *et al.*, 1991). Los cambios histológicos se observan, incluso, antes de que se produzcan elevaciones analíticas de progesterona y se ha correlacionado la magnitud de la exposición estrogénica con la disminución de la duración de la ventana de implantación (Kolibianakis *et al.*, 2002)

Por estos motivos, hemos elegido el modelo de donación ovocitaria para podernos centrar en la influencia de las distintas dosis de gonadotropinas sobre el desarrollo embrionario y la aneuploidía, obviando la posible influencia sobre la receptividad endometrial.

6.2.2 Influencia de la EOC repetida en los resultados

Hace ya más de 25 años que Lutjen *et al.* (Lutjen *et al.*, 1984) publicaron los primeros embarazos en humanos conseguidos tras donación anónima de oocitos. Desde entonces, esta técnica ha sufrido un incremento constante hasta convertirse en una de las actividades esenciales de los centros de reproducción asistida. El retraso de la primera maternidad para edades que sobrepasan los 35 años supone una disminución drástica de las posibilidades naturales de concepción. Y es por este motivo que cada vez son más las mujeres que necesitan recurrir a una donación de oocitos para lograr una gestación.

Esta realidad ha comportado una mayor necesidad de donantes y, en este sentido, debemos tener especial cuidado en proteger la salud de las mujeres jóvenes que hoy en día están siendo donantes. En este sentido una de las preocupaciones que surgió rápidamente fue si las EOC repetitivas podrían afectar a la fertilidad futura de las donantes. De ser así, este sería un importante sesgo metodológico de nuestro trabajo, ya que el resultado del segundo ciclo de estimulación tendría unos resultados esperables peores que los del primer ciclo. Afortunadamente para nosotros y, fundamentalmente para las donantes, los ciclos sucesivos de estimulación no afectan a la respuesta ovárica en términos de calidad ni de cantidad. Caligara *et al.* realizaron un estudio con casi 300 donantes en el que se analizaba el efecto de estimulaciones sucesivas en donantes; se estudiaron hasta cinco ciclos sucesivos y no se vio afectación de resultados en cuanto al número de oocitos obtenidos, tasa de fecundación, desarrollo embrionario o tasas de gestación e implantación. Es más, los resultados tampoco se ven afectados por la duración del intervalo entre ciclos. Al analizar la posibilidad de conseguir una gestación no se encuentran diferencias al ajustar la *odds ratio* (o razón de odds) en relación al número de ciclo, la edad de la donante y el tamaño de la cohorte folicular (Caligara *et al.*, 2001). Estos resultados han sido corroborados posteriormente por diversos grupos (Jain *et al.*, 2005) mostrando que no se produce una disminución significativa en la reserva ovárica de las mujeres que se someten a hasta tres ciclos de FIV. A partir de este número de ciclos, ya es más difícil de asegurar por el factor de confusión que puede significar el paso del tiempo. (Luk *et al.*, 2010).

En cualquier caso, en nuestro estudio, el segundo esquema de tratamiento se realizó tras dejar pasar al menos 3 meses con respecto al previo, ya que sí hay autores que han sugerido que este es el tiempo que se necesita para renovar el pool folicular (hipótesis de Gougeon). A

pesar de que nuestro grupo no comparte esta experiencia, hemos intentado limitar la influencia de posibles sesgos. Por tanto, las diferencias obtenidas en el número de embriones o en su calidad, no pueden ser atribuidas a la realización de estimulaciones repetidas y/o al intervalo entre ciclos de esas donaciones.

6.2.3 Elección de donantes altas respondedoras

Otra de las cuestiones que requiere comentarios adicionales es la elección como material de un grupo de pacientes con alta respuesta a las gonadotropinas exógenas, concretamente donantes que, previamente, habían tenido una alta respuesta a un protocolo largo de estimulación ovárica (>20 oocitos y/o niveles de estradiol el día de la hCG >3000 pg/mL) sin haber desarrollado síndrome de hiperestimulación ovárica moderado o severo. Éste, que era un criterio de inclusión de nuestro estudio, supone que hemos centrado nuestros resultados en un grupo de pacientes que muestra tasas elevadas de anomalías cromosómicas en sus embriones. Reis *et al.* descubrieron un porcentaje de aneuploidías en embriones procedentes de donante del 56% frente a un 37,3% en embriones procedentes de parejas fértiles con mujer menor de 35 años que deseaban la realización de un PGS para la detección de enfermedades ligadas al sexo. Este estudio muestra que mujeres jóvenes con una respuesta significativamente elevada al recibir dosis de gonadotropinas significativamente más baja, producen embriones con una tasa de anomalías cromosómicas significativamente más alta. Por tanto, el patrón de respuesta observado era aquel que asociaba alta respuesta ovárica con un aumento en la frecuencia de embriones cromosómicamente anormales. Las causas son desconocidas pero se apunta a la inmadurez citoplasmática asociada a un desarrollo asincrónico de la cohorte ovocitaria o a los efectos deletéreos de los niveles suprafisiológicos de E2 (Reis Soares *et al.*, 2003).

Munné *et al.*, con una frecuencia de aneuploidías del 57% no pudieron ver estas diferencias según la cohorte ovocitaria, pero sí observaron una gran variabilidad entre ciclos, con un 27% de éstos, presentando menos del 30% de embriones euploides. El uso de la misma donante para diferentes pacientes receptoras reveló la influencia de un factor masculino causante de importantes variaciones intradonantes (Munné *et al.*, 2006).

6.2.4 Cancelación del ciclo de dosis reducida en donantes con baja respuesta.

El éxito de las TRA se basa de manera esencial en la optimización de los protocolos de estimulación ovárica cuyo objetivo es el de proporcionar un número suficiente de oocitos y embriones de buena calidad en respuesta al tratamiento con gonadotropinas exógenas. Sin embargo, entre un 2 y un 30% de las mujeres en las que se realiza una inducción de la ovulación resultan en una baja respuesta (BR). El porcentaje varía con la edad, con la definición de BR y con la patología preexistente (endometriosis, cirugías, etc.). La aparición de una BR supone la existencia de una imposibilidad, dificultad o resistencia por parte del ovario a su acción (Peñarrubia, 2007). Independientemente del criterio empleado, estas pacientes tienen menores índices gestacionales.

Existen numerosos criterios para definir una BR; escaso número de oocitos recuperados el día de la punción (por debajo de un rango que va de 3 a 7 oocitos) (Chong *et al.*, 1986; Rombauts *et al.*, 1998; Surrey *et al.*, 1998), la cancelación de ciclos de inducción previos por BR (Peñarrubia *et al.*, 2005) un número de folículos dominantes el día de administración de la HCG o de la punción limitado (entre 3 y 6 en total) (Land *et al.*, 1996; Raga *et al.*, 1999), o la combinación de varios de estos factores. Nuestro criterio para definir baja respuesta fue la existencia de menos de 5 folículos mayores de 18 mm el día de la administración de hCG.

Resulta paradójico hablar de baja respuesta en un grupo de mujeres que han sido incluidas en un programa de donación ovocitaria y que han sido calificadas como altas respondedoras en un ciclo previo con un protocolo de estimulación al que hemos calificado como estándar, pero la realidad es que nos encontramos ante un nuevo ciclo de estimulación en el que la respuesta no nos permite asegurar el objetivo del programa, que no es otro sino ofrecer las máximas garantías de gestación a las parejas receptoras. Ello supone un sesgo obvio, ya que no es posible descartar que esos pocos folículos presenten una excelente calidad y sean capaces de ofrecer elevadas tasas gestacionales. Así lo sugieren los múltiples estudios que hemos comentado sobre estimulación suave o *mild*; probablemente, este bajo número de oocitos obtenidos representa una respuesta fisiológica a una interferencia menor en la selección del folículo dominante y no una manifestación asociada al envejecimiento ovárico (Hohmann *et al.*, 2003; Heijnen *et al.*, 2007). Sin embargo, un escaso número de oocitos donados son fácilmente interpretados por las parejas receptoras y, en ocasiones, por los propios profesionales que se dedican a la reproducción, como la consecuencia de un mal ciclo

de estimulación. Ello puede asociar condicionamientos negativos que no son deseables en el contexto de un tratamiento cuyo fin es la consecución de una gestación. Por tanto, no debemos olvidar que el estudio ha sido realizado en el contexto de una institución privada que ha asumido los costes del estudio en su afán por mejorar el conocimiento de las repercusiones de la EOC, pero que no ha querido arriesgar las garantías de éxito que ofrece a sus pacientes.

6.3 ACERCA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (PGS)

El desarrollo de la tecnología del FISH al inicio de los años 90 permitió analizar la constitución cromosómica de los embriones humanos mostrando tasas de aneuploidía entre el 30 y el 70% en los días 2-3 de desarrollo (Munne *et al.*, 1997; Delhanty *et al.*, 1997). El empleo de esta tecnología nos ha permitido aumentar el conocimiento de los tipos de alteraciones cromosómicas y de cómo se producen. Así, sabemos que las tasas de aneuploidía aumentan con la edad materna llegando a tasas mayores al 95% en mujeres mayores de 44 años (Staessen *et al.*, 2004)

La elevada tasa de aneuploidía que encontramos en los embriones procedentes de FIV está, probablemente, relacionado con unas tasas de implantación que no consiguen progresar al ritmo que clínicos y pacientes deseáramos. Este hecho, junto con la observación de que alrededor de un 50-60% de los abortos clínicos espontáneos tienen alteraciones cromosómicas (Boue *et al.*, 1985), ha llevado a ofertar el PGS para intentar mejorar las tasas de la FIV. La rápida difusión que ha alcanzado esta técnica se ha visto frenada al no ser capaz de ofrecer una clara mejoría de los resultados. En este sentido, existen publicaciones recientes que ponen en duda su utilidad, esgrimiendo una gran variedad de argumentos.

En primer lugar, como hemos comentado en distintas ocasiones, las alteraciones cromosómicas en los embriones humanos parecen más la norma que la excepción; BC Fauser afirma que entre un 40 y un 90% de los embriones calificados morfológicamente como de buena calidad son cromosómicamente anormales y postula que estas cifras aumentarán cuando sea posible analizar un mayor número de cromosomas (Fauser 2008).

Otra de las piedras angulares a la hora de cuestionar el PGS es el fenómeno del mosaicismo, el cual es un hallazgo frecuente cuando se analiza el embrión en su totalidad. Por tanto, la célula biopsiada en el proceso puede no representar, en muchos casos, el genotipo del embrión. De esta forma, en el caso del mosaicismo más frecuente que es la combinación de una línea aneuploide con otra diploide, si aspiramos un blastómero normal estaremos reduciendo la proporción de blastómeros diploides y aumentando la proporción de células aneuploides. De modo opuesto, la aspiración de una célula aneuploide aumentaría la proporción de blastómeros normales y podría llevarnos a descartar embriones con potencial de ser viables. (Bielanska *et al.*, 2002b; Baart *et al.*, 2006) Dejando al margen especulaciones sobre los desequilibrios del status cromosómico embrionario, al valorar la efectividad de la

técnica, nos encontramos con un bajo valor predictivo positivo, lo que supone una mala optimización del proceso de selección embrionaria (Michiels *et al.*, 2006.; Deugarte *et al.*, 2008).

Otros motivos que se barajan por los críticos de la técnica son las dificultades a la hora de interpretar resultados discordantes en el caso de haber realizado la biopsia de dos blastómeras (Baart *et al.*, 2006), o la posible aparición de errores intrínsecos a la técnica (recordemos que la biopsia embrionaria, la fijación del núcleo y el análisis mediante FISH son los tres pasos clave del proceso y, en cualquiera de ellos, incluso en manos expertas, pueden aparecer errores). Incluso, se habla de que puede ser más práctico realizar simplemente un cultivo embrionario prolongado en el laboratorio con el fin de que la selección natural excluya la mayor parte de los embriones anormales (Fritz 2008) Además, la seguridad de la técnica se ha cuestionado (Nekkebroeck *et al.*, 2008), planteándose la necesidad de estudios propectivos largos para descartar efectos negativos en la descendencia.

Finalmente, dos demoledores metanálisis para revisar las indicaciones de PGS realizados por Mastenbroek *et al.* (Mastenbroek *et al.*, 2008; Mastenbroek *et al.*, 2011) muestran una clara reducción en las tasa de gestación evolutiva para el grupo con PGS, especialmente cuando la indicación es edad materna avanzada (OR= 0,56). Basándose en este análisis, concluye que un ensayo clínico randomizado (ECR) necesitaría de un número tan elevado de ciclos para poder demostrar un efecto positivo clínicamente relevante (20% de incremento en tasas de gestación evolutiva) que sería poco ético plantearlo.

Una revisión detallada de los estudios incluidos para alcanzar estas conclusiones hace conveniente resaltar varios aspectos que nos permiten tener una mirada menos pesimista sobre esta técnica. En lo referente al análisis genético, uno de los ECR, realizado precisamente por el grupo de Mastenbroek (Mastenbroek *et al.*, 2007) muestra un 20% de embriones no informativos en el grupo del PGS; este elevado porcentaje disminuiría sensiblemente con una segunda ronda de análisis con sondas de DNA en regiones cromosómicas distintas a las previamente analizadas (Rodrigo *et al.*, 2004; Colls *et al.*, 2007) De hecho, ninguno de los trabajos incluidos, habla del análisis de rescate de estos embriones, acto habitual en los centros experimentados en los programas de PGS. Es más, no son únicamente los embriones no informativos los que son susceptibles de ser “rescatados”, también muchos embriones que muestran falsas monosomías con pruebas centroméricas en una primera ronda, serían candidatos idóneos. En nuestro estudio se realizaba de forma habitual un reanálisis cuando nos encontrábamos con núcleos con ausencia de señal o cuando éstas eran no concluyentes

(señales superpuestas, poco claras o demasiado extensas). Así, los embriones que fueron clasificados como no informativos fueron 6 de 88 en el grupo de las donantes incompletas y, cuando se completaron ambos esquemas, 4 de 208 con el protocolo estándar y 4 de 152 con la dosis reducida (ver Figura 18). La tasa global de embriones no informativos fue del 3,1%, muy por debajo de los datos referidos en los estudios previamente mencionados.

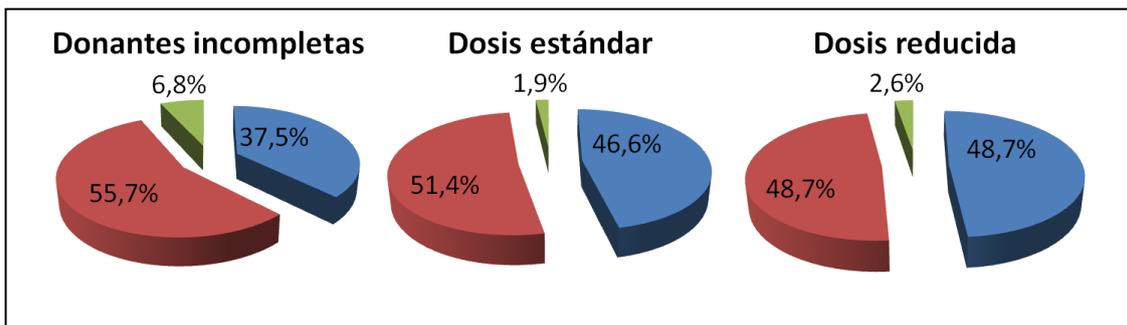


Figura 18. Tasa de embriones no informativos en los diferentes grupos del estudio.

Otro de los temas susceptibles de discusión es la elección de los cromosomas a analizar; la mayoría de los estudios incluidos no incluyen los cromosomas 15 y 22, especialmente asociados con abortos. Recientemente, se están obteniendo resultados prometedores con análisis de 24 cromosomas bien mediante hibridación genética comparativa (CGH) (Wells et al., 2008) o mediante empleo de *arrays* (Hellani et al., 2008).

En lo referente al cultivo y biopsia embrionarios, resultan llamativos los datos que ofrecen algunos estudios acerca de las tasas de llegada a blastocisto por embrión biopsiado (43%) (Staessen et al., 2008) o los porcentajes de aborto tras haber realizado PGS (70% para el grupo con PGS) (Hardarson et al., 2008), sugiriendo claramente que el proceso supuso, durante estos estudios, un importante daño embrionario. En nuestro estudio, como podemos observar gráficamente en la figura inferior, la tasa global de llegada a blastocisto por embrión biopsiado fue del 73,2% (320 blastos de 448 embriones biopsiados) y la tasa global de aborto fue del 25,7% (9 abortos de 35 gestaciones). Sería interesante conocer estas tasas durante el funcionamiento normal de los laboratorios incluidos en los estudios, ya que la experiencia en cultivos embrionarios prolongados podría constituir un sesgo importante.

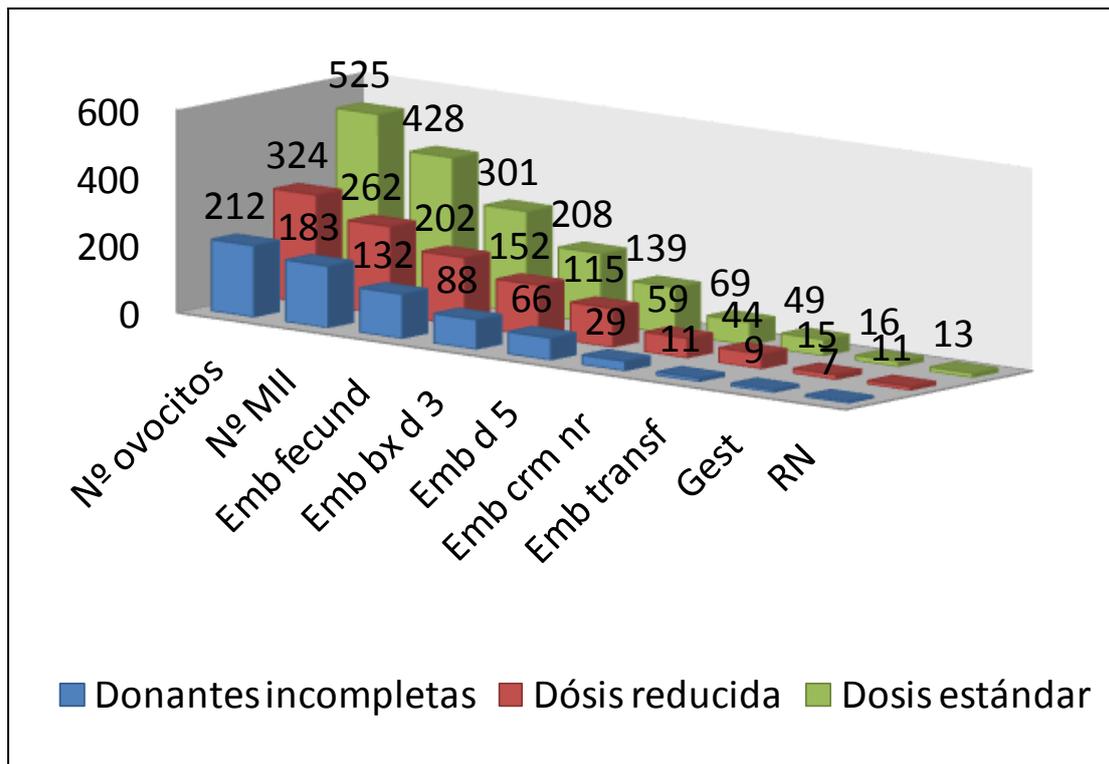


Figura 19. Evolución embrionaria en los grupos del estudio.

Adicionalmente, los criterios de inclusión de los diferentes estudios no son homogéneos y se escoge como corte para definir edad avanzada los 35 años (Schoolcraft *et al.*, 2009) o un grupo de pacientes entre 35 y 41 años (Mastenbroek *et al.*, 2007).

Finalmente, solamente dos de estos estudios hablan de interrupción voluntaria de embarazos en las gestaciones conseguidas sin PGS, uno por trisomía 18 (Mastenbroek *et al.*, 2007) y otro por trisomía 21 (Staessen *et al.*, 2008). Nos resulta sorprendente que no se haya prestado atención a este efecto colateral, tan significativo para las pacientes de edad avanzada. El registro catalán *FIVCAT.NET* del año 2008 muestra que 12 trisomías 21 y 4 trisomías 18 hubieran podido ser evitadas mediante el empleo del PGS (Servei d'Informació i Estudis: *FIVCAT.NET*, 2008). Tampoco debemos despreciar el hecho de que los pacientes, cuando se les oferta y explica la opción, desean conocer la dotación cromosómica de los embriones que les van a ser transferidos, fundamentalmente con el fin de evitar el síndrome de Down (Shahine *et al.*, 2008)

En resumen, consideramos que antes de intentar llegar a conclusiones sobre la utilidad, o su ausencia, para determinados grupos de pacientes del PGS, se debe realizar esfuerzos en dos direcciones. En primer lugar, resulta imprescindible una adecuada estandarización metodológica que haga reproducibles y comparables estos estudios. En segundo lugar, se debe

garantizar la calidad de los laboratorios y la adecuada formación de los biólogos participantes en estos estudios. Por todo ello, creemos que quizá no exista un nivel suficiente de evidencia acerca de la utilidad del PGS hoy en día, pero tampoco la existe en su contra, dado que la gran mayoría de estudios publicados no cumplen con criterios metodológicos adecuados ni alcanzan un tamaño muestral suficiente.

De cara al futuro de la técnica, tal y como propone la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), debemos explorar el momento óptimo para la realización de la biopsia embrionaria (contemplando desde la biopsia del corpúsculo polar hasta el del trofoectodermo embrionario) y emplear el desarrollo de la tecnología de los *arrays* para ampliar la información estudiada (Harper *et al.*, 2010)

6.4 ACERCA DE LA VALORACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES

La existencia de una relación entre morfología embrionaria y aneuploidía ha sido estudiada por gran número de estudios. La gran mayoría de los investigadores ha llegado a la conclusión de que existe, pero la correlación es débil y resulta de poca ayuda a la hora de conseguir una transferencia de embriones euploides (Alfarawati, *et al.*, 2011; Hardarson *et al.*, 2003.; Eaton, *et al.*, 2009). La gran mayoría de los estudios se han centrado en el estudio morfológico durante los 3 primeros días de desarrollo embrionario. Ello tiene sentido desde el punto de vista del funcionamiento habitual de los laboratorios de reproducción, ya que en estos días se realiza una valoración visual rutinaria y se han desarrollado distintos sistemas de clasificación y puntuación embrionarias. Sin embargo, desde un punto de vista biológico, la valoración morfológica en este momento puede no resultar idónea, dado que el genoma embrionario permanece inactivo hasta el estadio de 4-8 células (Braude *et al.*, 1988). De hecho, se piensa que las aneuploidías meióticas no ejercen una influencia negativa en el desarrollo y morfologías embrionarias hasta que el embrión no depende de la expresión de sus propios genes, alrededor, por tanto, de los días 2-3.

Es cierto que se han descrito asociaciones débiles entre aneuploidía y la existencia de multinucleación, un número de células no óptimo o una menor simetría celular durante los estadios precoces de división embrionaria y, por tanto, antes de la activación del genoma embrionario (Magli *et al.*, 2007; Moayeri *et al.*, 2008; Staessen, C., Van Steirteghem *et al.*, 1998). Una posible explicación para estos hallazgos pueden ser los fenómenos de demora o no disyunción meiótica, frecuentemente asociados con la formación de micronúcleos, o los errores en la citoquinesis, que pueden producir divisiones cromosómicas inexactas entre células hijas y explicar la asociación cuando encontramos blastómeras de distintos tamaños.

Otra posible explicación para justificar una asociación precoz entre morfología embrionaria y aneuploidía es que las alteraciones morfológicas sean consecuencia de una deficiencia oocitaria más general, de la cual la aneuploidía es sólo uno de sus síntomas. Por ejemplo, los oocitos con niveles bajos o inapropiados de ARNm y proteínas pueden estar predispuestos a producir embriones morfológicamente anormales y que tengan un elevado riesgo de malsegregación cromosómica. Estos oocitos pueden ser especialmente vulnerables durante los dos primeros días tras la fecundación cuando el embrión depende totalmente en los recursos propios del oocito. Fragouli *et al.* (Fragouli *et al.*, 2010) han mostrado que niveles

atípicos de transcripciones de ARNm poliadenilado predispone a que los oocitos cometan errores meióticos.

En nuestro trabajo, no ha sido posible correlacionar parámetros como el número de células existentes (en día 2 y en día 3 de desarrollo embrionario), existencia o ausencia de multinucleación (en día 2 y en día 3 de desarrollo embrionario), o existencia o ausencia de fragmentación (en día 2 y en día 3 de desarrollo embrionario), con la consecución de embriones cromosómicamente normales.

Resultados similares han sido comunicados por otros grupos como el de *Finn et al.* (Finn *et al.*, 2010), que encuentra una incidencia de aneuploidía similar independientemente de la clasificación morfológica embrionaria. Por tanto, la afectación cromosómica suele permanecer oculta en el estadio de cigoto y aparece de forma progresiva conforme el embrión progresa hasta el estadio preimplantatorio. Así, un estudio reciente en estadio de blastocisto (Alfarawati *et al.*, 2011) que emplea un análisis cromosómico más completo (CGH) sí es capaz de mostrar asociación entre aneuploidía, desarrollo embrionario lento y una masa celular interna pequeña con escaso desarrollo del trofoectodermo; un 49,2% de los embriones de mayor calidad morfológica (grados 5-6) eran euploides, por un 37,5% de los clasificados en los grados 1 y 2. Curiosamente, las formas severas de aneuploidías (monosomías, alteraciones de varios cromosomas o desequilibrios de cromosomas largos) parecen mostrar una mayor afectación morfológica que las formas menos severas (trisomías, por ejemplo). Este hallazgo concuerda totalmente con nuestros conocimientos clínicos, ya que las trisomías, en ocasiones, alcanzan y sobrepasan el primer trimestre de embarazo, mientras que rara vez vemos en gestaciones clínicas las que hemos mencionado como afectaciones más severas.

Realizamos un análisis de regresión logística con el fin de valorar el efecto de las variables relacionadas con la EOC (dosis de gonadotropinas total, dosis de gonadotropinas media diaria, E2 el día de la administración de la hCG, número de oocitos obtenidos, número de oocitos MII obtenidos) sobre una serie de variables relacionadas con el desarrollo embrionario (número de células en día 2, número de células en día 3, multinucleación en día 2, multinucleación en día 3, consecución de embriones cromosómicamente normales y consecución de embriones cromosómicamente normales que alcancen el estadio de blastocisto). Este análisis no fue incluido en el apartado de resultados porque ofreció escasas asociaciones que consideramos poco congruentes y difícilmente interpretables. Por tanto, únicamente comentaremos que se observaron asociaciones con los embriones cromosómicamente normales y que alcanzan el estadio de blastocisto con buena morfología y

algunos parámetros de la estimulación, sugiriendo que, de algún modo, el tipo de estimulación condiciona el tipo de material que obtenemos, su morfología y las posibilidades de normalidad cromosómica embrionaria. Obviamente, nuestro tamaño muestral supone una importante limitación a la hora de intentar extraer conclusiones más concretas.

En resumen, la valoración morfológica embrionaria posee una utilidad limitada a la hora de permitir una selección de embriones euploides, que va aumentando conforme nos acercamos al estadio de blastocisto.

6.5 ACERCA DE LOS OBJETIVOS

En este estudio en donantes altas respondedoras describimos un aumento significativo de las tasas de fecundación, tasas de llegada a blastocisto y tasa de embriones cromosómicamente normales que alcanzan el estadio de blastocisto tras recibir un segundo ciclo de tratamiento con dosis reducida de gonadotropinas. La mejoría en estas variables compensa la disminución en el número de oocitos obtenidos con este protocolo, de tal forma que, la eficiencia de los ciclos de donación ovocitaria fue similar con ambos esquemas en términos de resultados reproductivos y número total de recién nacidos en las receptoras (ver Figura 20).

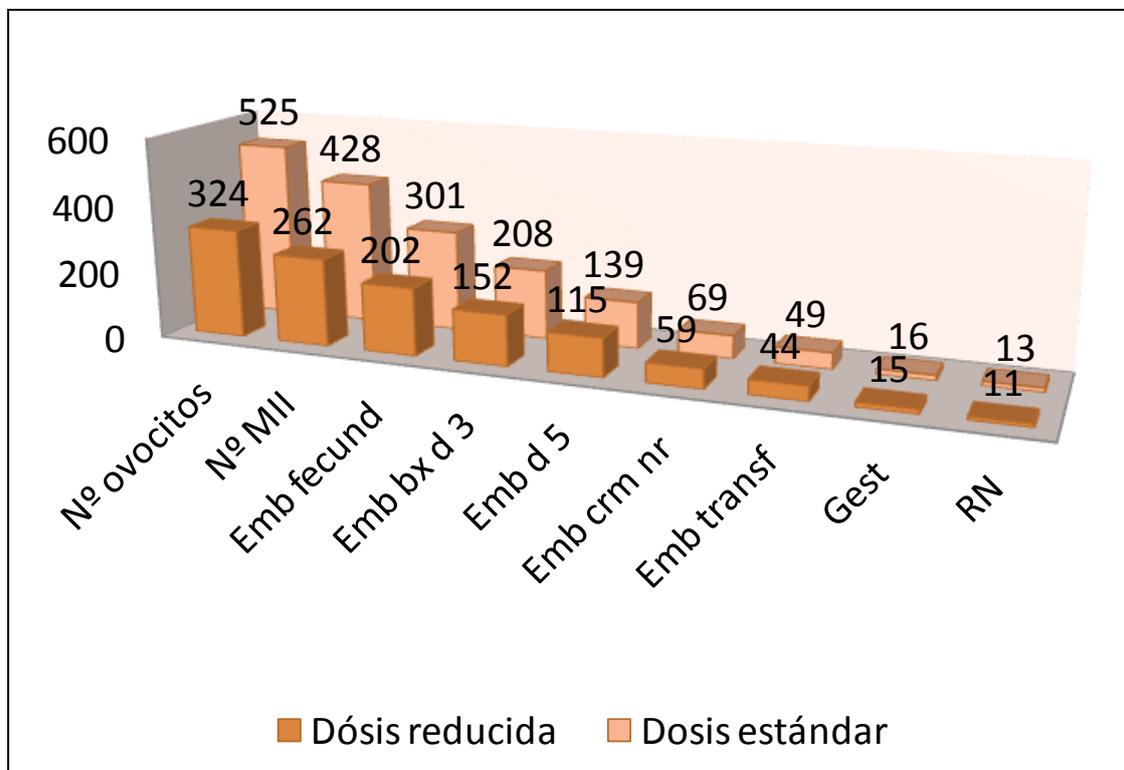


Figura 20. Evolución embrionaria en el grupo de las donantes completas

Así pues, tenemos un grupo de donantes altas respondedoras que alcanzan niveles estrogénicos elevados durante la EOC, muestran importantes tasas de aneuploidía embrionaria y con dosis reducidas de gonadotropinas consiguen mejores tasas de llegada al estadio de blastocisto. Aunque probablemente no existe un nivel suficiente de evidencia como para poder afirmarlo con rotundidad, los protocolos de estimulación y el tipo de respuesta que

provocan pueden tener un efecto directo en la calidad embrionaria, el número de blastocistos y las tasas de aneuploidía. Varias líneas de investigación parecen sugerirlo: en las mujeres que se someten a un tratamiento de FIV no parece encontrarse un aumento en la incidencia de anomalías cromosómicas de los restos abortivos con respecto a los embarazos espontáneos (Plachot, 1989; Ma *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2010). Sin embargo, en los ciclos de FIV con alta respuesta o incluso con desarrollo de un síndrome de hiperestimulación ovárica, sí se ha observado un aumento del riesgo de aborto y de aneuploidía fetal (Nasseri *et al.*, 1999; Raziel *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2009); varios estudios en programas de donación ovocitaria han descrito una elevada incidencia de alteraciones cromosómicas en embriones en día 3 de desarrollo procedentes de donantes con alta respuesta (Soares *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2005; Munné *et al.*, 2006c); y, finalmente, la capacidad de llegada al estadio de blastocisto y la adhesión embrionaria han mostrado verse afectadas con niveles crecientes estrogénicos en embriones murinos (Valbuena *et al.*, 2001).

Tras el desarrollo inicial de la FIV, la estimulación ovárica intensa ha sido la norma durante más de dos décadas. Conseguir el desarrollo de un gran número de folículos y obtener en el momento de la punción muchos oocitos se ha considerado como una garantía de un tratamiento bien llevado a cabo. Los regímenes tradicionales con análogos suponen una estimulación larga, compleja y cara que supone varias semanas con inyecciones y controles ecográficos. Todo ello conlleva molestias para los pacientes y unas posibilidades de tener efectos secundarios que no deben ser despreciadas. Además, este tipo de estimulación supone una importante alteración de la endocrinología fisiológica durante la fase lútea, y su impacto sobre la normalidad cromosómica de los embriones o sobre la receptividad endometrial (sobre el éxito del tratamiento, en definitiva), no está suficientemente descrito. En cualquier caso, debemos conocer que la respuesta a la EOC es muy variable y que también lo es la normalidad o anormalidad de la constitución cromosómica de los embriones con tasas que, por ejemplo en donantes, mujeres jóvenes sin patología conocida, pueden variar del 0 al 100% (Munné *et al.*, 2006c).

Actualmente, debemos realizar un esfuerzo por huir de la generalización de protocolos de estimulación e individualizar cada caso. Algunos de los datos fundamentales a la hora de decidir un esquema de estimulación serán la reserva ovárica, el índice de masa corporal o la respuesta obtenida en caso de existir estimulaciones previas. Este último punto será fundamental en el caso de donantes altas respondedoras, donde debemos hacer un esfuerzo por optimizar la estimulación y no conformarnos con la constatación de múltiples folículos en

desarrollo. Sabemos que, independientemente del número de oocitos obtenidos y de la dosis de gonadotropinas administradas, el número de embriones cromosómicamente normales es relativamente constante en mujeres jóvenes, oscilando entre 1,8 y 6 por ciclo de estimulación (Munné *et al.*, 2006c). Por tanto, las estimulaciones agresivas no incrementarán el número de embriones euploides, sino que se desarrollan a costa de oocitos que no tendrán una buena calidad.

En lo referente a la valoración de una respuesta ovárica limitada, habrá que distinguir claramente entre una baja respuesta tras una estimulación máxima (que sugiere envejecimiento ovárico) y una respuesta normal tras una estimulación suave (que sugiere una respuesta óptima en cuanto a cantidad y calidad). Este tipo de estimulación *mild* o suave pretende producir únicamente una sutil interferencia sobre el proceso fisiológico de dominancia folicular (Verberg *et al.*, 2009b) con el fin de conseguir seleccionar a los oocitos más sanos y cromosómicamente normales. Esto supone una disminución de los efectos secundarios y del coste del tratamiento para los pacientes, pero debemos de tener presente que no garantiza la normalidad cromosómica. De hecho, como ya hemos comentado, las tasas de aneuploidía con estos esquemas no son despreciables (Baart *et al.*, 2007) e, incluso, se dan en pacientes en los que no se produce afectación alguna de la fisiología de su ciclo ovárico, como son los pacientes estudiados en ciclo natural (Verproest *et al.*, 2008).

Como hemos repasado en la introducción, la EOC tradicional para FIV induce el desarrollo de múltiples folículos, resultando en la obtención de un gran número de oocitos en el momento de la punción. El funcionamiento fisiológico, fuera de mujeres sometidas a TRA, consigue, alrededor de la fase folicular media, la dominancia del folículo más maduro a costa del resto del *pool* ovocitario seleccionado en ese ciclo. Este folículo dominante continúa con su desarrollo a pesar de los niveles decrecientes de FSH, mientras que esta disminución supone acabar en atresia para la cohorte restante (Fauser *et al.*, 1993). El concepto de ventana de la FSH que hemos explicado en la introducción, nos resulta especialmente interesante para intentar entender los resultados obtenidos. De este modo, debe existir un límite superior de FSH que cuando es superado no se traduce en un aumento del reclutamiento folicular, y debe haber un límite inferior que, en caso de no alcanzarse, no permita desarrollo folicular alguno.

Una de las primeras conclusiones a las que podemos llegar tras nuestro estudio es que la respuesta a una misma disminución de dosis puede causar consecuencias tan diferentes como las observadas en los dos subgrupos del estudio; por un lado tenemos el subgrupo I, en el cual la disminución en la dosis de gonadotropinas produce la obtención de un número de oocitos

muy similar al previo, es decir, que en ambos tratamientos la dosis administrada se encuentra por encima del “techo” de la ventana de FSH de estas mujeres. Así, en este grupo, todo el estéril exceso de gonadotropinas administrado se traduce en mayor número de embriones portadores de alteraciones cromosómicas y una clara tendencia hacia una menor tasa de implantación (ver Tabla 6 y Figura 21). Por tanto, en este subgrupo resulta más eficiente la administración de la dosis reducida. Lamentablemente, nuestro reducido tamaño muestral no permite que se alcance la significación estadística a pesar de que la tendencia parece clara.

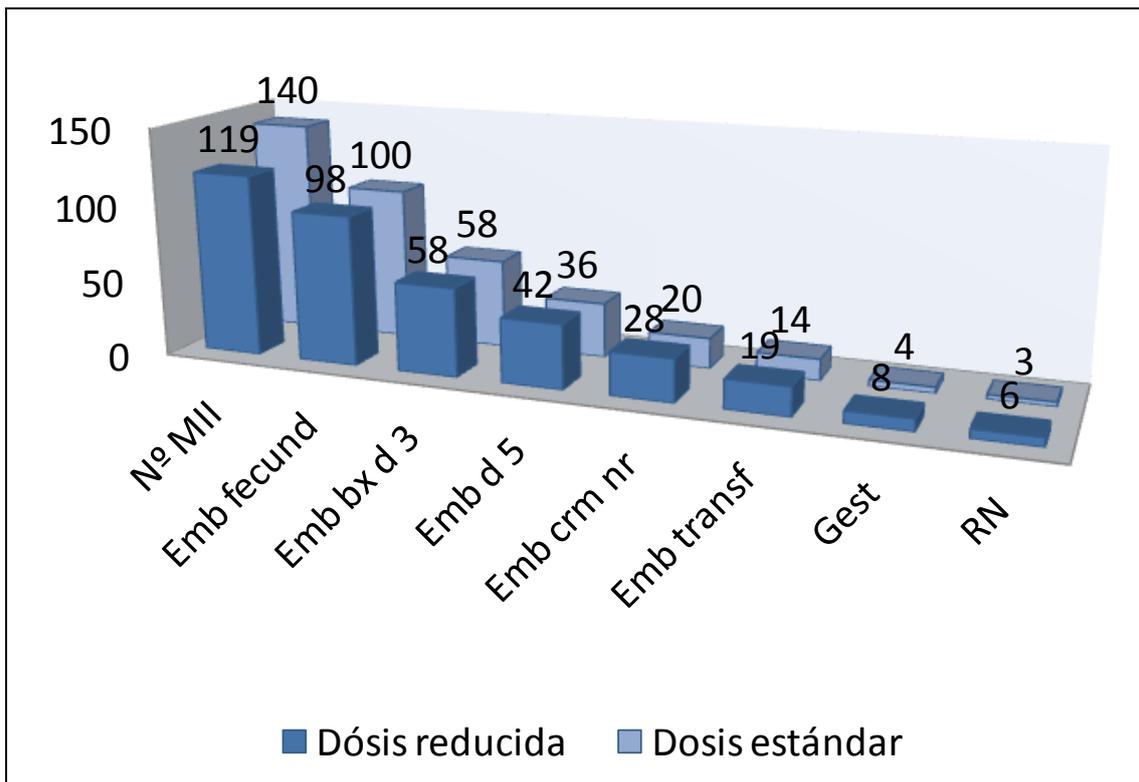


Figura 21. Evolución embrionaria en el subgrupo I

Por el contrario, en el subgrupo II, la administración de la dosis reducida supone la obtención de aproximadamente la mitad de oocitos en MII, lo cual sugiere que la dosis de ambos esquemas se encuentra dentro de los límites individuales de la ventana de FSH de estas mujeres. Por tanto, en estas pacientes, no se observa una mayor eficiencia de la administración de un esquema de tratamiento con dosis reducida (ver tabla 4 y Figura 22). De hecho, la dosis estándar consigue mayor número de embriones cromosómicamente normales, mayor número de gestaciones y mayor número de recién nacidos.

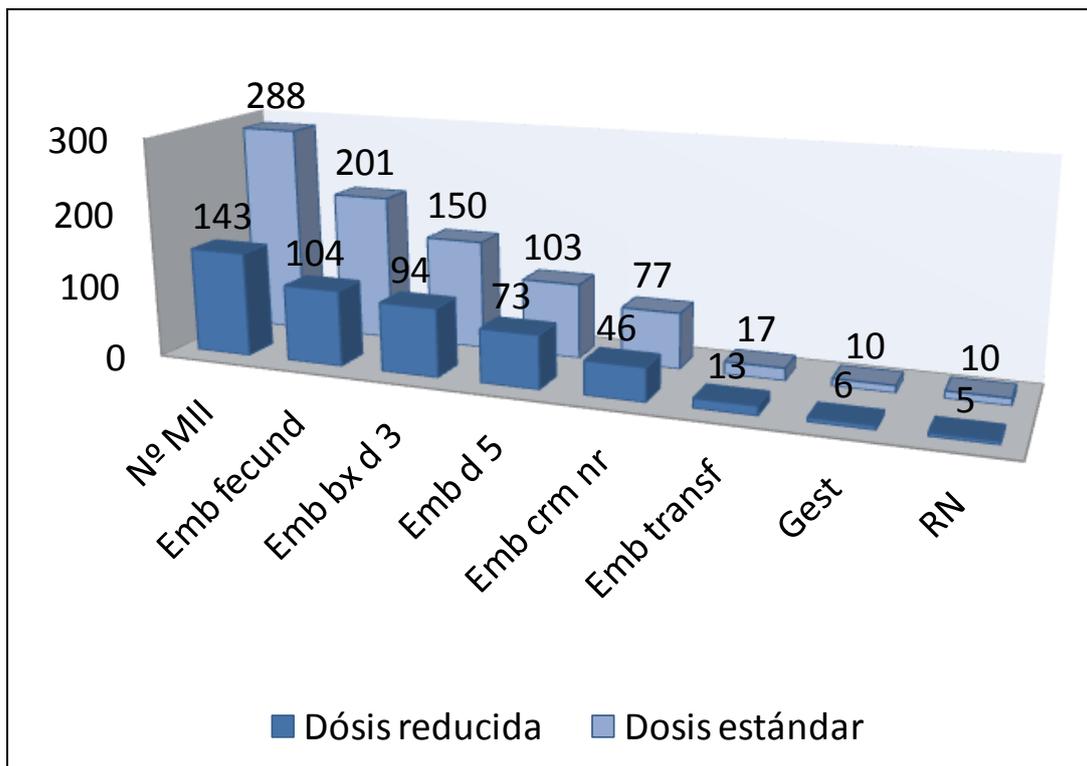


Figura 22. Evolución embrionaria en el subgrupo II

Además, contamos con la existencia de un tercer patrón de respuesta, las donantes incompletas, en las cuales al administrar la dosis reducida se produjo una disminución tan marcada en el reclutamiento folicular que se tuvo que proceder a cancelar el ciclo, dado que este estudio se enmarca dentro de la actividad de un centro de reproducción asistida privado que desea ofrecer las mejores garantías a sus pacientes. Nuestra interpretación es que en estas pacientes la ventana de la FSH es estrecha y la disminución de dosis ha situado los niveles cerca del suelo de dicha ventana. Obviamente, hubiera sido interesante completar estos ciclos y ver los resultados obtenidos. Quizá nos hubiéramos visto sorprendidos por una gran eficiencia de estos ciclos con escasa respuesta, pero carecíamos de un análisis de los datos como el que presentamos actualmente y se consideró que no se ofrecían garantías suficientes de éxito a las receptoras de estos embriones.

En cualquier caso, el ciclo de dosis estándar de este tercer patrón presenta unos resultados muy similares a los obtenidos en el subgrupo I con dosis reducida. Así, las tasas de fecundación son del 75,9% y del 82,3%, respectivamente, y compensan el mayor número de oocitos en metafase II obtenidos por donante ($18,3 \pm 4,3$ vs $13,2 \pm 5,3$). Posteriormente, los porcentajes de blastocistos cromosómicamente normales son del 75 y 72,4%,

respectivamente; el número de blastocistos cromosómicamente normales por donante son de 2,9 y 2,7, respectivamente; y las tasas de implantación son del 45 y del 42,1%, respectivamente (ver Figura 23).

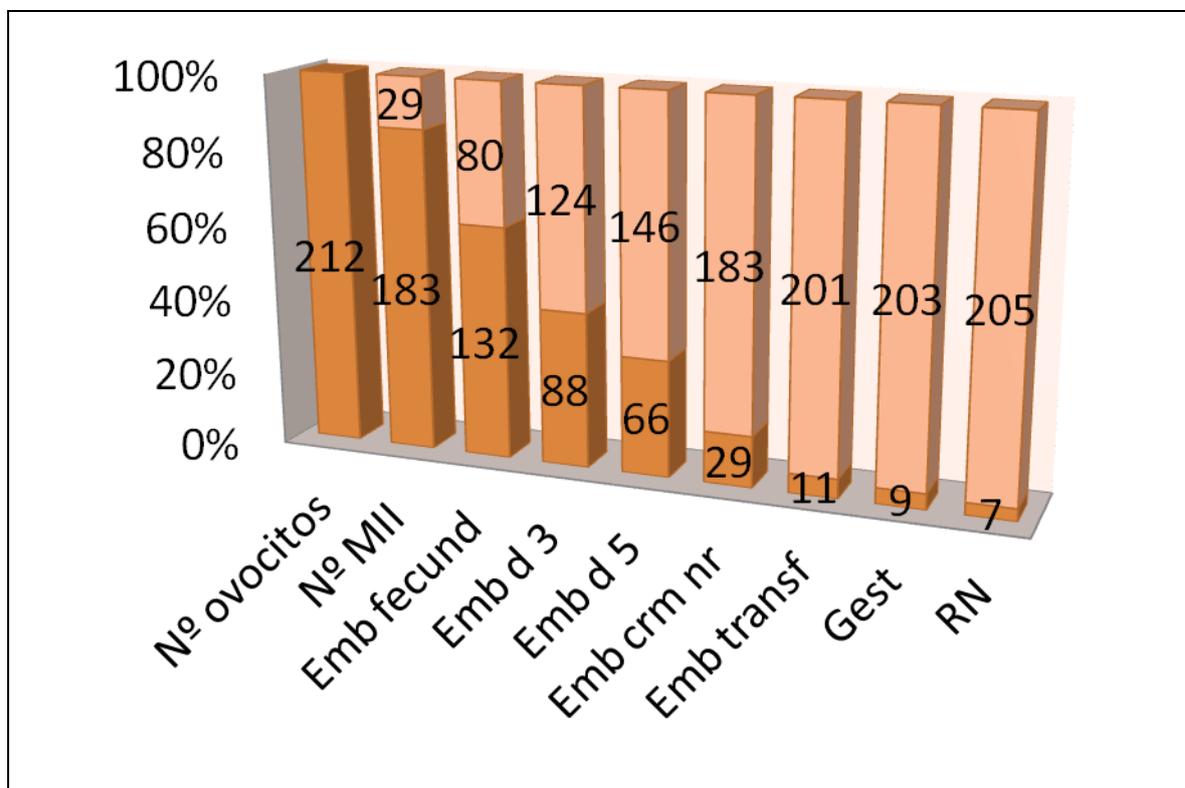


Figura 23. Evolución embrionaria en las donantes en las que únicamente se completó el protocolo con dosis estándar debido a BR durante el ciclo con dosis reducida.

Queremos resaltar, como se muestra en la figura inferior, que pese a plantear pautas de estimulación con un patrón estricto (se ha intentado y se ha conseguido no variar la dosis en la mayoría de las donantes del estudio) la respuesta ha ofrecido patrones diversos, poniendo de manifiesto, en nuestra opinión, la existencia de una ventana de FSH con características poco previsible en cada paciente. Así, hemos propuesto tres patrones; el primero, correspondiente al subgrupo I, supondría el patrón tradicional de la alta respondedora. En ella, con la administración de la dosis reducida obtenemos una respuesta máxima, ya que la ventana tiene un “techo bajo”. Lo interesante en estas pacientes es explorar cuál es su dosis mínima eficaz; el segundo patrón (subgrupo II), supone una ventana amplia dentro de cuyos márgenes se encuentran ambos esquemas. Analizando la eficiencia del proceso, parece que la mejor dosis es la más cercana al techo de FSH; por último, en el tercer patrón (donantes incompletas), la ventana es estrecha y, al disminuir la dosis, aparece una baja respuesta no analizada. Nuestra

interpretación habla de límites individuales de sensibilidad para la FSH, lo cual nos conduce a insistir en la necesidad de individualizar los tratamientos.

Una observación detallada de los resultados obtenidos nos permite ver que cuando los protocolos de estimulación quedan cerca del techo de la ventana de estimulación es cuando obtenemos los mejores resultados, como sucede en la dosis reducida del subgrupo I, en la estándar del subgrupo II y en la dosis estándar de las donantes incompletas. Si nos alejamos de este punto, ya sea por exceso (dosis estándar en el subgrupo I) o por defecto (dosis reducida en el subgrupo II), los resultados empeoran. Desgraciadamente, estos resultados ponen de manifiesto la dificultad para dar con la dosis más eficiente para cada paciente y nos recuerdan la necesidad de que individualizar nuestros esquemas de tratamiento.

Resulta innegable, en nuestra opinión, que la tendencia hacia el desarrollo de ciclos de estimulación más suaves es positiva, pero queremos resaltar que difícilmente se podrá generalizar un protocolo estándar para la población general como, en ocasiones, se ha sugerido. Más bien, debemos ahondar en esta tendencia hacia la administración de dosis menores con obtención de un menor número de oocitos pero de mayor calidad, teniendo siempre presente que la ventana de FSH será distinta para cada paciente y que debemos buscar la administración de la dosis mínima eficaz de manera individualizada.

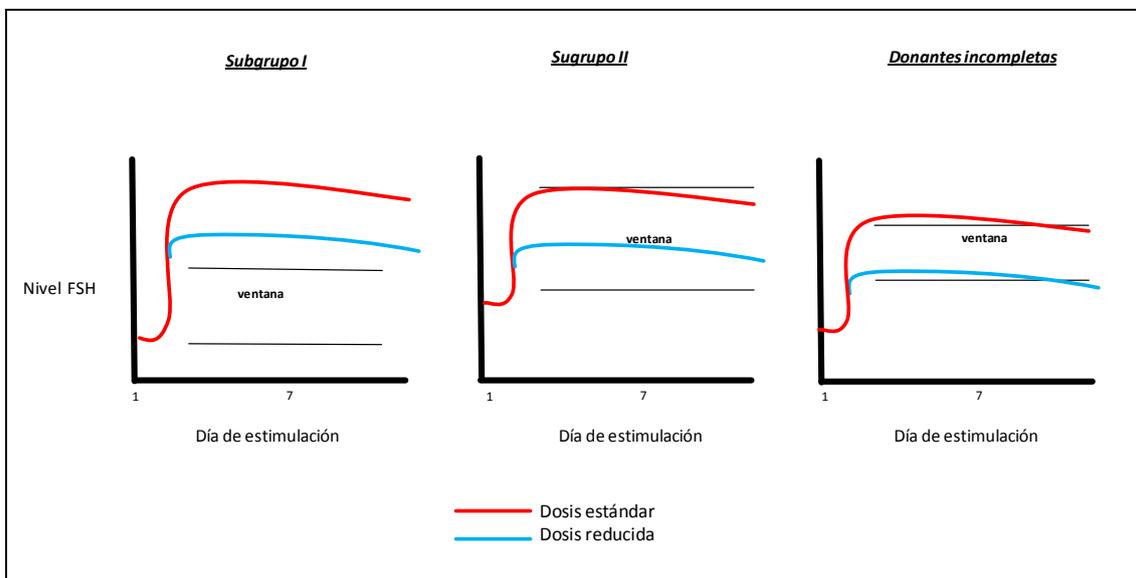


Figura 24. Representación gráfica de cada protocolo de EOC en función de la ventana de FSH de cada subgrupo.

En lo referente a la implantación, muchos factores pueden jugar un papel en ella, no únicamente las aneuploidías embrionarias. En este trabajo, nos hemos centrado en el porcentaje de embriones euploides que alcanzan el estadio de blastocisto en las donantes como medida de la calidad embrionaria y, con los factores uterinos en las receptoras hemos pretendido únicamente que no constituyeran ningún sesgo metodológico.

La evidencia científica ha demostrado que la presencia de aneuploidías en embriones humanos procedentes de ciclos de FIV es considerable y que, independientemente de la estimulación o de la respuesta obtenida, tendremos de 1,8 a 6 embriones euploides por ciclo (Munné *et al.*, 2006c, Baart *et al.*, 2007). Nuestros resultados concuerdan con estos datos y consiguen, en aquellos ciclos que hemos considerado como más eficientes (aquellos cercanos al techo de la FSH) alrededor de 3-4 embriones euploides por ciclo de estimulación (4,1 con dosis estándar en el subgrupo II, 2,9 con dosis estándar en las donantes incompletas y 2,7 con dosis reducida en el subgrupo I). Por el contrario, cuando nos alejamos de este punto, especialmente si es por exceso, nos quedamos con un menor número de embriones con una constitución cromosómica euploide (1,8 para la dosis estándar del subgrupo I). Esto nos permite pensar que una dosis excesiva de gonadotropinas puede comprometer la calidad ovocitaria. Es difícil conocer el mecanismo por el que se produce este proceso aunque se ha sugerido que la existencia de una inmadurez citoplasmática en el momento de la inducción de la ovulación podría jugar un papel determinante (Tarín *et al.*, 1990). En este tipo de pacientes con alta respuesta a la EOC la administración de la hCG se realiza cuando muchos folículos no son todavía maduros, lo cual puede conllevar que su engranaje citoplasmático no sea capaz de llevar a cabo el proceso de segregación cromosómica de forma exitosa.

Por todo ello, debemos tener siempre en mente la conveniencia de una adecuada personalización de los tratamientos, lo cual debe llevarnos a evitar estimulaciones agresivas que, inevitablemente, conllevan una peor calidad embrionaria, un aumento de las tasas de aneuploidía embrionaria y un mayor riesgo de hiperestimulación ovárica. La importante variabilidad individual de la ventana de FSH pone de manifiesto la dificultad de dicha personalización, pero el probable efecto deletéreo de dosis excesivas de gonadotropinas debe permitir que, ante la aparición de una alta respuesta, nos cuestionemos la idoneidad del protocolo aplicado.

7. CONCLUSIONES

1.- La disminución de la dosis de gonadotropinas en donantes altas respondedoras no tuvo una respuesta claramente predecible. De forma global, supuso una disminución de los niveles de E2 y del número de oocitos.

Pero fue posible identificar tres patrones de respuesta tras la disminución de dosis:

- Número similar de oocitos en ambos protocolos (subgrupo I)
- Disminución en, aproximadamente, un 50% del número de oocitos con dosis reducida (subgrupo II)
- Cancelación del ciclo con dosis reducida por baja respuesta

2.- La disminución de la dosis de gonadotropinas en donantes altas respondedoras no tuvo una repercusión directa en cuanto a los parámetros analizados de morfología embrionaria.

3.- En lo referente al desarrollo embrionario, la dosis reducida supuso una mayor tasa de fecundación, un mayor porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto tras ser biopsiados y un mayor porcentaje de embriones cromosómicamente normales con respecto al número total de oocitos MII obtenidos en cada donante de óvulos.

4.- La disminución de la dosis de gonadotropinas en donantes altas respondedoras no supuso, de forma global, un beneficio claro en cuanto al número total de blastocistos cromosómicamente normales disponibles por ciclo de estimulación o en cuanto a tasas de gestación. Sin embargo, un análisis por subgrupos mostró que la dosis más eficiente varía en función de las características individuales.

5.- La valoración de los límites individuales de acción de la FSH (ventana de la FSH) nos ofrece una interpretación fisiológica de los resultados. Aquellos protocolos de EOC que se acercan al techo de la ventana de FSH son los más eficientes (dosis reducida del subgrupo I, dosis estándar del subgrupo II y dosis estándar de las donantes incompletas).

6.- Debemos hacer un esfuerzo por individualizar los tratamientos con el fin de encontrar la dosis mínima eficaz de cada paciente. Incluso en un grupo aparentemente muy homogéneo, como el que ha sido objeto de nuestro estudio, es complicado predecir la respuesta a un protocolo universal.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini DF, Sanfins A and Combelles CM. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6:410–415.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011 Feb; 95(2):520-4
- Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garris J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15:2634–43.
- Alikani M, Schimmel T, Willadsen SM. Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(5):335-44.
- Al-Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17:874–885
- Aytoz A, Van den Abbeel E, Bonduelle M, Camus M, Joris H, Van Steirteghem A, et al. Obstetric outcome of pregnancies after the transfer of cryopreserved and fresh embryos obtained by conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 10:2619–24
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21:223–233
- 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 human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007; 22(4): 980-8.
- Bahceci M, Ulug U, Tosun S, Erden HF, Bayazit N. Impact of coasting in patients undergoing controlled ovarian stimulation with the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix. *Fertil Steril* 2006; 85(5):1523-5.
- Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Isiklar A. Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril* 2001; 75(3):514-8.
- Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(5):608-15.
- Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Fauser BC. Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 78:291–297.
- Beker-van Woudenberg AR, van Tol HT, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol Reprod.* 2004; 70(5):1465-74.

- Bellver J, Albert C, Labarta E, Pellicer A. Early pregnancy loss in women stimulated with gonadotropin-releasing hormone antagonist protocols according to oral contraceptive pill pretreatment. *Fertil Steril* 2007; 87(5):1098-101
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. High rate of mixoploidy among human blastocysts cultured in vitro. *Fertil Steril* 2002a; 78(6):1248-53.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002b; 17:413-419
- Bielanska M, Jin S, Bernier M, Tan SL, Ao A. Diploid-aneuploid mosaicism in human embryos cultured to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2005; 84(2):336-42.
- Boue A, Boue J, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 1985; 14:1-57
- Braude, P., Bolton, V., Moore, S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1998; 332, 459-461.
- Brown JB. Pituitary control of ovarian function – concepts derived from gonadotrophin therapy *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1978; 18 47-55
- Caligara C, Navarro J, Vargas G, Simón C, Pellicer A, Remohí J. The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors. *Hum Reprod* 2001 Nov; 16(11):2320-3.
- Cédric-Durnerin I, Massin N, Galey-Fontaine J et al. Timing of FSH administration for ovarian stimulation in normo-ovulatory women: comparison of an early or a mid follicular phase initiation of a short-term treatment. *Hum Reprod* 2006; 21, 2941-2947.
- Checa MA, Muñoz R, Robles A, Carreras R Optimización de protocolos de estimulación ovárica para conseguir una mejora de la calidad oocitaria. *Cuadernos de medicina reproductiva* 2007; 13: 33-41
- Chenette PE, Sauer MV, Paulson RJ. Very high serum estradiol levels are not detrimental to clinical outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1990; 54(5):858-63
- Chong AP, Rafael RW, Forte CC. Influence of weight in the induction of ovulation with human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1986; 46, 599-603.
- Colls P, 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
- Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD001299 (The Cochrane Collaboration issue 2, Oxford)
- De Jong D, Macklon NS, Fauser BC. A pilot study involving minimal ovarian stimulation for in vitro fertilization: extending the "follicle-stimulating hormone window" combined with the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix. *Fertil Steril* 2000; 73:1051-1054.
- De Klerk C, Heijnen EMEW, Macklon NS, Duivenvoorden HJ, Fauser BCJM, Passchier J, y Hunfeld JAM. The psychological impact of mild ovarian stimulation combined with

- single embryo transfer compared with conventional IVF. *Hum Reprod* 2006; 21 (3), 721-727
- Dechaud H, Ferron G, Anahory T et al. Obesity and assisted reproduction techniques. *Contracept Fertil Sex* 1998; 26:564–567.
 - Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM 1997 Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1999; 755–760
 - Deugarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D, Decherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2008; 90(4):1049-54
 - Devroey P, Bourgain C, Macklon NS, Fauser BC. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:84–90.
 - Devroey P, Boostanfar R, Koper NP, Mannaerts BM, Ijzerman-Boon PC, Fauser BC; ENGAGE Investigators. A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod* 2009; 24(12):3063-72.
 - Eaton, J.L., Hacker, M.R., Harris, D., Thornton, K.L., Penzias, A.S. Assessment of day-3 morphology and euploidy for individual chromosomes in embryos that develop to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2009; 91, 2432–2436.
 - Edwards RG, Lobo R, Bouchard P. Time to revolutionize ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1996; 11:917–919.
 - Egozcue, S., Blanco, J., Vidal, F., Egozcue, J. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum. Reprod* 2002; 17, 5-7.
 - Eichenlaub-Ritter, U., Cucurkam, S., Betzendahl, I. Studies on the aneugenic properties of trichlorfon, a pesticide, vermicide and drug used in the treatment of Alzheimer patients. *Hum. Reprod* 1999; 14: 240-241.
 - Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122,829–838.
 - Ertzeid G, Storeng R. Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. *J Reprod Fertil* 1992; 96(2):649-55.
 - Evers JL: Female subfertility *Lancet* 2002; 360(9327):151-9
 - Fauser BC, Donderwinkel P, Schoot DC. The step-down principle in gonadotrophin treatment and the role of GnRH analogues. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1993; 7(2):309-30.
 - Fauser BC, Devroey P, Yen SS, Gosden R, Crowley WF Jr, Baird DT, Bouchard P. Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks. *Hum Reprod* 1999; 14: 2681–2686.
 - Fauser BCJM: Preimplantation genetic screening: the end of an affair? *Hum Reprod* 2008; 23(12):2622-5
 - Fauser BC, Nargund G, Andersen AN, Norman R, Tarlatzis B, Boivin J, Ledger W. Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later. *Hum Reprod*. 2010; 25(11):2678-84.
 - Felberbaum RE and Diedrich K. Ovarian stimulation for IVF/ICSI with gonadotropins and GnRH analogues: agonist and antagonist. *Hum Reprod* 1999, 14 (Suppl 1),207–221

- Fernández-Shaw S, Pérez Esturo N, Cercas Duque R, Pons Mallol I. Mild IVF using GnRH agonist long protocol is possible: comparing stimulations with 100 IU vs. 150 IU recombinant FSH as starting dose. *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26(2-3):75-82.
- Finn, A., Scott, L., Davies, D., Hill, J., in press. Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. *Reprod Biomed Online.* 2010;21(3):381-90
- FIVCAT.NET. Sistema d'informació sobre reproducció humana assistida. Catalunya 2008. Barcelona, Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, 2008.
- Foote RH and Carney EW: Factors limiting reproductive efficiency in selected laboratory animals., *Ann N Y Acad Sci* 1988; 541:683-96
- Forman R, Fries N, Testart J, et al. Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation. *Fertil Steril* 1988; 49(1):118-22.
- Fragouli E, Bianchi V, Patrizio P, Obradors A, Huang Z, Borini A, Delhanty JD, Wells D. Transcriptomic profiling of human oocytes: association of meiotic aneuploidy and altered oocyte gene expression. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(8):570-82.
- Fritz MA. Perspectives on the efficacy and indications for preimplantation genetic screening: where are we now? *Hum Reprod* 2008; 23(12):2617-21
- Gámiz P, Rubio C, De los Santos MJ, Mercader A, Simón C, Remohí J, Pellicer A. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 11:2413-2419.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73(6):1155-8.
- Gelety TJ, Buyalos RP. The influence of supraphysiologic estradiol levels on human nidation. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12(7):406-12.
- Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K et al. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1999; 14: 2581-7
- Gianaroli L, Magli C, 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; 72:837-844
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Tabanelli C, Gergolet M. Gonadal activity and chromosomal constitution of in vitro generated embryos. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 161(1-2):111-6
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod.* 2007; 22(1):241-9.
- Gleicher N, Vietzke M, Vidali A Bye-bye urinary gonadotrophins? Recombinant FSH: a real progress in ovulation induction and IVF? *Human Reproduction* 2003; 18: 476-482
- Gougeon A, Testart J. Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 1990; 54, 848-852.
- Haaf T, Hahn A, Lambrecht A, Grossmann B, Schwaab E, Khanaga O, Hahn T, Tresch A, Schorsch M. A high oocyte yield for intracytoplasmic sperm injection treatment is associated with an increased chromosome error rate. *Fertil Steril* 2009; 91(3):733-8.

- 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; 23:2806–2812.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, et al: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 1990; 344: 768-770
- Hardarson T, Hanson C, Sjogren A et al. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313-8
- Hardarson, T., Caisander, G., Sjögren, A., Hanson, C., Hamberger, L., Lundin, K., 2003. A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Hum. Reprod.* 18, 399–407.
- Harper J, Coonen E, De Rycke M, Fiorentino F, Geraedts J, Goossens V, Harton G, Moutou C, Pehlivan Budak T, Renwick P, Sengupta S, Traeger-Synodinos J, Vesela K. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod.* 2010; 25(4):821-3.
- Hassold T and Hunt P: To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001; 2(4):280-91
- Hassold TJ. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am J Med Genet* 1980; 32:723–30
- Hassold, T., Abruzzo, M., Adkins, K., Griffin, D., Merrill, M., Millie, E., Saker, D., Shen, J., Zaragoza, M. Human aneuploidy: Incidence, origin and etiology. *Env. Mol. Mutagen* 1996; 28, 167-175.
- Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C, Polinder S, Beckers NG, Klinkert ER, Broekmans FJ, Passchier J, Te Velde ER, Macklon NS et al. A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial randomized trial. *Lancet* 2007; 369:743–749.
- Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:841–847.
- Hodges CA, Ilagan A, Jennings D, Keri R, Nilson J and Hunt PA. Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod* 2002; 17:1171–1180.
- Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril* 1982; 38, 281–300.
- Hohmann FP, Laven JS, de Jong FH, Eijkemans MJ, Fauser BC.. Low-dose exogenous FSH initiated during the early, mid or late follicular phase can induce multiple dominant follicle development. *Hum Reprod* 2001; 16, 846–854.
- Hohmann FP, Macklon NS, Fauser BC. A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:166–173.

- Højgaard A, Ingerslev HJ y Dinesen J. Friendly IVF: patient opinions. *Hum Reprod* 2001; 16, 1391-1396.
- Huirne JA, Lambalk CB, van Loenen AC, Schats R, Hompes PG, Fauser BC, Macklon NS. Contemporary pharmacological manipulation in assisted reproduction. *Drugs* 2004a; 64:297-322
- Humaidan P, Bungum L, Bungum M, Andersen CY. Ovarian response and pregnancy outcome related to mid-follicular LH levels in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and recombinant FSH stimulation. *Hum Reprod* 2002; 17:2016-2021.
- Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1998 Jul; 70(1):60-6.
- Jacobs MH, Balasch J, Gonzalez-Merlo JM, Vanrell JA, Wheeler C, Strauss III JF, Blasco L, Wheeler JE, Lyttle CR. Endometrial cytosolic and nuclear progesterone receptors in the luteal phase defect. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:472-475
- Jacobs, P.A., Hassold, T.J. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv. Genet* 1995; 33, 101-133.
- Jain A, Robins JC, Williams DB, Thomas MA. The effect of multiple cycles in oocyte donors. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192(5):1382-4;
- Janny L, Menezo YJ. Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(1):31-7.
- Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:521-527.
- Keskindepe L, Sher G, Keskindepe M. Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: comparison between fluorescence in-situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online* 2007; 15(3):303-9.
- Klein NA, Harper AJ, Houmard BS et al. Is the short follicular phase in older women secondary to advanced or accelerated dominant follicle development? *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5746-5750.
- Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A, Devroey P. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002; 78:1025-1029
- Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2006a; 12: 651-671
- Kovalevsky G, Patrizio P. High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril*. 2005; 84(2):325-30.

- Land J, Yarmolinskaya MI, Dumoulin JC, Evers JC. High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1996; 65, 961-965
- Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL. Susceptible chiasmata configurations of chromosome 21 predispose to non-disyuntion in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nature Genet* 1996; 14, 400-405.
- Lee ST, Kim TM, Cho MY, Moon SY, Han JY, Lim JM. Development of a hamster superovulation program and adverse effects of gonadotropins on microfilament formation during oocyte development. *Fertil Steril* 2005; 83 Suppl 1:1264-74.
- Lightfoot DA, Kouznetsova A, Mahdy E, Wilbertz J and Hoog C. The fate of mosaic aneuploid embryos during mouse development. *Dev Biol* 2006; 289,384–394.
- Luk J, Arici A. Does the ovarian reserve decrease from repeated ovulation stimulations? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22(3):177-82.
- Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C, Renou P. Nature. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature* 1984; 307(5947):174-5.
- Ma S, Philipp T, Zhao Y, Stetten G, Robinson WP, Kalousek D. Frequency of chromosomal abnormalities in spontaneous abortions derived from intracytoplasmic sperm injection compared with those from in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006; 85(1):236-9.
- Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev* 2006; 27:200-214.
- Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman L, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15: 1781–6.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183:29 –34.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Esposito F, Fasolino MC. The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod* 2004; 19: 1163-9
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007; 87(3):534-41.
- Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2009; 91(2):305-15.
- Manor D, Kol S, Lewit N et al: Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum Reprod* 1996; 11 (11): 2502-2506.
- Manor D, Stein D, Itskovitz-Eldor J Preimplantation diagnosis by FISH: the Rambam experience. *J Assist Reprod Genet* 1998, 15(5): 308-309
- Marchini M, Fedele L, Bianchi S, Losa GA, Ghisletta M, Candiani GB. Secretory changes in preovulatory endometrium during controlled ovarian hyperstimulation with buserelin acetate and human gonadotropins. *Fertil Steril* 1991; 55:717–721

- Marquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1,225 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000; 1:17–26.
- Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(4):523-31
- Martínez MC, Méndez C, Ferro J, Nicolás M, Serra V, Landeras J. Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. *Fertil Steril* 2010; 93 (1): 289-92
- 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(1):9-17.
- Mastenbroek S, Scriven P, Twisk M, Viville S, Van der Veen F, Repping S. What next for preimplantation genetic screening? More randomized controlled trials needed? *Hum Reprod* 2008; 23(12):2626-8;
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(4):454-66.
- Mercader A, Valbuena D, Simón C. Human embryo culture. *Methods Enzymol*. 2006; 420:3-18.
- Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9(5):511-20.
- Michiels A, Van Assche E, Liebaers I, Van Steirteghem A, Staessen C. The analysis of one or two blastomeres for PGD using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2006; 21:2396–2402.
- Milán M, Cobo AC, Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendía P, Peinado V, Delgado A, Mir P, Simón C, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online* 2010; 21(5):649-57.
- Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Pellicer A, Remohí J, Rubio C. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010; 25(7):1812-7.
- Mitwally MF, Bhakoo HS, Crickard K, Sullivan MW, Batt RE, Yeh J. Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with treatment outcome in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2006; 86(3):588-96.
- Moayeri SE, Allen RB, Brewster WR, Kim MH, Porto M, Werlin LB.. Day-3 embryo morphology predicts euploidy among older subjects. *Fertil Steril* 2008; 89(1):118-23;
- Munné S, Weier HU, Stein J, Grifo J, Cohen J. A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10:82–90
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen S. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 4:382–91.

- Munne 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. *Hum Reprod* 1997; 12:780–784.
- Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998; 4(6):842-55.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* 2002; 4:223–32
- 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; 7:91–97.
- Munné S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn.* 2004; 24(8):638-43.
- 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* 2006a; 85:326–332
- Munné S: Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *RBM Online* 2006b; 12:234-253.
- 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* 2006c; 12(3):340-6.
- Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M, Tomkin G, Cohen J. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *RBM online* 2007; 14, 5:628-634
- Munné S, Wells D, Cohen J. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril* 2010; 94 (2): 408-30
- Nagy ZP, Dozortsev D, Diamond M, Rienzi L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril.* 2003; 80(1):67-74.
- Nargund G, Waterstone J, Bland J, et al. Cumulative conception and live birth rates in natural (unstimulated) IVF cycles. *Hum Reprod.* 2001; 16(2):259-62.
- Nasser A, Mukherjee T, Grifo JA, Noyes N, Krey L, Copperman AB. Elevated day 3 serum follicle stimulating hormone and/or estradiol may predict fetal aneuploidy. *Fertil Steril.* 1999; 71(4):715-8.
- Nekkebroeck J, Bonduelle M, Desmyttere S, van den Broeck W, Ponjaert-Kristoffersen I. Mental and psychomotor development of 2-year-old children born after preimplantation genetic diagnosis/screening. *Hum Reprod* 2008; 23:1560–1566.
- Nelson JR, Potter DA, Wilcox JG, Frederick JL, Kolb BA, Behr BR. Preimplantation genetic diagnosis in embryos generated from oocyte donation. *Fertil Steril* 2005; 84 (1). P-492.
- Nicolaidis, P., Petersen, M.B. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum. Reprod* 1998; 13, 313-319.

- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1400-8
- O'Brien K, Lazar E, Athanassiou A, Ravnikar V. Ovarian hyperstimulation syndrome associated with fetal trisomy 21. *J Perinatol* 2009; 29(5):388-90.
- Palmero GD, Neri QV, Hariprashad JJ, Davis OK, Veeck LL, Rosenwaks Z. ICSI and its outcome. *Semin Reprod Med* 2000; 18:161-9
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, et al: Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence "in situ" hybridization: clinical possibilities and pitfalls. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10(6): 315-322.
- Pellicer A, Valbuena D, Cano F, Remohí J, Simón C. Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril.* 1996; 65(6):1190-5.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, et al: In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril*, 1999, 71: 1033-1039
- Pelinck MJ, Vogel NE, Hoek A, Arts EG, Simons AH, Heineman MJ. Minimal stimulation IVF with late follicular phase administration of the GnRH antagonist cetrorelix and concomitant substitution with recombinant FSH: a pilot study. *Hum Reprod* 2005; 20(3):642-8.
- Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Carmona F, Casamitjana R et al. Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycle stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005, 20: 622-628
- Peñarrubia J. Etiología y teorías sobre baja respuesta. En: García-Velasco, JA y Remohí J. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 2007; 13,9-21
- Plachot M. Chromosome analysis of spontaneous abortions after IVF. A European survey. *Hum Reprod.* 1989; 4(4):425-9.
- Polinder S, Heijnen EM, Macklon NS, Habbema JD, Fauser BJ, Eijkemans MJ. Cost-effectiveness of a mild compared with a standard strategy for IVF: a randomized comparison using cumulative term live birth as the primary endpoint. *Hum Reprod* 2008; 23:316-323.
- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Guidelines on number of embryos transferred. *Fertil Steril.* 2006; 86(5 Suppl 1):S51-2.
- Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, Gale S, O'Leary T, Jackson KV. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6(3):323-31.
- Raga F, Bonilla-Musoles F, Casañ EM, Bonilla F. Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulation hormone and oestradiol: improved reproductive outcome. *Hum Reprod* 1999, 14, 1431-1434.
- Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002; 78(3):515-9.

- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005; 10(5):669-81.
- 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(3):656-7.
- Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos clínicos 2008a. 3ª edición. Capítulo 16. Estimulación ovárica con agonistas de la GnRH. Protocolo largo, p. 179-188
- Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Aspectos clínicos 2008a. 3ª edición. Capítulo 17. Estimulación ovárica con agonistas de la GnRH. Flare y Microflare, p. 189-197
- Roberts, C.G., O'Neill. Increase in the rate of diploidy with maternal age in unfertilised *in-vitro* fertilization oocytes. *Hum. Reprod* 1995; 10: 2139-2141.
- Roberts R, Iatropoulou A, Ciantar D, Stark J, Becker DL, Franks S, Hardy K. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 2005; 72:107-118.
- Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendía P, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. Rescue of false monosomies in a PGD program using subtelomeric probes. In: Poster 17. 12th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy (ISPD), Budapest. Final program and abstracts, 2004, 14
- Rombauts L, Suikkari AM, Mac Lachlan V, Trounson AO, Healy DL. Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril* 1998, 69, 665-669.
- Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod*. 2003; 18(1):182-8.
- 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: 748-756.
- Rubio C, Giménez C, Fernández E, Vendrell X, Velilla E, Parriego M, Rodrigo L; Spanish Interest Group in Preimplantation Genetics, Spanish Society for the study of the biology of reproduction. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum Reprod*. 2009; 24(8):2045-7.
- Rubio C, Peinado V, Méndez C et al. Capítulo 14. El laboratorio de PGD. Título oficial de Master de Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida. Posgrados oficiales, 2010. Universidad de Valencia
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril*. 2001; 76(6):1150-6.
- Sandalinas M, Márquez C, Munné S. Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 2002; 8 (6): 580-5
- 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.

- Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van Opstal D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ, de Vreeden-Elbertse J, Fauser BC, Baart EB. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. *Hum Reprod.* 2010; 25(8):1916-26
- Schipper I, Hop WC, Fauser BC. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83, 1292–1298.
- 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* 2009; 92(1):157-62
- Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online.* 2003 Mar; 6(2):201-14.
- Shahine LK, Kuppermann M, Davis G, Creasman J, Cedars MI. Patient willingness to participate in a clinical trial with preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2008; 89:879–884.
- Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Implantation and pregnancy rates are higher for oocyte donor cycles after blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril.* 2002; 77(6):1296-7.
- Sharara FI, McClamrock HD. High estradiol levels and high oocyte yield are not detrimental to in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1999;72(3):401-5
- Simón C, Cano F, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod.* 1995; 10(9):2432-7.
- Staessen C, Van Steirteghem AC. The genetic constitution of multinucleated blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum. Reprod* 1998; 13, 1625–1631
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A 2004 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* 19: 2849–2858.
- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 2008; 23:2818–2825
- Steer C, Campbell S, Davies M, Mason B, Collins W: Spontaneous abortion rates after natural and assisted conception. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1989; 299(6711):1317-1318
- Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 7: 366
- Strandell A, Bergh C, Lundin K. Selection of patients suitable for one-embryo transfer may reduce the rate of multiple births by half without impairment of overall birth rates. *Hum Reprod* 2000; 15: 2520-5.
- Surrey Es, Bower JA, Hill DM, Ramsey J, Surrey MW. Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998; 69, 419-424.

- Tarín JJ, Pellicer A. Consequences of high ovarian response to gonadotropins: a cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Fertil Steril*. 1990; 54(4):665-70.
- Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L, Devroey P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 2006; 12:333–340.
- Taylor A ABC of subfertility. Making a diagnosis. *BMJ*. 2003 Aug 30;327(7413):494-7
- Templeton A, Morris JK. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *N Engl J Med* 1998;339: 573–577
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*. 1999; 14(5):1318-23.
- Uher P, Baborova P, Kralickova M, Zech MH, Verlinsky Y, Zech NH. Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a third round of re-hybridization. *RBM-Online* 2009;19(4):539-46
- Valbuena D, Jasper M, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1999; 14(Suppl 2):107–111.
- Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril*. 2001; 76(5):962-8.
- Van Blerkom J, Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod*. 2001; 16(4):757-64.
- Van Santbrink EJ, Hop WC, Van Dessel TJ et al. Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1995; 64, 37–43.
- Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, et al: Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod* 1998; 13(11): 3619-3176.
- Verberg MFG, Eijkemans MJC, Macklon NS, Heijnen EMEW, Fauser BCJM and Broekmans FJ. Predictors of low response to mild ovarian stimulation initiated on cycle day5 for IVF. *Hum Reprod* 2007; 22, 1919-1924.
- Verberg MFG, Eijkemans MJC, Macklon NS, Heijnen EMEW, Baart EB, Hohmann FP, Fauser BCJM, Broekmans FJ. The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009a; 15:5–11.
- Verberg MFG, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P, Broekmans FJ and Fauser BCJM. Mild ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 2009b; 15: 13-29.
- Verpoest W, Fauser BC, Papanikolaou E, Staessen C, Van Landuyt L, Donoso P, Tournaye H, Liebaers I, Devroey P. Chromosomal aneuploidy in embryos conceived with unstimulated cycle IVF. *Hum Reprod*. 2008; 23(10):2369-71
- Vidal F, Giménez C, Rubio C, et al: FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet*, 1998, 15(5): 310-313

- Wells D, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe M. High pregnancy rate after comprehensive chromosomal screening of blastocysts. *Fertil Steril* 2008; 90:S80
- Westergaard HB, Johansen AM, Erb K, Andersen AN. Danish National IVF Registry 1994 and 1995. Treatment, pregnancy outcome and complications during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:384–9
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001; 345: 1537-1571.
- Yang JH, Chen HF, Lien YR, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Elevated E2: oocyte ratio in women undergoing IVF and tubal ET. Correlation with a decrease in the implantation rate. *J Reprod Med* 2001; 46(5):434-8
- Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K and Hoog C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 2002; 296, 1115–1118.
- Zaragoza, M.V., Surti, U., Redline, R.W., Millie, E., Chakravarti, A., Hassold, T.J. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatiform mole. *Am J Hum Genet* 2000; 66, 1807-1820.
- Zeleznik AJ and Hillier SG. The role of gonadotropins in the selection of the preovulatory follicle *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1984; 27 927–940
- Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KLT, Loft A, Lindhard A, Nyboe Andersen A. Embryo quality in natural versus stimulated cycles. *Hum Reprod* 2004; 19:1457–1460.
- Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, Nyboe Andersen A, Selleskog U, Nielsen D, Grøndahl C, Kim H, Arce JC; CEMAS II and Study Group. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. *Hum Reprod* 2003; 18(12):2575-81.

9. ANEXOS

9.1 COMITÉ ÉTICO



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
Instituto Valenciano de Infertilidad

D. Josep Lluís Romero i Carbonell, en calidad de secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto Valenciano de Infertilidad.

CERTIFICA

Que éste Comité ha evaluado el proyecto de investigación presentado por el Dr. José Remohí Jimenez titulado:

"Influencia de la estimulación ovárica en las Anomalías Cromosómicas Embrionarias."

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

En consecuencia, éste Comité acepta que dicho ensayo clínico sea realizado en el Instituto Valenciano de Infertilidad por el Dr. José Remohí Jimenez

Lo que firmo en Valencia a 09 de Febrero de 2.004



Firmado: Josep Lluís Romero

Plaza de la Païçola Nova, 3. 46015 VALENCIA. T-1 96 305 05 00. Fax 96 305 05 39. info@ivi.es www.ivi.es

9.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: INFLUENCIA DE LA ESTIMULACION OVARICA EN LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EMBRIONARIAS.

CÓDIGO DEL PROMOTOR:

PROMOTOR:

INVESTIGADOR PRINCIPAL *Dr. José Remohí (joseremohi@ivi.es)*

CENTROS: IVI-Valencia e IVI-Alicante

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Nos ha sido explicado que una de las causas del fallo en la implantación embrionaria es la anomalía cromosómica y que no está del todo establecido el papel que dicha causa puede tener en los diferentes contextos de la reproducción asistida.

Dentro del tratamiento de donación de oocitos/fecundación *in vitro* que vamos a iniciar nos ha sido expuesto que es posible estudiar los cromosomas de nuestros embriones sin comprometer la posibilidad de éxito del ciclo, sin gasto añadido y sin que suponga el tener que repetir dicho estudio en el supuesto de un eventual ciclo futuro. De hecho, se nos ha explicado que con dicho estudio se promueve la transferencia a la cavidad uterina de embriones con dotación normal de los pares cromosómicos estudiados, lo que en teoría aumentaría la probabilidad de éxito del tratamiento.

Hemos comprendido que la finalidad de dicho estudio es el conocimiento de las posibles variables relacionadas a la producción de embriones cromosómicamente anormales. En este sentido, se nos ha informado sobre los procedimientos, aproximaciones diagnósticas que se pueden realizar, posibilidades de éxito, limitaciones y riesgos de las mismas. Ha quedado claro también que el diagnóstico genético

preimplantacional no sustituye ni tampoco dispensa la realización de una eventual amniocentesis, cuando esté indicada.

Somos concientes que la realización del diagnóstico genético previamente descrito está condicionada en nuestro caso a la disponibilidad de un número mínimo de embriones con características adecuadas para dicho proceso. Si no se da esa condición, sabemos que el ciclo de tratamiento se realizará dentro de la pauta definida a nuestro diagnóstico de esterilidad.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

La participación en este estudio no implica ningún riesgo adicional para la paciente ni para su tratamiento y presenta la posibilidad de beneficiarse de forma gratuita de la posibilidad de transferir un embrión normal para los cromosomas analizados.

TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS

En caso de no participar en este estudio la paciente sería sometida a un ciclo de donación de oocitos en el que los embriones resultantes serían transferidos al útero sin realizar un estudio cromosómico de los mismos y basándose en su selección para transfer en base a la morfología embrionaria.

SEGURO

El Promotor del estudio dispone de una póliza de seguros que se ajusta a la legislación vigente y que le proporcionará la compensación e indemnización en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse en relación con su participación en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del

estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Para la realización del estudio el promotor del mismo ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio.

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto usted no tendrá que pagar por los el gasto extra que representaría el análisis cromosómico de los embriones

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad. Por lo tanto, ni el investigador ni el promotor adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.