



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

PROGRAMA DE DOCTORADO: 290F

OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA II

**INFLUENCIA DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA DURANTE UN
TRATAMIENTO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA INCIDENCIA
DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS**

Trabajo de Tesis Doctoral

Presentado por Dña. M^a Elena Labarta Demur

Directores

Prof. Dr. D. Antonio Pellicer Martínez

Dr. D. Ernesto Bosch Aparicio

Valencia, 2014

**Memoria de Tesis Doctoral para optar al
grado de Doctor en Medicina y Cirugía**

Lugar de realización:

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Valencia

Facultad a la que está adscrita:

Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Título:

Influencia de la Estimulación Ovárica durante un Tratamiento de
Fecundación *in Vitro* en la Incidencia de Aneuploidías Embrionarias

Autora:

M^a Elena Labarta Demur
Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Zaragoza

Directores:

Prof. Dr. D. Antonio Pellicer Martínez
Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Universidad de Valencia

Dr. D. Ernesto Bosch Aparicio
Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)



Prof. Dr. D. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Presidente del Instituto Valenciano de Infertilidad.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

INFLUENCIA DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA DURANTE UN TRATAMIENTO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS

Ha sido realizado íntegramente por Dña. Elena Labarta Demur bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 4 de Mayo de 2014.

Fdo. Antonio Pellicer





Dr. D. Ernesto Bosch Aparicio, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia, y Director Médico del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

INFLUENCIA DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA DURANTE UN TRATAMIENTO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS

Ha sido realizado íntegramente por Dña. Elena Labarta Demur bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 4 de Mayo de 2014.

Fdo. Ernesto Bosch

AGRADECIMIENTOS

Tras muchos años de dedicación a esta tesis doctoral, miro hacia atrás y me doy cuenta de que son muchas las personas que me han apoyado y han colaborado en la realización de la misma. No puedo nombrar a todas ellas, pero desde aquí les doy las gracias por su pequeña o gran aportación en este proyecto.

He tenido la suerte de contar con dos grandes personas como directores de tesis, Antonio Pellicer y Ernesto Bosch.

A Toni quiero mostrar mi gratitud infinita por su idea original, por impulsarme a realizar este trabajo, por su confianza en mí, y por enseñarme muchas cosas, pues lo considero un ejemplo a seguir de constancia y esfuerzo.

A Ernesto, sobretodo por su ayuda incondicional y por estar a mi lado, pero también por sus prácticos consejos en la elaboración de la tesis, por el apoyo estadístico y sus ingeniosas ideas.

A Marco Melo al principio, y a Pilar Alamá -Directora del departamento de donación de óvulos- desde principio a fin, por colaborar en el reclutamiento de las donantes de óvulos candidatas para entrar en el estudio. Gracias por vuestro tiempo y dedicación, además de por vuestra amistad. Gracias también a María José Ferri y a Mar Diana, del departamento de donación, por su tiempo.

Igualmente quiero dar las gracias al departamento de Diagnóstico Genético Preimplantacional sin el cual este trabajo no podría haberse realizado, sobretodo a Carmen Rubio y a Lorena Rodrigo, que han estado allí en toda la trayectoria, dedicando horas de trabajo a este proyecto, estando siempre disponibles y poniendo las cosas fáciles. A Amparo Mercader, Pilar Buendía, Arantxa Delgado y Emilia Mateu, que han llevado a cabo la biopsia embrionaria y la interpretación de resultados en cada caso, por su experiencia y buen hacer.

Quiero felicitar al departamento de andrología por su entusiasmo y dedicación a este trabajo. Gracias a Nicolás Garrido, director del departamento, así como a Isabel Cortes, Alicia M, Carol, Yolanda, Paloma y Alicia Z.

Debo mostrar también mi gratitud a todos y cada uno de los biólogos y técnicos del laboratorio de FIV, por la pulcritud en su trabajo y dedicación al estudio. Debo destacar a la directora del laboratorio de FIV, Maria José de los Santos, por sus sabios consejos y sugerencias en la elaboración de este proyecto.

Especial mención merecen los excelentes ginecólogos del departamento de Reproducción Humana de IVI Valencia, que han colaborado en el reclutamiento de pacientes candidatas a entrar en el estudio. Gracias a los doctores Pepe Remohí, Carlos Simón, Juana Crespo, Pepe Bellver, Carmina Vidal y Juan Giles por su buen hacer, compañerismo y amistad.

Al departamento del laboratorio general, con José Luis Zuzuarregui a la cabeza, por todas las determinaciones hormonales realizadas a las donantes de óvulos.

Gracias a Merck Serono, y especialmente a Marcel Vázquez como delegado de dicho laboratorio farmacéutico, que me ofreció una ayuda económica desinteresada para cubrir todos y cada uno de los costes derivados de la realización de este trabajo. Sin esa aportación, este proyecto no se hubiera realizado.

Por último, y entrando en el terreno más personal, quería mostrar mi amor y agradecimiento a mis padres, sin los cuales no hubiera llegado hasta aquí. A mis hijos, por hacerme sonreír cada día y motivarme a ser mejor persona. A Ernesto, mi amor, por todo.

A mi familia....

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	16
INDICE DE FIGURAS	17
INDICE DE TABLAS	18
INTRODUCCIÓN	19
RESUMEN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA	21
ANTECEDENTES	23
ESTIMULACIÓN OVÁRICA PARA FIV. GENERALIDADES	23
TIPOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA SEGÚN TERMINOLOGÍA ISMAAR	25
CICLO NATURAL/NATURAL MODIFICADO PARA FIV	26
CRIBADO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL COMO PROCEDIMIENTO PARA VALORAR LA CALIDAD EMBRIONARIA	28
Fundamentos del FISH	28
Anomalías cromosómicas numéricas y estructurales	30
Mosaicismo	31
Limitaciones del FISH para PGS	34
Origen de las aneuploidías	36
EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA SOBRE LA CALIDAD EMBRIONARIA	38
Modelo animal	38
Modelo humano	40
EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA SOBRE LA CONSTITUCIÓN CROMOSÓMICA EMBRIONARIA	42
Estimulación ovárica y poliploidías en el modelo animal	42
Estimulación ovárica y aneuploidías en el modelo animal	43
Estimulación ovárica y poliploidías en el modelo humano	44
Estimulación ovárica y aneuploidías en el modelo humano	45
TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y RESULTADOS NEONATALES	49
TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA E IMPRONTA GENÉTICA	51
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO	54
OBJETIVOS	55
PRINCIPAL	55
SECUNDARIOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	57
AMBITO DEL ESTUDIO	59
DISEÑO DEL ESTUDIO	59
POBLACIÓN DEL ESTUDIO	59
Criterios de inclusión y exclusión	60
PROCEDIMIENTOS	61
Fase folicular	61
Punción folicular o aspiración ovocitaria	63

INDICE

Procedimientos del laboratorio de FIV	64
Preparacion endometrial en las receptoras de gametos	67
PROTOCOLO	68
METODOS ESTADÍSTICOS	70
CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	70
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
RESULTADOS	71
FLUJO DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO	73
FASE 1: CICLO NO ESTIMULADO	73
FASE 2: CICLO ESTIMULADO	73
CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO	75
FASE FOLICULAR Y DESARROLLO EMBRIONARIO	75
RESULTADOS DEL PGS EN CICLO NO ESTIMULADO Y CICLO ESTIMULADO	79
RELACIÓN ENTRE EL RESULTADO DEL CICLO NO ESTIMULADO Y ESTIMULADO EN LA MISMA DONANTE	81
EMBRIONES EUPLOIDES POR DONANTE EN UN CICLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA	82
EMBRIONES EUPLOIDES, ANEUPLOIDES Y NO BIOPSIADOS EN CADA UNO DE LOS 46 CASOS EN EL CICLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA	83
RELACIÓN ENTRE RESPUESTA OVÁRICA Y NÚMERO ABSOLUTO DE EMBRIONES EUPLOIDES, ANEUPLOIDES Y NO BIOPSIABLES	84
MEDIA DE EMBRIONES EUPLOIDES POR DONANTE EN FUNCIÓN DE SI LA RESPUESTA OVÁRICA ERA INFERIOR O SUPERIOR A LA MEDIANA	90
RELACIÓN ENTRE RESPUESTA OVÁRICA Y TASA DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS	92
RELACIÓN ENTRE DOSIS DE GONADOTROPINAS Y TASA DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS	94
TIPO DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN AMBOS CICLOS	95
RECONFIRMACIÓN	96
RESULTADOS GESTACIONALES EN LAS RECEPTORAS DE GAMETOS	97
DISCUSION	99
ACERCA DE LA HIPÓTESIS Y LOS OBJETIVOS DE TRABAJO	101
ACERCA DE LA METODOLOGÍA	103
TAMAÑO MUESTRAL	103
UN ANÁLISIS EXHAUSTIVO DEL CICLO NO ESTIMULADO	104
POBLACIÓN DE ESTUDIO HOMOGÉNEA	109
LA COMPARACIÓN INTRASUJETO ENTRE AMBOS PROTOCOLOS DE ESTUDIO	110
REPRODUCTIBILIDAD DE LOS DATOS EN POBLACIÓN DIFERENTE	111
EL FISH COMO TÉCNICA	112
LA NO BIOPSIA DE LOS EMBRIONES DETENIDOS	113
BIOPSIA DE UNA SOLA BLASTÓMERA. EL FENÓMENO DEL MOSAICISMO	114

ACERCA DE LOS RESULTADOS	115
COMPARACIÓN DE LA DINÁMICA FOLICULAR ENTRE EL CICLO NO ESTIMULADO Y EL CICLO ESTIMULADO	115
COMPARACIÓN EN LA TASA DE ANEUPLOIDÍAS ENTRE EL CICLO NO ESTIMULADO Y EL CICLO ESTIMULADO	116
IMPORTANCIA DE LAS DOSIS DE GONADOTROPINAS ADMINISTRADAS DURANTE LA ESTIMULACIÓN	117
IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA OVÁRICA A LA ESTIMULACIÓN	121
COMPARACIÓN ENTRE LA TASA DE ANEUPLOIDÍAS OBSERVADA EN LAS DONANTES DE OVOCITOS DE NUESTRO ESTUDIO CON LA HISTÓRICA	124
LA IMPORTANCIA DEL NÚMERO ABSOLUTO DE EMBRIONES EUPLOIDES POR CICLO EN COMPARACIÓN CON EL PORCENTAJE DE ANEUPLOIDÍAS	125
CORRELACIÓN ENTRE EL RESULTADO DEL PGS EN EL CICLO NO ESTIMULADO Y EN EL CICLO ESTIMULADO	126
RESULTADOS GESTACIONALES	126
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXOS	161
ANEXO 1: INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA	163
ANEXO 2: HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LAS RECEPTORAS DE GAMETOS	165
ANEXO 3: HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LAS DONANTES DE ÓVULOS	171
ANEXO 4: ARTÍCULO PUBLICADO	177

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico	MI: Metafase I
aCGH: arrays-hibridación genómica comparada, del inglés <i>arrays comparative genomic hybridization</i>	MII: Metafase II
CC: Citrato de clomifeno	OR: Odds Ratio
CEP: Sonda dirigida a secuencias centroméricas, del inglés <i>Chromosome-specific centromeric enumeration probes</i>	P: Progesterona
CN: Ciclo natural	PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
CNM: Ciclo natural modificado	PGS: Cribado genético preimplantacional, del inglés <i>Preimplantational Genetic Screening</i>
CP: Corpúsculo Polar	PGD: Diagnóstico genético preimplantacional, del inglés <i>Preimplantational Genetic Diagnosis</i>
E2: Estradiol	PMSG: gonadotropina sérica de yegua preñada, del inglés <i>pregnant mare serum gonadotropin</i>
EO: Estimulación ovárica	rCG: coriogonadotropina recombinante, del inglés <i>recombinant coriogonadotropin</i>
FISH: Hibridación in situ fluorescente, del inglés <i>Fluorescence in Situ Hybridization</i>	RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, del inglés <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
FIV: Fecundación <i>in vitro</i>	RN: Recién nacido/ RNV: Recién nacido vivo
FSH: Hormona foliculoestimulante, del inglés <i>Follicle Stimulating Hormone</i>	RR: Riesgo relativo
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, del inglés <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>	SHO: Síndrome de hiperestimulación ovárica
hCG: gonadotropina coriónica humana, del inglés <i>human coriogonadotropin</i>	SOP: Síndrome de ovario poliquístico
hMG: gonadotropina menopaúsica humana, del inglés <i>human menopausal gonadotropin</i>	SNP: Polimorfismo de nucleótido simple, del inglés <i>single nucleotide polymorphism</i>
hp-hMG: gonadotropina menopaúsica humana altamente purificada, del inglés <i>highly purified human menopausal gonadotropin</i>	TE: Transferencia embrionaria
IC: Intervalo de Confianza	TRA: Técnicas de Reproducción Asistida
ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, del inglés <i>intracytoplasmic sperm injection</i>	UI: Unidades Internacionales
IGF-II: factor de crecimiento de insulina, del inglés <i>insulin growth factor II</i>	VE: Valerianato de Estradiol
IMC: Índice de Masa Corporal	VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>
LH: Hormona luteinizante, del inglés <i>luteinizing hormone</i>	VG: Vesícula Germinal
LSI: Sonda específica de locus, del inglés <i>Locus Specific Identifier</i>	VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
	ZP: Zona Pelúcida

<i>Figura 1: Procedimientos llevados a cabo durante la fase folicular del ciclo no estimulado (figura 1A) y del ciclo estimulado (figura 1B).....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 2: Protocolo del estudio. Las donantes de óvulos son sometidas a un ciclo no estimulado y posteriormente a un ciclo de estimulación ovárica controlada.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 3: Flujo de la población del estudio.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 4: La figura 4A (izquierda) muestra la tasa de aneuploidias total en el ciclo no estimulado (46 embriones analizados) y en el ciclo estimulado (303 embriones analizados procedentes de 46 ciclos). La figura 4B (derecha) muestra la comparación intrasujeto de la media de tasa de aneuploidías de cada una de las donantes (46 casos de ciclo no estimulado vs. 46 casos de ciclo estimulado).</i>	<i>81</i>
<i>Figura 5: Diagrama de cajas y bigotes del número de embriones euploides por donación en el ciclo estimulado.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 6: Número de embriones euploides, aneuploides y no biopsiables en cada caso individual (n=46) en el ciclo de estimulación ovárica.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 7: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con el número total de embriones euploides por donante.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 8: Correlación entre número de ovocitos metafase II con el número total de embriones euploides por donante.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 9: Correlación entre número de ovocitos fecundados con el número total de embriones euploides por donante.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 10: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con el número total de embriones aneuploides por donante.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 11: Correlación entre número de ovocitos metafase II con el número total de embriones aneuploides por donante.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 12: Correlación entre número de ovocitos fecundados con el número total de embriones aneuploides por donante.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 13: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con el número total de embriones no biopsiables por donante.</i>	<i>88</i>
<i>Figura 14: Correlación entre número de ovocitos Metafase II con el número total de embriones no biopsiables por donante.</i>	<i>88</i>
<i>Figura 15: Correlación entre número de ovocitos fecundados con el número total de embriones no biopsiables por donante.</i>	<i>89</i>
<i>Figura 16: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con la tasa de aneuploidías embrionarias.....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 17: Correlación entre número de ovocitos metafase II con la tasa de aneuploidías embrionarias.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 18: Correlación entre número de ovocitos fecundados con la tasa de aneuploidías embrionarias.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 19: Correlación entre dosis total de gonadotropinas administradas con la tasa de aneuploidías embrionarias.</i>	<i>94</i>

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Análisis descriptivo de los parámetros de la fase folicular y del desarrollo embrionario de los 51 ciclos no estimulados y de los 46 ciclos estimulados en los cuales se llevó a cabo el FISH-PGS.</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 2: Análisis comparativo entre parámetros del laboratorio de FIV en ambos ciclos.</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 3: Resultados del PGS de 46 donantes que completaron el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 4: Distribución del número de blastocistos euploides en el ciclo estimulado. El percentil 50 corresponde a la mediana.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 5: Media ± desviación estándar, mediana y rango intercuartil de los parámetros de respuesta ovárica en el ciclo estimulado (número de ovocitos totales, ovocitos MII y ovocitos fecundados). El percentil 50 corresponde a la mediana.</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 6: Media de embriones euploides por donante en función de si la respuesta ovárica (en términos de número de ovocitos totales, MII y fecundados) está por debajo del percentil 50 (P50=mediana) o es igual o superior al P50.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 7: Frecuencia de afectación de un determinado cromosoma en el grupo de embriones aneuploides. No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) para ninguno de los cromosomas entre los ciclos no estimulado y estimulado.</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 8: Re-análisis mediante FISH en día 5 de desarrollo en una muestra de 36 embriones.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 9: Resultados gestacionales en las receptoras de gametos.</i>	<i>98</i>

INTRODUCCIÓN



RESUMEN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La fecundidad humana es relativamente baja en comparación con otros mamíferos. Así, la posibilidad de lograr una gestación espontánea en un ciclo menstrual único es del 20–30% (Evers 2002, Taylor 2003), significativamente menor que el 70% observada en mono Rhesus (Ghosh et al. 1997), 80% en babuinos cautivos (Stevens 1997) o 90% en roedores y conejos (Foote, Carney 1988).

Se ha sugerido que esta baja fecundidad se debe, entre otras causas, a la alta incidencia de anomalías cromosómicas en embriones humanos, que conllevaría a la muerte embrionaria temprana en periodo preimplantatorio, a fallos de implantación y a abortos espontáneos (Wells, Delhanty 2000, Macklon, Geraedts & Fauser 2002).

Esta información procede, entre otros, del análisis mediante cribado genético preimplantacional (PGS; del inglés *preimplantation genetic screening*) de embriones generados en el contexto de un tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV) en pacientes sometidas a una estimulación ovárica (EO) y que precisan la realización de esta técnica por diferentes motivos. En este escenario, se ha evidenciado una alta frecuencia de errores cromosómicos y aneuploidía en embriones humanos (Macklon, Geraedts & Fauser 2002, Wilton 2002).

De hecho, en pacientes de buen pronóstico sometidas a FIV, entre un 32 y un 64 % de los embriones son portadores de anomalías cromosómicas numéricas o aneuploidías (Voullaire et al. 2000, Rubio et al. 2003, Munne et al. 2004, Staessen et al. 2008, Mersereau et al. 2008, Meyer et al. 2009), mientras que esta tasa se incrementa hasta un 60 a 75% en pacientes de mal pronóstico como mujeres de edad avanzada o pacientes con antecedentes de aborto de repetición o fallo de implantación (Munne et al. 1995, Magli et al. 1998, Gianaroli et al. 1999, Pellicer et al. 1999, Pehlivan et al. 2003a, Pehlivan et al. 2003b, Rubio et al. 2003, Wilding et al. 2004, Rubio et al. 2005). Por otra parte, se ha descrito que más de la mitad de los embriones obtenidos a partir de donantes de ovocitos son aneuploides, lo cual es más

alto de lo esperable ya que se trata de mujeres jóvenes, sanas y fértiles (Reis Soares et al. 2003, Munne et al. 2006, Keskinetepe, Sher & Keskinetepe 2007, Sher et al. 2007). Estos datos podrían explicar el porqué las tasas de éxito en FIV no son mayores a pesar de los avances científicos que se han producido en los últimos años.

Considerando que los embriones sometidos a PGS se obtienen tras procedimientos de FIV rutinarios, queda por dilucidar si esta tasa de anomalías cromosómicas tan elevada podría ser inherente a la especie humana en las concepciones tempranas (Wilton 2005) o, por el contrario, si está inducido por factores externos, como las condiciones de cultivo *in vitro* (Pabon, Findley & Gibbons 1989, Pickering et al. 1990, McKiernan, Bavister 1990, Almeida, Bolton 1995, Natale et al. 2001, Viuff et al. 2001, Beyer et al. 2009, Nelissen et al. 2012) o la EO *per se* (Munne et al. 1997).

Respecto a este último punto, algunos autores han sugerido que tanto el uso de altas dosis de gonadotropinas (Baart et al. 2007) como una respuesta elevada a la EO (Tarin, Pellicer 1990, Jackson et al. 1998, Haaf et al. 2009) pudieran incrementar la tasa de aneuploidías ovocitarias y embrionarias. Por el contrario, un estudio no observó diferencias en la tasa de aneuploidías en ovocitos procedentes de un ciclo natural frente a un ciclo estimulado en pacientes sometidas a FIV (Gras et al. 1992); como tampoco se han visto en la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones resultantes de abortos espontáneos cuando la concepción ha sido espontánea o tras un tratamiento de EO con administración de hormona foliculoestimulante (FSH) exógena (Martinez et al. 2010, Massie et al. 2011, Bingol et al. 2012, Pendina et al. 2013).

Otros trabajos no han evidenciado una relación positiva entre la respuesta elevada a la EO y la incidencia de aneuploidias ovocitarias (Plachot 2001) o de anomalías cromosómicas cuando se lleva a cabo la técnica de arrays-hibridación genómica comparada (aCGH) para PGS (Ata et al. 2012). Tampoco se ha detectado una relación negativa entre la respuesta elevada a la EO y las tasas de gestación (Kok et al. 2006, Fatemi et al. 2013)

De todos los factores exógenos que pudieran incrementar la incidencia de anomalías

cromosómicas, es la EO utilizada en el contexto de un ciclo de FIV la que ha sido estudiada en este trabajo. Para investigar la intensidad de su efecto sería necesario establecer en primer lugar cuál es la incidencia real de aneuploidías embrionarias en los seres humanos en condiciones fisiológicas, y compararla con aquella observada en ciclos de EO.

El único modo certero para analizar lo primero sería estudiar aquellos embriones humanos fecundados *in vivo*, procedentes de mujeres fértiles y esto, claramente, no es ni ética ni técnicamente posible, ya que, hasta el momento, para analizar un embrión en estadio preimplantatorio se precisa la realización de una técnica de FIV. Por tanto, en el análisis cromosómico de los embriones humanos siempre habrá que considerar un posible sesgo inherente al procedimiento realizado *in vitro*.

En este sentido, el único estudio que trató de analizar la incidencia de aneuploidías en un ciclo de FIV no estimulado, describió un 36,4% de anomalías cromosómicas en los embriones resultantes (Verpoest et al. 2008). Este dato preliminar sugiere que incluso en condiciones ováricas fisiológicas, la existencia de anomalías está presente en la especie humana en al menos un tercio de los casos, lo cual explicaría la baja fecundidad incluso en un ciclo espontáneo natural.

Quedaría por dilucidar si el someter al ovario a una EO incrementa la probabilidad de generar embriones portadores de anomalías cromosómicas.

ANTECEDENTES

Estimulación ovárica para FIV. Generalidades

El primer embarazo humano logrado con FIV fue el resultado de un óvulo recuperado en un ciclo espontáneo o natural (Steptoe, Edwards 1978). Sin embargo, pronto se concluyó que este método presentaba varios inconvenientes, como la necesidad de llevar a cabo múltiples controles ecográficos a cambio de una baja tasa de éxito y alta tasa de

cancelación. La incorporación de la EO supuso un gran avance, siendo actualmente una parte integral de las técnicas de reproducción asistida (TRA) y un factor esencial ligado al éxito de dichas técnicas en el tratamiento de la esterilidad.

Las gonadotropinas son los fármacos más utilizados actualmente en nuestro medio para llevar a cabo la EO, con el objetivo de inducir un desarrollo folicular múltiple y obtener un mayor número de óvulos u ovocitos maduros y tener así la posibilidad de seleccionar uno o más embriones para la transferencia. La EO debe cumplir con la condición de alcanzar el mayor grado de eficacia posible con el menor riesgo y mejor coste-efectividad. Esta realidad cada vez más aceptada, junto con la evidencia creciente de que los niveles elevados de hormonas esteroideas durante la estimulación ovárica pueden afectar a la ovogénesis, a la calidad embrionaria y a la receptividad endometrial (Simon et al. 1995, Labarta et al. 2011a), han hecho que actualmente se extienda una corriente que defiende las ventajas de la estimulación ovárica suave o “mild ovarian stimulation” (Edwards, Lobo & Bouchard 1996, Hohmann, Macklon & Fauser 2003, Fauser et al. 2010). Sus objetivos pueden ser fácilmente suscritos, ya que ponen énfasis en obtener el mejor resultado con el menor riesgo y coste posible, y argumentando que el objetivo final de estos tratamientos es tener como resultado el nacimiento de un niño único sano, evitando el temido riesgo de padecer un síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), evento que puede llegar a amenazar la vida de la paciente (Devroey, Polyzos & Blockeel 2011).

Desde hace años, la EO con FSH se realiza conjuntamente con análogos (agonistas o antagonistas) de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para evitar picos endógenos de hormona luteinizante (LH) que incrementarían el riesgo de ovulación espontánea precoz (Howles et al. 1986).

La dosis media habitual en pacientes en las que se espera obtener una respuesta adecuada podría situarse en torno a 150-225 UI diarias de actividad FSH, aunque lo ideal sería recurrir a modelos de predicción que permitan orientar correctamente la elección de la dosis inicial de la mayoría de pacientes con normorrespuesta (Olivennes et al. 2011, La

Marca, Sunkara 2014). La adición de actividad LH a la actividad FSH durante un tratamiento de EO es más controvertida. Si bien algunos autores defienden que no es necesaria, otros promulgan su utilización en pacientes de mal pronóstico, como pacientes mayores de 35 años (Bosch et al. 2011, Hill et al. 2012) y en bajas respondedoras (Mochtar et al. 2007).

Tipos de estimulación ovárica según terminología ISMAAR

El uso cada vez más creciente de protocolos de EO mínima o incluso el resurgimiento del ciclo natural como alternativa en casos determinados, hizo necesaria la creación de una nueva terminología sobre los diferentes tipos de EO llevados a cabo en FIV con el fin de unificar criterios. Un grupo de interés de expertos de la Sociedad Internacional de estrategias moderadas en reproducción asistida (ISMAAR: International Society for Mild Approaches in Assisted Reproduction), propuso las siguientes definiciones (Nargund et al. 2007):

- I. Ciclo natural (CN): El término CN para FIV debe utilizarse para aquellas mujeres en las que el FIV se lleva a cabo en ovocitos procedentes del ciclo natural espontáneo de la paciente, sin administración de ningún tipo de medicación en ningún momento del ciclo. El objetivo de este ciclo es obtener un ovocito seleccionado de forma natural y con el mínimo coste posible.
- II. Ciclo natural modificado (CNM): Este término debe aplicarse cuando se utilizan hormonas exógenas o drogas en el contexto de un ciclo natural espontáneo de la paciente con el objetivo de obtener un único ovocito seleccionado de forma natural pero reduciendo las posibilidades de cancelación del ciclo. Este protocolo puede abarcar dos escenarios diferentes:
 - a. Uso de gonadotropina coriónica humana (hCG) para inducir la maduración ovocitaria final. El soporte de fase lútea puede o no ser administrado.
 - b. Administración de un antagonista de la GnRH para evitar el pico de LH endógeno con o sin uso concomitante de FSH o gonadotropina menopaúsica

humana (hMG) como terapia de rescate. En este caso se utiliza hCG y se lleva a cabo un soporte de fase lútea.

- III. Estimulación ovárica suave (“mild”) para FIV: Se define como el método en el que se utilizan dosis bajas de FSH o hMG, y/o un tratamiento adyuvante de menor duración con antagonistas de la GnRH; o cuando se utilizan compuestos por vía oral, como por ejemplo antiestrógenos o inhibidores de la aromataasa, bien solos o en combinación con gonadotropinas. Igualmente, se administra la hCG y se lleva a cabo un soporte de fase lútea. El objetivo es obtener entre 2 y 7 ovocitos.
- IV. Estimulación ovárica convencional para FIV: Este término se utiliza para definir los siguientes escenarios:
 - a. Uso de agonistas de la GnRH desde la mitad de la fase lútea del ciclo previo en protocolo largo para supresión hipofisaria seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
 - b. Uso de agonistas de la GnRH en un protocolo “flare” seguido de la utilización de dosis convencionales de FSH o hMG.
 - c. Uso de antagonistas de la GnRH en un protocolo con dosis convencionales de FSH o hMG iniciadas desde el inicio del ciclo.

En todos estos protocolos, se administra la hCG y se lleva a cabo un soporte de fase lútea. El objetivo es obtener más de 8 ovocitos.

Ciclo natural/natural modificado para FIV

Hace unos años el CN revivió como alternativa debido a las preocupaciones derivadas de la EO, como por ejemplo, el riesgo de padecer un SHO, el riesgo de la gestación múltiple, el coste derivado del uso de gonadotropinas, la posible menor receptividad endometrial en los ciclos estimulados, el riesgo de padecer cáncer y los dilemas éticos derivados de la acumulación y congelación de embriones sobrantes (Edwards, Lobo & Bouchard 1996).

El CN en el contexto de una FIV es considerado sencillo y menos exigente desde el punto de vista físico, ya que sólo requiere controles ecográficos para la monitorización del ciclo; es menos invasivo para la paciente pues no requiere de la inyección de preparados hormonales; y tiene un bajo riesgo de complicaciones, fundamentalmente de gestación múltiple y SHO. Se ha calculado que los costes de un CN para FIV son aproximadamente un 20% de los necesarios en un ciclo de EO (Aboulghar et al. 1995, Nargund et al. 2001). Sin embargo, su eficacia se ve truncada por las altas tasas de cancelación debidas a picos prematuros de LH, a ovulación precoz o a la no obtención de ovocito tras la punción.

En una revisión sobre 1800 ciclos naturales para FIV, la tasa de cancelación por ciclo iniciado resultó del 28,9%, mientras que las tasas de obtención de ovocito por punción oscilaban en los distintos estudios entre el 57,1% y el 100% en función de si usaban aguja de aspiración de única vía o doble vía o de si hacían lavado folicular, entre otros. La tasa de gestación evolutiva por CN oscila entre el 7,2% y el 8,3% (Pelinck et al. 2002, Pelinck et al. 2006).

Se ha descrito una tasa de gestación acumulada del 20,8% tras 3 CNM (Pelinck et al. 2006), del 46% tras 4 CN (Nargund et al. 2001) y del 40,6% tras 9 CNM (Pelinck et al. 2007). La tasa acumulada de recién nacido (RN) vivo tras 4 CN llega al 32% en grupos seleccionados de pacientes (Nargund et al. 2001). Aunque el resultado de varios CN pueda ser comparable con un único ciclo estimulado de FIV siendo incluso más rentable la primera opción, no se debe olvidar que con los CN hay una mayor inversión de tiempo e incremento en el número adicional de procedimientos de recuperación de ovocitos, lo cual incrementa la tasa de abandono por parte de las pacientes, sobretodo a partir del 3º ciclo fallido y en pacientes de mal pronóstico (tasa acumulada de abandono del 47,8%) (Pelinck et al. 2007).

En resumen, las tasas de éxito del CN siguen siendo más bajas de lo deseable y es por ello que no es una alternativa de primera opción en pacientes infértiles que van a ser sometidas a un tratamiento de FIV.

Cribado genético preimplantacional como procedimiento para valorar la calidad embrionaria

Durante los últimos 20 años, el diagnóstico genético preimplantacional (PGD; del inglés *preimplantation genetic diagnosis*) se ha realizado fundamentalmente en embriones en día 3 de desarrollo tras biopsiar una o dos de sus células (blastómeras) con el fin de diagnosticar enfermedades monogénicas y anomalías cromosómicas hereditarias. Las técnicas más utilizadas han sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para estudiar las primeras o hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidías) o estructurales, como translocaciones o inversiones.

El PGS mediante FISH en núcleos en interfase utiliza la misma tecnología que el PGD pero con el fin de descartar aneuploidías, analizando los cromosomas de embriones generados tras tratamientos de FIV. Los defensores de su realización sistemática alegan 3 hechos fundamentales: los ovocitos y embriones humanos presentan altas tasas de aneuploidías; la aneuploidía es casi siempre letal; y las anomalías cromosómicas tienen un efecto mínimo sobre la morfología embrionaria. En los últimos años ha sido ampliamente utilizado en pacientes de mal pronóstico como mujeres de edad avanzada, con fallos de implantación previos, abortos de repetición o casos de factor seminal severo (Magli et al. 2009, Hodes-Wertz et al. 2012, Harton et al. 2013, Rubio et al. 2013, Rodrigo et al. 2014).

Fundamentos del FISH

El FISH utiliza sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias de ácidos nucleicos de un cromosoma, de modo que se pueden enumerar las copias de un determinado cromosoma presente en el núcleo de una célula. La primera aplicación del FISH en células únicas utilizó sondas para los cromosomas X e Y (Griffin et al. 1992), por lo que rápidamente se usó para diagnóstico del sexo del embrión en parejas con enfermedades ligadas al sexo (Griffin et al.

1993). Desde entonces, aparecieron más sondas que permitieron el análisis simultáneo de un mayor número de cromosomas.

Las sondas utilizadas en núcleos interfásicos pueden ir dirigidas a diferentes tipos de secuencias de ADN: secuencias centroméricas (CEP, del inglés *Chromosome-specific centromeric enumeration probes*, utilizadas generalmente para el diagnóstico de los cromosomas 15, 16, 17, 18, X e Y), específicas de locus (LSI, del inglés *Locus specific identifier*, para los cromosomas 13, 21, 22) y subtelo méricas. Estas últimas, localizadas en los extremos terminales de cada cromosoma, se utilizan generalmente para la reconfirmación de señales no concluyentes con sondas CEP y LSI.

Tras llevar a cabo la desnaturalización del núcleo fijado en el portaobjetos y las sondas de ADN, se realiza la hibridación de éstas con su secuencia complementaria en el núcleo a evaluar. Posteriormente se detectan las señales con microscopio de fluorescencia y se emite el diagnóstico de euploidía o aneuploidía.

La hibridación simultánea con sondas CEP y LSI para varios cromosomas permite descartar muchas de las aneuploidías humanas más frecuentes. En estos casos se realiza una FISH secuencial con varias rondas de hibridación, que pueden ser hasta 3. El protocolo más utilizado incluye los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y, con los cuales se detectan aproximadamente el 85% de aneuploidías (Munne, Wells 2003). La tercera ronda de hibridación se utiliza para analizar cromosomas adicionales o para reconfirmar señales dudosas de cromosomas analizados en las otras dos rondas usando sondas dirigidas a locus diferentes a los ya utilizados.

Para interpretar los resultados se contabiliza el número de marcas fluorescentes que aparece en cada núcleo para cada uno de los cromosomas a analizar. El resultado puede ser un embrión:

- Diploide normal (euploide, 2n): la célula analizada presenta dos señales para cada uno de los cromosomas analizados.
- Haploide (1n): una única señal para todos y cada uno de los cromosomas analizados.

- Triploide ($3n$): 3 señales para todos y cada uno de los cromosomas analizados.
- Monosomía: una única señal de hibridación para uno o varios (no todos) cromosomas analizados. Implica, por tanto, la pérdida de uno o varios cromosomas concretos.
- Trisomía: 3 señales de hibridación para uno o varios (no todos) cromosomas analizados. Implica la ganancia de uno o varios cromosomas concretos.

Anomalías cromosómicas numéricas y estructurales

Las anomalías cromosómicas son aquellas que conllevan tanto alteraciones en el número de cromosomas (anomalías numéricas) como en la estructura de los mismos (anomalías estructurales).

Cuando el cambio en la dotación cromosómica “numérica” involucra a dotaciones completas de cromosomas hablamos de poliploidías (triploidías, tetraploidías...etc) o haploidías; mientras que si sólo implica a uno o varios cromosomas aislados dentro de una dotación cromosómica hablamos de aneuploidías.

Las aneuploidías son las alteraciones cromosómicas más frecuentemente halladas en la especie humana siendo la monosomía y la trisomía las más habituales. La mayoría de estas alteraciones se detienen en el útero, y por ello las aneuploidías son la causa genética más frecuente de abortos espontáneos. Sin embargo, algunas trisomías autosómicas (13, 18 y 21) y aneuploidías de los cromosomas sexuales ($45X0$, $47XXY$, $47XXX$) son compatibles con la vida, aunque en muchos casos acarrear la presencia de malformaciones congénitas o alteraciones cognitivas o del comportamiento (Hassold, Hall & Hunt 2007).

Las anomalías cromosómicas “estructurales” afectan a la estructura de cromosomas específicos e implican rotura y reorganización de fragmentos de uno o más cromosomas, destacando las translocaciones (a su vez se clasifican en robertsonianas y recíprocas) y las inversiones. Estas anomalías estructurales no se deben a errores en la división celular, sino que pueden ser secundarias a factores ambientales que ejercen un efecto mutagénico. Los portadores de estas reorganizaciones cromosómicas

equilibradas son fenotípica e intelectualmente normales, pero tienen mayor riesgo de transmitir a la descendencia desequilibrios por segregación anómala durante la meiosis y problemas reproductivos, como abortos. La repercusión sobre la fertilidad depende del cromosoma implicado y de la longitud del mismo que esté alterado.

Mosaicismo

Las aneuploidías pueden hallarse en todas las células del embrión (por tanto, del organismo) o sólo en algunas, en forma de mosaico. Las primeras se originan por un error durante la meiosis, mientras que el llamado “mosaicismo” se debe fundamentalmente a errores de segregación cromosómica post-cigótica, durante las primeras divisiones mitóticas y antes de cualquier evento de diferenciación celular. Su aparición es totalmente independiente de la edad materna (Munne et al. 2002), a diferencia de las aneuploidías de origen meiótico.

Por tanto, el mosaicismo implica la coexistencia de 2 o más líneas celulares con una constitución genética diferente, es decir, que algunas células son diploides normales y otras aneuploides en el mismo embrión, o incluso que diferentes células tienen diferentes tipos de aneuploidías (van Echten-Arends et al. 2011). El mosaicismo se ha relacionado con enfermedades genéticas, abortos espontáneos y muerte embrionaria temprana en periodo preimplantatorio (Hassold, Hunt 2001).

El origen del mosaicismo se encuentra en tres mecanismos diferentes que conducen a la ganancia y/o pérdida de cromosomas: fenómeno de no disyunción mitótica, retraso de la anafase y fenómeno de endorreduplicación. Los dos últimos mecanismos parecen ser los responsables de la mayoría de errores cromosómicos durante el desarrollo embrionario (Taylor et al. 2014).

En función del momento en el que se produce el error mitótico (en estadio de cigoto o posteriormente), la extensión del mosaicismo será diferente, con porcentajes distintos de cada línea celular. Se distinguen diferentes tipos de mosaicismo: euploide/aneuploide

(cuando una blastómera presenta una dotación cromosómica normal ($2n$) y la otra aneuploide); aneuploide/aneuploide (cuando ambas blastómeras presentan anomalías cromosómicas pero no la misma); mixoploide (si se originan diferentes líneas celulares con alteraciones en la ploidía, por ejemplo, $2n/4n$) y caótico (cuando existen 3 o más líneas celulares con dotaciones cromosómicas distintas).

El mosaicismo sólo puede ser diagnosticado en día 3 de desarrollo embrionario cuando se biopsian y analizan un mínimo de 2 blastómeras, ya que si sólo se biopsia una no puede ser detectado. De hecho se ha criticado la biopsia de una única blastómera por la posibilidad de que ésta no sea representativa del estatus cromosómico de todo el embrión. Coulam detectó una discordancia del 74,5% entre el resultado del análisis de 2 blastómeras procedentes del mismo embrión biopsiado en día 3 de desarrollo, aunque sugirió que esta diferencia pueda ser debida a factores biológicos o a fallos técnicos durante la preparación de las blastómeras para el FISH (Coulam et al. 2007).

Sin embargo, varios estudios han demostrado que el resultado del complemento cromosómico de una blastómera en día 3 de desarrollo embrionario es altamente predictivo del estatus cromosómico del embrión en estadio de blastocisto o día 5 de desarrollo (Daphnis et al. 2008, Mir et al. 2010). Además, algunos autores sugieren que la biopsia de 2 blastómeras puede resultar deletérea para el desarrollo embrionario (Cohen, Wells & Munne 2007, Haapaniemi Kouru et al. 2012), aunque esto sigue siendo motivo de debate pues otros no han evidenciado diferencias estadísticamente significativas en tasa de RN vivo en función de si se biopsia 1 ó 2 blastómeras (Goossens et al. 2008).

La incidencia descrita de mosaicismo en embriones humanos procedentes de FIV oscila entre el 15 y el 50% cuando se lleva a cabo PGD/PGS mediante la biopsia de 2 blastómeras (Bart et al. 2006, Coulam et al. 2007), pudiendo llegar hasta el 90% si se analizan todas las células de un embrión (Vanneste et al. 2009, Mertzaniidou et al. 2013).

Sin embargo, se han descrito menores tasas de mosaicismo en estadio de blastocito, variando entre 16% y 30% (Northrop et al. 2010, Fragouli et al. 2011a). Estudios recientes

muestran que la incidencia de mosaicismo va disminuyendo conforme avanza el desarrollo embrionario, pasando de un 83% de mosaicismo en día 4 a un 42% en día 8, es decir, que la proporción de mosaicos se reduce a la mitad cuando el embrión alcanza dicho estadio (Santos et al. 2010b). Estos autores especulan que una gran proporción de mosaicos detienen su desarrollo antes de llegar a estadio de blastocisto; y los que continúan dividiéndose, sufren una apoptosis de las células aneuploides o disminuye la proliferación de las mismas, de manera que el porcentaje final de células aneuploides es nulo o tan bajo que no cumple criterios para definir al embrión como mosaico, ya que el embrión debe tener un mínimo de 10% blastómeros con la misma anomalía cromosómica para considerarlo mosaico.

Esto explicaría la gran discordancia existente entre la proporción tan elevada de mosaicismo en embriones en estado preimplantatorio y el porcentaje significativamente menor en restos de abortos espontáneos (<10%) o en biopsias coriales (1-2%) del primer trimestre en gestaciones evolutivas (Los, Van Opstal & van den Berg 2004). De hecho, esta selección natural hace que la incidencia de aneuploidías en recién nacidos sea muy baja (0,3%) (Hassold et al. 1996).

Si bien las aneuploidías no se relacionan tan estrechamente con la morfología embrionaria, como se ha comentado previamente, los embriones con mosaicismo suelen ser dismórficos, de desarrollo lento o bloqueados, y con un mayor porcentaje de fragmentación (Marquez et al. 2000, Munne 2006).

En cualquier caso, si bien el mosaicismo es un evento bastante frecuente, las consecuencias sobre el desarrollo embrionario y fetal no son tan letales como las de una aneuploidía meiótica. Estas últimas son causa universalmente aceptada de fallo de implantación y de abortos del primer trimestre, mientras que los mosaicismos no ejercen un efecto tan negativo, aunque su efecto potencial sobre el desarrollo embrionario va a depender del tipo y la proporción de blastómeros no diploides en el embrión.

Limitaciones del FISH para PGS

Aunque el FISH ha sido la técnica más usada en los últimos años para seleccionar embriones cromosómicamente normales ya que es rápida y técnicamente asequible, presenta ciertas limitaciones.

En primer lugar depende de la eficiencia de hibridación, que viene determinada por las características intrínsecas de las sondas utilizadas, de la morfología del núcleo analizado y la calidad de la extensión del núcleo tras la fijación. Es por ello que algunos embriones analizados son calificados como no informativos para algunos cromosomas. La incorporación de rondas adicionales de hibridación con sondas de ADN dirigidas a locus diferentes permite rescatar información de cromosomas no diagnosticables en las primeras rondas de hibridación. Ello hace que el porcentaje de error con FISH, si éste es llevado a cabo correctamente, sea de un 5-7,5% (Colls et al. 2007, Mir et al. 2010).

Otra limitación del FISH hace referencia al número máximo de cromosomas analizables simultáneamente en una única célula. Sin embargo, se ha visto que la tasa de error no está relacionada con el número de sondas utilizadas. De hecho, se han llegado a analizar hasta 12 cromosomas mediante FISH, y se ha visto que este análisis no mejora los resultados respecto al de 9 cromosomas (Colls et al. 2009). Lo cierto es que las formas raras de aneuploidía, que incluyen cromosomas que normalmente no están afectados, suelen ir asociadas a otras aneuploidías más frecuentes y ello hace posible el detectar la mayoría de los embriones aneuploides sin necesidad de analizar todos los cromosomas (Munne et al. 2010).

Actualmente existen otras técnicas que permiten el análisis del complemento cromosómico de una célula en su totalidad, destacando los arrays-hibridación genómica comparada (aCGH), los polimorfismos de nucleótido simple (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) microarrays, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR, del inglés *real-time quantitative polymerase chain reaction*), metafase CGH y las técnicas de secuenciación masiva.

La más ampliamente utilizada hoy en día son los aCGH, también denominada

microarray-CGH o array-CGH. Esta técnica se ha validado en múltiples laboratorios, con diferentes estrategias, y ha mostrado de forma consistente una tasa de precisión de aproximadamente un 95% en corpúsculo polar e incluso mayor en embriones (Gutierrez-Mateo et al. 2011, Christopikou et al. 2013).

Los aCGH se implantaron en el año 2011 en nuestro centro, por lo que la tecnología utilizada para el PGS en nuestro trabajo es el FISH, única utilizada para tal fin en el momento en el que el estudio se llevó a cabo.

La última limitación del FISH para PGS mediante biopsia en día 3 de desarrollo embrionario es la alta incidencia de mosaicismo en embriones humanos desde el estadio de 2 células por errores de segregación cromosómica post-cigótica, por lo que ni la biopsia de corpúsculo polar ni la de blastómeras podría ofrecer un resultado representativo del estatus cromosómico del embrión, independientemente de la técnica utilizada. La activación del genoma es tardía, y cuando ocurre hay menores errores de división, por lo que la incidencia de mosaicismo disminuye (Santos et al. 2010b).

Por todo ello, no queda claro cuál es el estadio embrionario ideal para llevar a cabo la biopsia. Los estudios sobre tasas de gestación evolutiva tras PGS mediante análisis de 24 cromosomas realizados en corpúsculo polar o blastómeras todavía se están llevando a cabo, aunque algunos autores evidencian menor tasa de implantación cuando se biopsian blastómeras en comparación con trofoectodermo (Scott, Hong & Scott 2013). Recientemente se han publicado varios estudios aleatorizados que reportan un incremento de la tasa de implantación y gestación por ciclo y una disminución de las tasas de aborto cuando se realiza el análisis de 24 cromosomas mediante biopsia de trofoectodermo, tanto en pacientes de buen pronóstico como en edad avanzada (Yang et al. 2012a, Scott, Hong & Scott 2013). Por otra parte, nuestro grupo ha presentado un estudio con biopsia de blastómera en día 3 y aCGH para PGS en mujeres de edad avanzada en el que se evidencia un incremento significativo en la tasa de implantación evolutiva cuando se transfieren blastocistos euploides, comparando con la transferencia de blastocistos sin analizar (Rubio et al. 2014).

Origen de las aneuploidías

El origen de las aneuploidias autosómicas, y concretamente de las trisomías, es principalmente materno en el 90-95% de los casos ya que la meiosis femenina es más proclive a errores fundamentalmente por su larga duración en comparación con la masculina.

La meiosis es el proceso a través del cual una célula diploide (que contiene dos copias de cada par de cromosomas) produce un gameto haploide que contiene una copia única de cada cromosoma. La meiosis se inicia con una duplicación del ADN dando lugar a las cromátidas hermanas, y posteriormente se producen 2 divisiones sucesivas en las que en primer lugar se segregan los cromosomas homólogos (meiosis I o primera división meiótica) y en la segunda división se produce la segregación de las cromátidas hermanas (meiosis II o segunda división meiótica). El fin es que cada célula hija resultante presente la misma dotación cromosómica.

La meiosis I se inicia en la mujer durante el periodo fetal, pero no se reanuda y completa hasta que se produce la madurez sexual y el crecimiento de un folículo preovulatorio, produciendo un ovocito secundario y el primer corpúsculo polar (CP). Tras la ovulación el ovocito continúa hasta la metafase de la meiosis II, la cual sólo se completa si se produce la fecundación, que resulta en un óvulo maduro fecundado o cigoto y el segundo CP.

Los errores durante la meiosis I (bien por un proceso de no disyunción meiótica o a la separación prematura de cromátidas) son probablemente la causa más frecuente de trisomías. Sin embargo, estudios recientes postulan que los errores de segregación durante la meiosis II son muy frecuentes en mujeres de edad avanzada (Kuliev et al. 2003, Kuliev, Verlinsky 2004) e incluso pueden llegar a ser más frecuentes que los errores en la meiosis I (Fragouli et al. 2011b). Recientemente, se ha evidenciado que el fenómeno de no disyunción meiótica parece ser el mecanismo menos prevalente asociado a aneuploidía durante la meiosis I y II entre los autosomas (Handyside et al. 2012, Forman et al. 2013), mientras que es el principal mecanismo de errores de segregación en los cromosomas sexuales durante las primeras divisiones celulares (Bean et al. 2001, Bean et al. 2002).

La no disyunción meiótica se define como la segregación desequilibrada de los cromosomas enteros que conduce a hipo o hiperhaploidía. Puede afectar a todos los cromosomas, a un grupo de los mismos, o a algún cromosoma individual. Algunos mecanismos de no disyunción son particulares para algunos tipos de cromosomas o para cromosomas concretos. Por ejemplo, son similares entre los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, sugiriendo que los cromosomas acrocéntricos comparten el mismo mecanismo de no disyunción. La trisomía 16 tiene un origen 100% materno y parece proceder siempre de errores de meiosis I, mientras que en la trisomía 18 predominan los errores en la meiosis II (Nicolaidis, Petersen 1998, Plachot 2003). El distinto origen de las trisomías parecen depender de la diferente arquitectura genómica de cada cromosoma individual, no pudiendo esclarecer cuál es el origen de estas diferencias (Hassold, Hall & Hunt 2007).

Se desconocen las causas exactas de la no disyunción meiótica en ovocitos humanos, habiéndose sugerido errores en la formación de microtúbulos que aproximan los cromosomas en la placa meiótica, o en el apareamiento (sinapsis), o en la recombinación de cromosomas homólogos (crossing-over o quiasmas).

Se han descrito tres factores de riesgo indiscutibles asociados a la génesis de aneuploidías humanas: la edad materna, la recombinación anómala y el antecedente de trisomía previa (Warburton et al. 2004, Al-Asmar et al. 2012). Otros factores que se han sugerido como posibles causantes de aneuploidías son exposición a pesticidas, consumo de tabaco, tratamientos hormonales, quimioterapia o radioterapia, pero todavía no se ha demostrado una relación directa entre ellos y la incidencia de aneuploidías (Hassold, Hall & Hunt 2007).

Las trisomías de los cromosomas sexuales (XXX, XXY, XYY), sin embargo, pueden tener un origen paterno por no disyunción durante la meiosis espermática o en las divisiones post-cigóticas (Jacobs, Hassold 1995). Las triploidías suelen ser igualmente de origen paterno, por la fecundación de un ovocito por más de un espermatozoide o por la fecundación por un espermatozoide diploide (Egozcue et al. 2002).

Efecto de la estimulación ovárica sobre la calidad embrionaria

Diversos estudios en animales han demostrado que los embriones presentan un retraso en el desarrollo cuando se cultivan *in vitro* en comparación con aquellos desarrollados en condiciones *in vivo*. Aunque las condiciones de cultivo subóptimas sean factor clave en este efecto negativo, no se puede excluir la posible influencia de la EO.

Debido a razones éticas obvias, existe poca información científica sobre el impacto de las gonadotropinas sobre el desarrollo embrionario, tasas de implantación y embarazo en la especie humana. Es por ello que la mayoría de los trabajos recurren al modelo animal, fundamentalmente en roedores, para llevar a cabo sus investigaciones.

Modelo animal

En el modelo animal, el uso de gonadotropinas exógenas para la estimulación ovárica parece afectar al desarrollo embrionario en muchas de sus diferentes etapas. De hecho, hace casi 40 años ya se estimó que en ciclos de EO en ratón existía un 44% de muerte embrionaria preimplantatoria en comparación con el 10% observado en un ciclo natural control (Beaumont, Smith 1975).

Estudios posteriores demostraron que la proporción de embriones con desarrollo pre y postimplantatorio anómalo está incrementada en ratas sometidas a tratamiento hormonal (bien mediante EO con gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) y gonadotropina coriónica humana (hCG) o simplemente inducción de la ovulación (IO) con hCG en comparación con el ciclo espontáneo. Tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, la EO y la IO afectan al desarrollo embrionario y fetal, pues retardan el crecimiento embrionario, reducen la tasa de implantación, incrementan la mortalidad postimplantación y el número medio de fetos vivos por gestación, reducen el peso medio de los fetos vivos y ralentizan el desarrollo esquelético (Ertzeid, Storeng 1992, Van der Auwera, D'Hooghe 2001).

Se ha sugerido que la modificación del microambiente uterino materno y de la

receptividad endometrial pudieran ser la causa de una menor implantación y un desarrollo embrionario y fetal anómalo, antes que el efecto directo sobre la calidad ovocitaria y embrionaria (Ertzeid, Storeng & Lyberg 1993, Ertzeid, Storeng 2001). De hecho, algunos autores afirman que el ambiente alterado en el oviducto de ratas estimuladas parece ser incluso más deletéreo para el desarrollo embrionario que el cultivo *in vitro* (Van der Auwera, Pijnenborg & Koninckx 1999).

Uno de los factores que alteran el microambiente uterino es la elevación de los niveles de hormonas esteroideas (estradiol –E2- y progesterona –P-) secundaria a la EO. El efecto deletéreo de los niveles suprafisiológicos de E2 sobre la calidad y capacidad de adhesión embrionaria *in vitro* quedó patente en un estudio en el que se cultivaron embriones de ratón sobre una monocapa de células endometriales procedentes de biopsias de endometrio de donante humana y se añadió E2 a concentraciones crecientes en diferentes muestras. A mayor concentración de E2 sobre el embrión, mayor tasa de degeneración embrionaria y menor tasa de llegada a blastocisto, de forma que en las dosis máximas de E2 prácticamente todos los embriones estaban degenerados. La tasa de adhesión embrionaria también disminuía de forma dosis dependiente cuando añadían E2 al embrión y no al endometrio, por lo que concluyen que el E2 a concentraciones elevadas afecta negativamente al embrión antes que a la receptividad endometrial (Valbuena et al. 2001).

Un estudio aleatorizado más reciente llevado a cabo en hámster dorado demuestra cómo al incrementar las dosis de PMSG, si bien se obtiene un mayor número de embriones, el desarrollo de los mismos está afectado negativamente. De hecho, ninguno de los embriones llegó a blastocisto en el cultivo prolongado cuando se utilizó la dosis más elevada. No se observaron diferencias en la maduración ovocitaria, aunque sí se vieron diferentes patrones de formación de microfilamentos tras el tratamiento (Lee et al. 2005).

Este efecto dosis dependiente también fue corroborado por Edwards (Edwards et al. 2005), que por primera vez utilizó FSH recombinante en ratones y observó cómo el desarrollo y calidad embrionaria empeoran a partir de cierto umbral de dosis, de modo que

en las dosis mínimas no se veía esta correlación. Además, no observó una alteración en la expresión de los genes para IGF-II (factor de crecimiento de insulina, del inglés insulin growth factor II), el receptor de IGF-II o VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial, del inglés vascular endotelial growth factor) en blastocistos, sugiriendo que los efectos adversos de la estimulación ovárica con FSH recombinante sobre el desarrollo embrionario no se deben a diferencias en la expresión de determinados genes. Sin embargo, cuando trató a los ratones con gonadotropina coriónica equina, sí que se observó mayor expresión de IGF-II en los blastocistos.

En resumen, desde que surgieron los primeros estudios en animales se ha observado una influencia negativa de la EO sobre el desarrollo embrionario, y este efecto parece ser dosis dependiente. Sin embargo, otros autores postulan que es el efecto sobre el desarrollo endometrial, y no sobre los embriones, el que empeora los resultados gestacionales.

Modelo humano

En humanos, sin embargo, no se ha observado un decremento en la calidad embrionaria en ciclos de EO en comparación con ciclos naturales. De hecho, no se han apreciado diferencias en la tasa de división ni en el patrón de fragmentación entre embriones procedentes de un ciclo natural y estimulado en la misma paciente (Ziebe et al. 2004). A pesar de no encontrar diferencias morfológicas, este estudio afirma que no puede descartar que las gonadotropinas provoquen efectos adversos sobre viabilidad embrionaria, ya que dichos efectos podrían no verse reflejados hasta la etapa de implantación o incluso más tarde.

Si bien no hay más estudios comparando calidad embrionaria en ciclo natural vs. ciclo estimulado, sí que los hay comparando diferentes dosis de gonadotropinas. Se ha descrito una mayor proporción de embriones de buena calidad morfológica tras EO suave en comparación con EO convencional, tanto en protocolos con agonistas de la GnRH (Hohmann, Macklon & Fauser 2003) como en protocolos con antagonistas de la

GnRH (Baart et al. 2007). Esto apoyaría el ya bien establecido concepto de “estimulación suave”, con la teoría de que una EO más fisiológica conduce a menor número de ovocitos y embriones, pero de mejor calidad.

Aunque parece que los embriones categorizados como de “alta calidad” desde el punto de vista morfológico tienen más posibilidades de implantar (Lundqvist et al. 2001), lo cierto es que todavía no se ha podido predecir con certeza qué embrión va a implantar y va a dar lugar al nacimiento de un niño sano. Esto es debido a que existe una alta tasa de errores cromosómicos numéricos en embriones humanos (Wilton 2002), que justificaría la ineficiencia de la reproducción humana, tanto *in vivo* como *in vitro*.

A pesar de que algún estudio ha evidenciado una cierta correlación entre la morfología embrionaria y la constitución cromosómica embrionaria (Sadowy et al. 1998, Magli et al. 2007), lo cierto es que existe un amplio consenso afirmando que la morfología de los embriones en desarrollo no refleja de forma fiable cuál es su estado cromosómico (Magli et al. 2000, Hardarson et al. 2003, Munne 2006, Rubio et al. 2007, Eaton et al. 2009, Alfarawati et al. 2011, Yang et al. 2012b, Fragouli et al. 2013), porque el genoma del mismo no se activa hasta día 3 de desarrollo (Braude, Bolton & Moore 1988) y las aneuploidías comienzan a ejercer un efecto negativo en el desarrollo y morfología a partir de ese momento (Wells 2010). Además, la evaluación morfológica, aunque no invasiva, tiene las desventajas de ser altamente subjetiva, requerir experiencia y existir poca estandarización (Baxter Bendus et al. 2006, Paternot et al. 2011).

Recientemente se ha visto que la capacidad de un blastocisto para implantar se relaciona fundamentalmente con el complemento cromosómico (tras biopsia de trofoectodermo) más que con los parámetros morfológicos o de desarrollo embrionario (Capalbo et al. 2014). En lo que respecta al último punto, algunos estudios retrospectivos apuntan a que el análisis de la dinámica de la división embrionaria en tiempo real muestra un diferente comportamiento cinético entre embriones euploides y aneuploides (Campbell et al. 2013, Basile et al. 2014), aunque otros autores consideran que esta aseveración es muy prematura pues todavía no

hay estudios prospectivos aleatorizados, con un tamaño muestral adecuado y ajustados por edad que hayan analizado este tema (Ottolini, Rienzi & Capalbo 2014). Todo ello demuestra que en el momento actual no existe ningún método no invasivo certero que pueda ser utilizado como único parámetro de calidad embrionaria y se recurre al PGS como técnica para analizar el estatus cromosómico del embrión.

Efecto de la estimulación ovárica sobre la constitución cromosómica embrionaria

En primer lugar, se revisa el efecto de la estimulación ovárica sobre la incidencia de poliploidías, fundamentalmente triploidías; y posteriormente, sobre la incidencia de aneuploidías.

Estimulación ovárica y poliploidías en el modelo animal

En experimentación animal se ha observado una elevada incidencia de poliploidía (fundamentalmente triploidía) en el contexto de la técnica de FIV y tras procedimientos de superovulación.

Estudios preliminares en roedores, informan de un aumento significativo de triploidía, atribuible principalmente a la no extrusión del segundo CP, en embriones de ratonas estimuladas con PMSG (Takagi, Sasaki 1976, Chang 1977). Otros autores observaron una relación lineal positiva entre la dosis de PMSG y la incidencia de poliploidía en ovocitos de ratonas bajo condiciones de fecundación *in vitro*, atribuyendo el origen de la poliploidía a la polispermia o a la fecundación llevada a cabo por espermatozoides diploides, ya que esta asociación dosis dependiente no se observó cuando la fecundación se había llevado a cabo *in vivo* (Maudlin, Fraser 1977, Santalo, Estop & Egozcue 1986).

Por otra parte, los embriones de ganado bovino madurados *in vitro* tras estimulación con FSH tienen un desarrollo embrionario más lento y una mayor tasa de poliploidía y

sobretudo mixoploidia que aquellos madurados *in vivo* (Viuff et al. 1999, Viuff et al. 2000, Viuff et al. 2001).

Estimulación ovárica y aneuploidías en el modelo animal

Respecto al efecto directo de las gonadotropinas sobre las aneuploidías, los estudios son contradictorios y por ello no muestran un consenso tan claro.

Los primeros trabajos mostraron un ligero, pero significativo aumento de anomalías cromosómicas en blastocistos y embriones de conejo obtenidos después de una superovulación respecto a los grupos control (Fujimoto, Pahlavan & Dukelow 1974). Se sugirió que la estimulación pudiera inducir alteraciones en el ADN tras observar un incremento en el intercambio entre cromátides hermanas en embriones de ratones hiperestimulados (Elbling, Colot 1985).

Sin embargo, posteriormente no se evidencia un aumento de la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones de oveja Merino al aumentar la dosis de PMSG ni en la comparación entre ovejas estimuladas con PMSG y ovejas no tratadas (Murray, Boland & Moran 1986).

Estudios en hámsters sometidos a tratamientos de EO tampoco han evidenciado un incremento de anomalías cromosómicas en ovocitos (Hansmann, Probeck 1979), ni en embriones respecto a un grupo control de ciclo natural (Sengoku, Dukelow 1988). Sin embargo, se ha observado una disminución en la tasa de implantación cuando son transferidos a madres de alquiler. Este hecho sugiere que la estimulación con PMSG en hámsters pudiera generar efectos letales durante la maduración meiótica o el desarrollo embrionario precoz que no se hacen manifiestos hasta el periodo periimplantatorio (McKiernan, Bavister 1998).

En ratones, inicialmente no se observó un incremento de aneuploidías ovocitarias tras EO (Golbus 1981); mientras que sí se describió un incremento de anomalías cromosómicas en cigotos en ciclo estimulado vs. espontáneo, pero esa tasa no se mantenía elevada

en los embriones en estadio de división, ya que todos los cigotos cromosómicamente anormales fallecen antes de llegar a estadio de mórula o blastocisto (Spielmann, Vogel 1993), evento que no ocurre en humanos, donde un porcentaje no desdeñable de embriones aneuploides llegan a estadio de blastocisto (Sher et al. 2007). Recientemente tampoco se ha evidenciado un incremento de aneuploidías embrionarias ni mosaicismo en ratones tras EO con gonadotropinas en comparación con un grupo control de ciclo natural (Fauzdar, Halder & Kumar 2009).

Las estimulaciones repetidas en ratones parecen acarrear una alteración en la organización del citoplasma y del huso meiótico en ovocitos metafase II madurados tanto *in vivo* como *in vitro* (Van Blerkom, Davis 2001), así como un daño oxidativo en los ovarios que es proporcional al número de exposiciones a ciclos de EO, reflejándose en la aparición de inmunoproteínas contra grupos carbonilos y en la delección de grandes regiones del ADN mitocondrial (Chao et al. 2005). Por otra parte, la adición de FSH a altas concentraciones en el medio de cultivo de ovocitos madurados *in vitro* altera la maduración nuclear, afecta al alineamiento de los cromosomas durante la metafase I (están más dispersos y alejados entre sí, aunque la morfología del huso meiótico no se altera sustancialmente) e induce la génesis de aneuploidías en los ovocitos metafase II (Roberts et al. 2005).

Estimulación ovárica y poliploidías en el modelo humano

Como sucede en animales, la poliploidía/triploidía es un hallazgo bastante frecuente en los procedimientos de FIV. Esta puede ser debida a una fecundación por espermatozoides diploides o polispermica (cuando se lleva a cabo FIV convencional), o por un fallo en la meiosis ovocitaria (Egozcue et al. 2002, McFadden et al. 2002, Jun et al. 2006). La realización de un ICSI puede evitar las triploidías dispérmicas (también denominadas diándricas), pero no las triploidías diginicas (de origen materno) secundarias a la no extrusión del CP durante la segunda meiosis ovocitaria, conllevando la fecundación de un ovocito diploide

(Rosen et al. 2006). Por tanto, si a pesar de realizar un ICSI se sigue observando una alta tasa de triploidias hay que sospechar en un factor ovocitario oculto que comprometerá los resultados del FIV (Dayal et al. 2009).

Respecto al posible efecto de la EO sobre la génesis de triploidías, los estudios publicados no llegan a un consenso claro.

Mientras algunos autores correlacionan la triploidía con la alta respuesta a la EO (Sachs et al. 2000), otros no confirman esta correlación (Dayal et al. 2009). Se ha visto que la dosis de inicio de gonadotropinas así como el tiempo de exposición a las mismas son factores predictivos de génesis de triploidía (Rosen et al. 2006). A excepción del estudio de Sachs, se observó una disminución en la tasa de implantación y embarazo cuando aumenta la incidencia de triploidias. Cuando el porcentaje de embriones triploides es >20% la tasa de gestación se reduce a más de la mitad a pesar de transferir embriones morfológicamente normales. Los autores hipotetizan que el grado de triploidía observado tras la realización de un ICSI es un marcador de competencia de la cohorte ovocitaria (Dayal et al. 2009).

Estimulación ovárica y aneuploidías en el modelo humano

Los estudios en la especie humana sobre la relación entre las aneuploidías y la EO son menos abundantes y su implicación no está tan clara.

Como punto de partida, resulta interesante mencionar un estudio publicado en el año 2008 que analizó la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones procedentes de ciclos naturales (modificados) o no estimulados para FIV. La incidencia de aneuploidías resultó ser del 36,4%, lo cual sugería que las anomalías cromosómicas en embriones procedentes de FIV están presentes incluso en ausencia de estimulación ovárica. Aunque en este estudio no se utilizaron gonadotropinas exógenas, sí emplearon gonadotropina coriónica humana (hCG) para inducir la maduración ovocitaria final y la ovulación. Los propios autores comentan que no se puede descartar un posible efecto deletéreo sobre la euploidía embrionaria derivado de este factor. Los resultados de este estudio deben

ser interpretados con cautela debido a su escaso tamaño muestral (11 casos), aunque debe ser reconocido como el primer estudio que llevó a cabo este análisis en embriones procedentes de ciclos no estimulados (Verpoest et al. 2008).

El único estudio que comparó el ciclo no estimulado vs. ciclo estimulado llevó a cabo un análisis cromosómico en ovocitos. Comparó la incidencia de aneuploidías cromosómicas en ovocitos no inseminados de ciclos no estimulados donados por pacientes de FIV y la comparó con aquella en ciclos estimulados. La frecuencia de aneuploidía fue del 20% en ciclos no estimulados (4/20) y del 34% en ciclos estimulados (23/68). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas, por lo que concluyen que la EO en FIV no debe ser responsable por tanto de la alta frecuencia de aneuploidías observada en ovocitos humanos (Gras et al. 1992).

Hasta la fecha ningún estudio ha comparado la tasa de aneuploidías embrionarias en ciclo no estimulado vs. ciclo estimulado para cuantificar el efecto que la EO tiene sobre las mismas, pero sí que se han llevado a cabo comparaciones entre diferentes dosis de gonadotropinas.

De los escasos trabajos publicados al respecto, fue el de Baart en el año 2007 el que tuvo mayor repercusión. Este fue el primer estudio aleatorizado que comparó la incidencia de aneuploidías mediante FISH-PGS en mujeres infértiles menores de 38 años en función de la dosis y el protocolo de estimulación recibido. Un grupo recibió un protocolo con antagonistas de la GnRH que permitió una dosis de estimulación suave de 150 UI/día de FSH recombinante y el otro grupo un protocolo largo convencional con agonistas de la GnRH y 225 UI/día de FSH recombinante.

Aunque se obtuvo un mayor número de ovocitos por paciente en el grupo de estimulación convencional, no se observaron diferencias en el porcentaje de fecundación ni en el número de embriones biopsiados entre los dos grupos. Una menor tasa de aneuploidías fue observada en el grupo de EO suave, sugiriendo que las gonadotropinas incrementan las anomalías cromosómicas de un modo dosis dependiente. Al igual ocurrió con la

morfología, donde se constató que la tasa de embriones con morfología normal fue mayor en pacientes estimuladas con el protocolo suave. Como la respuesta ovárica fue menor en el grupo de EO suave, la media de embriones cromosómicamente normales fue comparable (alrededor de 2) entre ambos grupos. Otro dato relevante que observaron es que el incremento de anomalías cromosómicas observado en el grupo convencional se debía fundamentalmente a un aumento de la incidencia de mosaicismo. Por ello los autores concluyen que esta alta tasa de errores podría venir derivada de una alteración en la segregación mitótica en las primeras fases del desarrollo embrionario, a lo cual se añadiría la bien conocida causa de aneuploidias como es la malsegregación meiótica (Baart et al. 2007).

Posteriormente, Rubio y colaboradores publican un estudio en el que se analiza el impacto de la dosis de EO sobre las aneuploidias embrionarias en donantes de óvulos. Somete a éstas a una EO con un 30% menos de dosis que cuando hicieron previamente una alta respuesta, definida por la obtención de más de 20 ovocitos o niveles de E2 mayores de 3000pg/ml. En términos generales, no observa diferencias en el porcentaje de mosaicos ni de embriones anormales por embrión informativo, pero sí un mayor número de blastocistos euploides por ovocito maduro obtenido. En ambos grupos se obtiene una media similar de blastocistos cromosómicamente normales por donante (alrededor de 3). Posteriormente, se realiza el mismo análisis tras dividir a la muestra en 2 grupos: el grupo 1 es el grupo de donantes que respondió con el mismo número de ovocitos a pesar de reducir la dosis. En éste se observó una tendencia a menor porcentaje de mosaicos y embriones anormales por embrión informativo, así como menor tasa de aborto y mayor tasa de implantación cuando se reducía la dosis, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas como era de esperar por el escaso tamaño muestral. Sin embargo, esta tendencia no se observa en el grupo 2, que responde con aproximadamente la mitad de ovocitos cuando se reduce la dosis de gonadotropinas. Los autores sugieren que el grupo 1 son pacientes en las que se había sobrepasado el “umbral de FSH” y por

ello reducir la dosis mejora los resultados, mientras que el grupo 2 obtiene resultados similares porque ambos protocolos de EO estaban dentro de la “ventana de FSH” (Rubio et al. 2010a).

Estudios genéticos realizados a nivel postimplantatorio no apuntan en la misma dirección que lo publicado por Baart en 2007. En restos abortivos, la incidencia de aneuploidías no se ha visto incrementada en gestaciones procedentes de tratamientos con gonadotropinas o diferentes TRA -incluido el ICSI- frente a gestaciones espontáneas (Martinez et al. 2010, Massie et al. 2011, Bingol et al. 2012, Qin et al. 2013).

Por otra parte, en biopsias coriales realizadas en el primer trimestre de gestaciones que finalizan con el nacimiento de un niño, no se ve un incremento del riesgo de anomalías cromosómicas en gestaciones tras TRA en comparación con concepciones espontáneas, ni cuando la concepción ha sido *in vitro* versus *in vivo* (en inseminación artificial, por ejemplo) (Conway et al. 2011).

En lo referente al protocolo de estimulación o al tipo de gonadotropina utilizada y la incidencia de aneuploidías no hay estudios prospectivos publicados en la literatura, por lo que los datos expuestos a continuación proceden de análisis retrospectivos.

A nivel ovocitario, algunos autores observan una incidencia de aneuploidías similar tras estimulación con citrato de clomifeno (CC)-hMG o de protocolo largo con agonista de GnRH y hMG (Pieters et al. 1991, Van Blerkom, Henry 1992); o cuando comparan CC con hMG (Rosenbusch et al. 1993); mientras otros observan más ovocitos aneuploides en el grupo de protocolo largo con agonista de GnRH y hMG que en el de CC y hMG, de forma estadísticamente significativa (De Sutter, Dhont & Vandekerckhove 1992).

A nivel embrionario, Weghofer publicó 2 análisis retrospectivos con resultados contradictorios entre sí y que fueron criticados por posibles errores metodológicos pues la media de embriones analizados fue mucho mayor en un grupo (FSH) que en otro (hMG) sin explicación alguna (Ubaldi, Rienzi 2009). En el primero compara la incidencia de aneuploidías en protocolos largos con análogos agonistas de la GnRH en función de si la gonadotropina

utilizada era FSH o hMG. Observó mejores tasas de gestación así como menor porcentaje de aneuploidías embrionarias en el grupo que había recibido hMG (Weghofer et al. 2008). Sin embargo, posteriormente realiza una comparación similar en protocolos con antagonistas de la GnRH, obteniendo resultados opuestos aunque no estadísticamente significativos, salvo en lo referente a las tasas de embarazo que fueron mayores en el grupo que había recibido FSH sola (Weghofer et al. 2009).

Para finalizar, una breve reseña para mostrar cómo el impacto de la EO se ha estudiado a todos los niveles. Kaleli ha demostrado cómo la dosis elevada de gonadotropinas es la única variable que predice de forma significativa la alta incidencia de aneuploidías observada en las células de la granulosa obtenidas de folículos desarrollados tras una EO. De todos modos, la repercusión que pueda tener este hecho sobre la incidencia de aneuploidías ovocitarias y/o embrionarias no se ha esclarecido todavía (Kaleli et al. 2005).

Técnicas de Reproducción Asistida y resultados neonatales

Diversos estudios han evidenciado que aunque la mayoría de los niños procedentes de TRA están sanos, éstas están asociadas a un mayor riesgo de patología al nacer, incluyendo parálisis cerebral, en comparación con la concepción espontánea (Hansen et al. 2002, Helmerhorst et al. 2004, Schieve, Rasmussen & Reefhuis 2005, Lie et al. 2005, Zhu et al. 2006, Ceelen et al. 2007, El-Chaar et al. 2009, Hart, Norman 2013a). En los casos de ICSI, pero no de FIV, este incremento se mantiene presente tras ajustar los resultados por edad materna y otros factores de riesgo (Davies et al. 2012).

La causa de estos resultados obstétricos y neonatales desfavorables podrían ser atribuidos a uno o más factores derivados de los tratamientos de reproducción asistida en sí (EO, cultivo embrionario *in vitro* (Nelissen et al. 2012, Vergouw et al. 2012) e ICSI) o a factores relacionados con la propia paciente con problemas de infertilidad (edad, índice

de masa corporal o enfermedades asociadas) (Zenzen, Casper 1992, Thomson et al. 2005, De Geyter et al. 2006, Ombelet et al. 2006, Romundstad et al. 2008, Pelinck et al. 2010a, Sazonova et al. 2011, Pinborg et al. 2013).

En lo que se refiere a la EO, hasta el momento no se ha observado una relación entre los parámetros de EO como parte de un tratamiento de FIV (duración de la EO, dosis de gonadotropinas, número de ovocitos aspirados) con el peso al nacimiento del recién nacido (Griesinger et al. 2008). Tampoco se ha visto una mayor incidencia de defectos al nacimiento entre pacientes que han gestado tras recibir EO a dosis bajas y pacientes que han gestado de forma espontánea (Davies et al. 2012). Sin embargo, Pelinck y colaboradores observaron una tendencia a menor peso al nacer en los niños de FIV convencional en comparación con aquellos procedentes de gestaciones espontáneas y de ciclos de FIV con CNM, aunque admiten que el estudio tiene bajo poder estadístico por el escaso tamaño muestral (Pelinck et al. 2010b). Sus resultados sugieren que es la EO y no las condiciones de cultivo la causante de estas diferencias. En todo caso, el mecanismo por el cual la EO pudiera afectar al peso del RN no está claro. Se ha especulado que pudiera ser debido a las altas concentraciones de E2 alcanzadas durante la estimulación (Mitwally et al. 2006, Joo et al. 2010), que puedan finalmente alterar la receptividad endometrial o la invasión trofoblástica en los primeros estadios del embarazo (Simon et al. 1995).

La influencia de los medios de cultivo ha sido ampliamente estudiada en animales, observando una relación entre los componentes del medio de cultivo utilizado y el peso al nacer del RN (Rooke et al. 2007). En la especie humana, los estudios no emiten resultados tan concluyentes. Mientras algunos autores han evidenciado una relación entre el medio de cultivo empleado durante los 2-3 primeros días y el peso al nacer en transferencias de FIV realizadas en fresco, observando mejores resultados cuando se utiliza medio de cultivo Vitrolife® en comparación con Cook® (Nelissen et al. 2012), otros no han observado asociaciones tan significativas entre ambos factores (Vergouw et al. 2012, Eaton et al. 2012).

La repercusión que tiene el ICSI también se ha estudiado sobre las anomalías cromosómicas y se han obtenido resultados contradictorios. Un estudio observó una mayor incidencia de aneuploidías en restos abortivos de mujeres que se habían sometido a un ICSI en comparación con las observadas tras realización de FIV convencional (Lathi, Milki 2004), mientras que otro más reciente no ha encontrado dicha correlación (Kushnir, Frattarelli 2009).

En base a lo publicado en la literatura científica, pareciera haber más evidencia científica de que la causa de los peores resultados obstétricos, neonatales y de calidad embrionaria en términos de constitución cromosómica, se deba más a las condiciones de infertilidad/subfertilidad u obstétricas de la paciente que al procedimiento de FIV *per se* (Raatikainen et al. 2012, Hart, Norman 2013b).

Técnicas de reproducción asistida e impronta genética

Desde el año 2002, se han publicado diversos estudios que han evidenciado un incremento en la incidencia de síndromes raros asociados a impronta genética o “imprinting” en niños procedentes de TRA (Gosden et al. 2003). Si bien el riesgo de desarrollar una alteración de la impronta genética en niños nacidos tras TRA es muy bajo, el riesgo relativo es significativamente más alto que en niños tras gestaciones espontáneas.

La impronta genética es un proceso epigenético que permite la expresión de algunos genes procedentes de uno de los dos alelos (materno o paterno), mientras que el otro alelo queda silenciado. Los procesos que la regulan se deben a cambios en la metilación del ADN y modificación de las histonas (epimutaciones), y no por modificaciones en la secuencia de ADN. Parece que las TRA producen una hipometilación en el ADN del alelo materno.

Los síndromes que han mostrado mayor correlación con las TRA son los de Angelman o Beckwith-Wiedemann (Owen, Segars 2009), aunque también se han postulado otros síndromes como el de Prader-Willi, Silver-Russell, hipometilación materna o el retinoblastoma.

La reprogramación epigenética de los patrones de metilación del ADN tan críticos para establecer y mantener la impronta genética ocurren fundamentalmente durante el desarrollo de las células germinales y el desarrollo preimplantatorio, que son dos estadios especialmente vulnerables a las TRA (Wilkins-Haug 2008). En lo que respecta a la fase de desarrollo de las células germinales, las TRA afectarían fundamentalmente al alelo materno a través de su efecto sobre el ovocito. Estudios en animales muestran cómo la reprogramación epigenética en el ovocito se establece ya en la transición de folículo primordial a folículo antral y la impronta genética no se completa hasta que ocurre la ovulación (Hajkova et al. 2002). Esta es la razón por la cual los mecanismos de impronta genética materna serían más vulnerables a la EO, la cual acelera el crecimiento y maduración de los ovocitos, pudiendo alterar la metilación en los mismos.

A pesar de que inicialmente se sugirió que el ICSI pudiera incrementar la incidencia de síndrome de Angelman a través de alteraciones del imprinting tras 3 casos descritos (Cox et al. 2002, Orstavik et al. 2003), el incremento en la incidencia de los síndromes de Angelman o Beckwith-Wiedemann en niños procedentes de TRA parece estar más relacionado con el estado de infertilidad o los tratamientos de EO que con la técnica de inseminación utilizada –FIV versus ICSI– (Chang et al. 2005, Santos et al. 2010a).

En ovocitos de mujeres infértiles sometidas a EO se observa hipometilación del loci PEG1 materno e hipermetilación del H19 paterno en comparación con los ovocitos de mujeres fértiles inmaduros obtenidos durante una laparoscopia; de manera similar a lo observado en ovocitos de ratones fértiles, lo cual sugiere que la EO es la causante de estas alteraciones (Sato et al. 2007), de un modo dosis-dependiente (Market-Velker et al. 2010).

La presencia de epimutaciones que afectan igualmente a los alelos materno y paterno sugieren que el mantenimiento defectuoso de la impronta tras la fecundación es un importante mecanismo subyacente. Esta hipótesis se mantiene por los resultados de un estudio de patrones de metilación en placentas de ratón obtenidas tras EO, que mostraban hipometilación tanto en los alelos maternos como paternos (Fortier et al. 2008).

Más recientemente se ha publicado otro trabajo que apunta en dirección opuesta, mostrando cómo los patrones de metilación de *Snrpn*, *Peg3*, *Kcnq1ot1* y *H19* no se ven afectados en los ovocitos procedentes de ratonas estimuladas con dosis bajas y altas de hormonas en comparación con aquellas que habían ovulado espontáneamente (Denomme, Zhang & Mann 2011). En humanos, no se han observado diferencias funcionalmente relevantes en los niveles de metilación en placenta o sangre de cordón de niños procedentes de tratamientos de inducción de la ovulación o FIV en comparación con gestaciones espontáneas (Rancourt et al. 2012).

En muchas ocasiones, debido a la variabilidad de las TRA entre diferentes centros, al escaso tamaño muestral y a la imposibilidad de controlar todos los factores de confusión, es difícil establecer de forma rigurosa una asociación entre las alteraciones de la impronta genética y un procedimiento específico (por ejemplo, FIV o ICSI, medios de cultivo...etc). De hecho, se ha sugerido que dicha asociación pueda ser casual; o lo que es más probable, secundario al estado de infertilidad de la paciente (Buckett, Tan 2005, Doornbos et al. 2007).

En definitiva, el interés sobre el tema continúa presente ya que las TRA, incluyendo la EO y la manipulación de embriones preimplantatorios, tienen lugar en etapas críticas del desarrollo, cuando la impronta genética ha mostrado ser más vulnerable en estudios en animales.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Lo presentado hasta ahora deja patente la importancia que se ha otorgado a los efectos que las TRA pueden ejercer sobre la calidad ovocitaria, la calidad embrionaria y la salud de los niños nacidos procedentes de estos tratamientos.

A lo largo de los años han ido evolucionando las técnicas de diagnóstico genético, se han modificado las dosis y las drogas utilizadas para estimular el ovario y han mejorado los medios de cultivo. Esto ha podido influir en que los trabajos publicados en todo este tiempo no han ido siempre en la misma dirección y presentan cierta disparidad de resultados.

Con el fin de centrarnos en un dato concreto, este estudio se ha basado en analizar el efecto de la EO con gonadotropinas sobre la incidencia de aneuploidías. La pregunta que se hace el clínico hoy en día es si un embrión cromosómicamente anormal lo es por las características intrínsecas de la paciente o porque los factores exógenos, entre ellos la EO, han ejercido un efecto deletéreo sobre el mismo.

En base a lo publicado hasta la fecha, la hipótesis planteada en este trabajo es que en la especie humana la EO aumenta la incidencia de aneuploidías cuando la edad no influye de forma decisiva en la misma (por ejemplo en mujeres jóvenes).

El presente trabajo pretende, en primer lugar, estudiar la incidencia real de aneuploidías en el ciclo no estimulado en mujeres jóvenes y fértiles para definir el estado basal en la especie humana *in vitro*. Partiendo de ese punto, investigaremos si la EO incrementa la tasa de aneuploidías embrionarias.

Para tal fin, se ha llevado a cabo una comparación en la tasa de aneuploidías embrionarias entre un ciclo no estimulado y un posterior ciclo estimulado en la misma mujer.

Hasta la fecha, este es el primer trabajo que ha llevado a cabo este tipo de análisis intrasujeto.

OBJETIVOS

Principal

El objetivo principal del estudio es comprobar si la EO *per se* conlleva a la generación de un mayor porcentaje de embriones con alteraciones cromosómicas numéricas embrionarias o aneuploidías en mujeres jóvenes, y por tanto exentas del efecto deletéreo de la edad.

Para ello se llevará a cabo un doble análisis comparativo en mujeres fértiles y jóvenes (donantes de ovocitos):

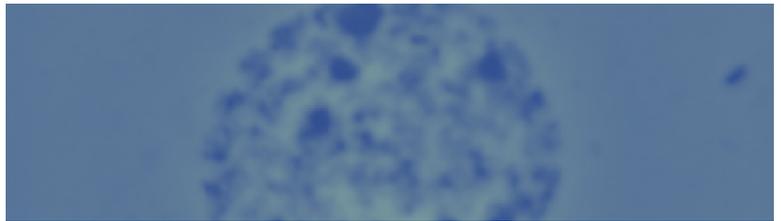
- Comparar la proporción de embriones con aneuploidias en el ciclo no estimulado con la observada en el ciclo estimulado (comparación global entre ambos ciclos).
- Comparación de la media del porcentaje de embriones aneuploides por sujeto en cada uno de los ciclos (comparación intrasujeto entre ambos ciclos).

Secundarios

1. Comparar el flujo de pacientes y las tasas de cancelación del ciclo no estimulado y estimulado.
2. Analizar los parámetros de la fase folicular y desarrollo embrionario en ambos ciclos (no estimulado y estimulado).
3. Estudiar la incidencia real de aneuploidías en el ciclo no estimulado en mujeres jóvenes y fértiles para definir el estado basal en la especie humana *in vitro*.
4. Comparar la calidad embrionaria entre ambos ciclos, en términos de número de blastómeras y porcentaje de fragmentación.
5. Comparar el número de embriones euploides por ovocito MII obtenido en ambos tipos de protocolo.

6. Correlacionar el resultado obtenido tras el PGS en el ciclo no estimulado (euploide/aneuploide) y la tasa de aneuploidías en el ciclo estimulado ulterior.
7. Calcular el número medio de embriones euploides por ciclo de donación ovocitaria tras estimulación ovárica.
8. Correlacionar la respuesta ovárica a la EO con el número absoluto de embriones obtenidos (euploides, aneuploides y no biopsiables).
9. Correlacionar la respuesta ovárica a la EO con la tasa de aneuploidías.
10. Correlacionar la dosis total de gonadotropinas administradas en el ciclo estimulado con la tasa de aneuploidías.
11. Comparar el tipo de anomalía cromosómica y el cromosoma afectado en ambos ciclos.
12. Analizar la fiabilidad de nuestra técnica de FISH-PGS a través del estudio de reconfirmación del diagnóstico en día 5 de desarrollo embrionario.
13. Analizar los resultados gestacionales en las pacientes receptoras.
14. Comparar la eficacia del ciclo no estimulado y del ciclo estimulado en términos de tasas de gestación evolutiva por ciclo completado

MATERIAL Y MÉTODOS



AMBITO DEL ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) durante el periodo comprendido entre septiembre de 2006 y marzo de 2010.

El Comité de Proyectos de Investigación Clínica (con número de protocolo 0607-C-M09-EL) y el Comité ético de nuestra institución aprobaron el estudio antes de ser iniciado (véase anexo 1).

El estudio fue dado de alta en la base de datos de ensayos clínicos Clinicaltrials.gov (<http://clinicaltrials.gov>). El número de registro asignado es NCT00707525.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio prospectivo de cohortes con comparación intra-sujeto de la incidencia de aneuploidías embrionarias tras un ciclo no estimulado y un posterior ciclo estimulado.

Población del estudio

El estudio se llevó a cabo en ciclos de donación tanto ovocitaria como espermática, con el fin de excluir cualquier factor que pudiera incrementar el riesgo de aneuploidías (por ejemplo: edad materna avanzada, problemas relacionados con la infertilidad o factor masculino severo).

La otra población del estudio consiste en las pacientes receptoras, en las que se analizará exclusivamente los resultados gestacionales del ciclo de donación.

Tanto las donantes como las receptoras aceptaron participar en el estudio tras una descripción detallada del mismo; y firmaron el consentimiento informado pertinente (véase anexo 2 y anexo 3).

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión comunes para las donantes de óvulos y los donantes de semen son: edad comprendida entre 18 y 34 años; con exploración física y cariotipo normal; sin historia familiar de enfermedades hereditarias o cromosómicas y con serologías negativas para enfermedades de transmisión sexual, como virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis C y B, y bacteria *Treponema Pallidum* causante de la sífilis.

Los criterios de inclusión específicos para el estudio para las donantes de óvulos son los siguientes: fértiles (al menos un hijo nacido vivo y/o una interrupción voluntaria del embarazo); ciclos menstruales regulares (entre 25 y 35 días); estudio hormonal basal normal (FSH < 10UI/l y E2 < 50pg/ml); índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 25 Kg/m² y no antecedentes de tratamientos de EO. Donantes con endometriosis, síndrome de ovario poliquístico (SOP, según criterios de Rotterdam) o abortos de repetición (considerados como 3 o más abortos clínicos previos), fueron excluidas.

En el caso de los donantes masculinos sólo fueron aceptadas muestras de semen con más de 90×10^6 de espermatozoides móviles progresivos en el eyaculado y con >14% de formas normales (Garrido et al. 2002). El criterio para seleccionar la muestra de esperma de nuestro banco es que el donante haya probado ser fértil previamente en nuestro programa de inseminación artificial, como es nuestra práctica clínica habitual. La muestra congelada debe ser suficiente para utilizarla tanto en el ciclo natural como en el estimulado de la misma donante de ovocitos.

Los criterios de inclusión para las receptoras de gametos son: menores de 45 años de edad; IMC <30Kg/m²; no enfermedades orgánicas o sistémicas; precisando un tratamiento de donación de óvulos y semen. Se excluyen aquellas con aborto de repetición, fallo de implantación o cualquier tipo de patología uterina (pólipos, miomas, malformaciones müllerianas) o anexial (hidrosalpinx comunicante).

Procedimientos

Fase folicular

Las donantes de óvulos fueron sometidas a 2 ciclos de FIV:

- Fase 1: Ciclo no estimulado:

El ciclo natural espontáneo de la donante fue monitorizado mediante controles ecográficos por vía vaginal y analíticas de sangre hormonales. Se realizó una ecografía en estado basal (día 1-5 ciclo) para comprobar que los ovarios se encontraban en reposo y descartar la presencia de cualquier tipo de quiste funcional. En día 8-10 de ciclo se realizó un primer control ecográfico que se repitió posteriormente cada 2 días. Cuando el folículo dominante alcanzó los 14 mm de diámetro, se llevaron a cabo controles ecográficos diarios junto con mediciones de los valores séricos de E2. En el momento que el folículo preovulatorio alcanzó 18 mm de diámetro se realizaron igualmente determinaciones de E2, P y LH y se programó la punción folicular tras la administración de 250mcg de coriogonadotropina recombinante (rCG, Ovitrelle®, Merck-Serono, Ginebra, Suiza). Esta es la única intervención médica que se llevó a cabo en la donante en este ciclo no estimulado (véase figura 1A).

- Fase 2: Ciclo estimulado con agonistas de la GnRH en protocolo largo y estimulación ovárica convencional:

El inicio del agonista de la GnRH se realizó en la fase lútea media (día 18-22) del ciclo previo a la estimulación, con el objetivo de que el efecto *flare up* inicial no encuentre folículos receptivos que inicien su crecimiento. Para iniciar el tratamiento, se llevó a cabo una ecografía con el fin de comprobar ovulación mediante la presencia de un cuerpo lúteo en uno de los dos

ovarios. En caso afirmativo, se inició la administración subcutánea de acetato de leuprorelina 0,2ml/día (Procrin®, Abbott, Madrid, España) o triptorelina 0,1 mg/día (Decapeptyl®, Ipsen Pharma, Barcelona, España) con el fin de inducir el frenado hipofisario.

Tras la menstruación de la donante, realizamos una segunda ecografía para comprobar la desensibilización hipofisaria y el estado basal de los ovarios (no deben observarse folículos mayores de 10 mm) y se inició el tratamiento de EO con gonadotropinas exógenas a dosis moderadas el 2º ó 3º día de ciclo. En este momento, la dosis del análogo de GnRH se redujo a la mitad y el tratamiento consistió en la administración conjunta de análogo de GnRH y gonadotropinas. Estas fueron administradas diariamente mediante una combinación de 150 UI de FSH recombinante (FSHrec, Gonal®, Merck-Serono, Ginebra, Suiza) y 75 UI de gonadotropina menopáusica humana altamente purificada (hp-hMG, Menopur®, Ferring Pharmaceuticals, Copenhague, Dinamarca).

La monitorización del ciclo se realizó mediante ecografía transvaginal para contabilizar y medir los folículos en desarrollo. El primer control se realizó al 5º día de haber iniciado las gonadotropinas y los controles posteriores se establecieron en función de la respuesta de las donantes, siendo cada 2 días a partir de folículos de 14 mm, siguiendo el protocolo habitual de nuestro programa de donación ovocitaria.

Cuando evidenciamos la presencia de 6 o más folículos con un mínimo de 17 mm de diámetro, se indujo la ovulación con rCG (Ovitrelle®, Merck-Serono, Ginebra, Suiza) y se programó la punción folicular (véase figura 2B). En este momento cesó la administración de medicación. El último día de estimulación (día de administración de rCG) se llevaron a cabo determinaciones hormonales séricas de E2 y P.

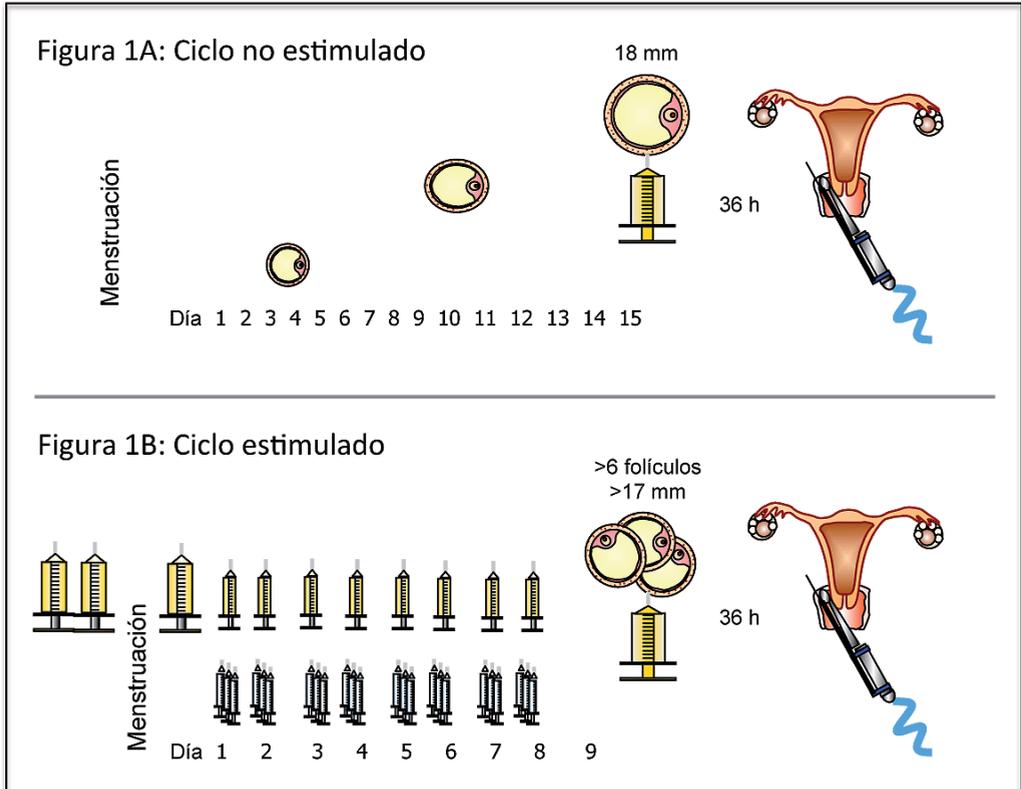


Figura 1: Procedimientos llevados a cabo durante la fase folicular del ciclo no estimulado (figura 1A) y del ciclo estimulado (figura 1B).

En el ciclo no estimulado la única medicación administrada corresponde a la inyección de rCG cuando el folículo preovulatorio alcanza los 17 mm de diámetro. El ciclo estimulado consiste en la administración de gonadotropinas en el contexto de un protocolo largo con agonistas de la GnRH, con inyección de rCG cuando ≥ 6 folículos alcanzan los 17 mm diámetro.

Punción folicular o aspiración ovocitaria

En ambos ciclos, la punción folicular ecoguiada por vía transvaginal se llevó a cabo 36 horas tras desencadenar la maduración ovocitaria final con rCG.

Para su realización la donante acudió en ayunas, se comprobó vaciado vesical y se llevó a cabo una venoclisis. Para la preparación en quirófano se colocó a la donante en posición

de litotomía y se realizó una limpieza del campo operatorio mediante lavado vaginal con abundante suero fisiológico. Como medida adicional, la noche previa a la punción la donante recibió profilaxis antibiótica con 1 gr de azitromicina por vía oral en dosis única.

El procedimiento, cuya duración no excede más de 5 minutos en el ciclo no estimulado y 10-15 minutos en el estimulado, se realizó bajo anestesia general consistente en una sedación sin intubación para lo que empleamos propofol y fentanilo, así como ventilación asistida por mascarilla con oxígeno.

La técnica en sí misma consistió en la introducción de la sonda transvaginal del ecógrafo protegida con una funda estéril y con una guía acoplada para introducir a través de la misma la aguja de aspiración de única vía. En el ciclo no estimulado, localizamos el único folículo preovulatorio y se puncionó a través del fondo de saco vaginal. Entonces se conectó la bomba de vacío de regulación continua y se aspiró el líquido folicular, el cual va a parar a un tubo de aspiración que se deposita en un bloque térmico regulado a 37° con el fin de mantener la temperatura hasta que el contenido sea procesado en el laboratorio de FIV para la recogida de los ovocitos. En el ciclo estimulado, localizamos el ovario más accesible, y se puncionó el folículo más cercano al punto de entrada de la aguja, cuando éste presenta su diámetro mayor. Una vez realizada la punción de todos los folículos de un ovario, se extrajo la aguja y se procedió a puncionar el otro ovario.

Posteriormente, la donante se mantuvo en observación durante 1-2 horas en el centro para vigilar si aparecía algún tipo de complicación y administrar analgésicos en caso necesario.

Procedimientos del laboratorio de FIV

Tras la recuperación y lavado de los ovocitos se procedió a la valoración de la calidad de los mismos por el aspecto morfológico y el grado de expansión de las células del cúmulo.

Para conocer el grado de maduración del ovocito, se realizó la decumulación, lo cual implica desprender al ovocito de las células del cúmulus que lo rodean. Para ello se

sometió a los ovocitos a una solución de hialuronidasa, y se fueron pasando por capilares de calibres progresivamente menores, hasta un diámetro aproximado de 140 μm . Una vez decumulados, se clasificaron los ovocitos según su estadio de maduración.

El ovocito madura desde el punto de vista nuclear y se encuentra en metafase II (MII) cuando alcanza la metafase de la segunda división meiótica y elimina el primer corpúsculo polar. Todos los ovocitos MII fueron seleccionados e inseminados con el semen de donante. Los ovocitos metafase I (MI) o en estadio de vesícula germinal (VG) fueron descartados.

En el presente estudio, el método de inseminación de los ovocitos fue la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), consistente en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito.

Por tanto, el ICSI se llevó a cabo en todos los casos en ambos ciclos, siguiendo nuestra práctica clínica en ciclos de PGS con el fin de evitar contaminación por ADN externo y de incrementar el número de ovocitos fecundados, y, por tanto, el número potencial de embriones disponibles para analizar.

La fecundación fue comprobada a las 17-20 h del ICSI y la división embrionaria evaluada diariamente (cada 24 horas). Los embriones fueron colocados en medio IVF/CCM (ratio 1:1) (Vitrolife®, Göteborg, Suecia) hasta día 3 de desarrollo y después cultivados en medio CCM con una monocapa de células endometriales hasta día 5, cuando los embriones cromosómicamente normales fueron transferidos o vitrificados (Mercader et al. 2003).

La biopsia embrionaria se realizó en día 3 de desarrollo. Tanto en ciclo no estimulado como estimulado, sólo se biopsiaron aquellos embriones con al menos 6 blastómeras en día 3 de similar tamaño y menos del 20% de fragmentación, es decir, con morfología normal y desarrollo adecuado. La fragmentación es un parámetro relacionado con la calidad embrionaria, y se refiere al porcentaje del volumen total del embrión ocupado por fragmentos resultantes de la degeneración de una o más blastómeras.

La rotura de la zona pelúcida (ZP) se llevó a cabo con un sistema de láser infrarrojos (OCTAX®, Herbron, Alemania), que libera el rayo láser a través del objetivo del microscopio

sin necesidad de contacto directo con la zona diana, produciendo una rotura térmica por la absorción de la energía del láser por la ZP.

Posteriormente se procedió a la biopsia embrionaria mediante la aspiración con pipeta de blastómeras. Aunque habitualmente se aspiran 1 ó 2 blastómeras en función de la calidad del embrión y del análisis genético a realizar, en el presente trabajo, con el fin de evitar sesgos y ser homogéneos, una sola blastómera fue biopsiada en todos los casos, independientemente del número de células. La aspiración se realizó suavemente sobre blastómeras con núcleo único y visible.

Tras la biopsia, se retiraron los embriones de la placa de biopsia y se lavaron repetidas veces en una placa con medio de cultivo para eliminar los restos de medio de biopsia sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . Posteriormente se procedió a la fijación del núcleo de cada una de las blastómeras, para eliminar restos de citoplasma y que los núcleos mantengan su integridad y morfología. Este paso es decisivo porque la calidad de las extensiones condiciona el acceso de las sondas de ADN al núcleo y de ello depende la eficiencia de hibridación.

En el PGS para despistaje de aneuploidías de 9 o más cromosomas se lleva a cabo el protocolo de FISH secuencial con la realización de 2 ó 3 rondas de hibridación. La hibridación simultánea de sondas centroméricas y específicas de locus para varios cromosomas permite descartar muchas de las aneuploidías humanas más frecuentes.

De forma sistemática, se llevaron a cabo 2 hibridaciones consecutivas para el análisis de 9 cromosomas mediante FISH:

- 1) En la primera ronda de hibridación se analizaron simultáneamente los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 mediante la utilización del kit comercial MultiVysion™ PB. Tras interpretar y registrar las señales, se eliminan éstas para proceder a la segunda ronda de hibridación.

- 2) La segunda ronda de hibridación analizó los cromosomas 15, 17, X y Y con el kit MultiVysion™ 4 colores (Vysis®, Inc. Downers Grove, IL, USA).

Adicionalmente, se llevaron a cabo rondas de re-hibridación con sondas subteloméricas para rescatar embriones no informativos o con monosomías, como se ha descrito previamente (Mir et al. 2010).

El resultado del estudio FISH se obtuvo en día 5 de desarrollo embrionario, momento en el cual se llevó a cabo una transferencia intrauterina ecoguiada de un máximo de un embrión (en el ciclo no estimulado) o de dos embriones (en el ciclo estimulado) siempre y cuando se dispuso de embriones euploides tras el análisis cromosómico.

Con el fin de validar la fiabilidad de nuestro diagnóstico en día 3, una selección aleatoria de treinta y seis embriones (aneuploides, o euploides detenidos tras la biopsia embrionaria) fueron reanalizados en día 5 mediante FISH (en términos generales, analizamos 1 de cada 2 embriones aneuploides en el ciclo no estimulado y 1 de cada 4 en el ciclo estimulado). Los embriones reanalizados en día 5 se clasificaron como normales cuando >80% de las células eran cromosómicamente normales; homogéneamente anormales cuando >80% de las células eran portadoras de la misma anomalía o mosaicos anormales cuando tenían dos o más líneas celulares, cada una de ellas con $\geq 20\%$ de células anormales (Mir et al. 2010).

Preparación endometrial en las receptoras de gametos

Para la preparación del endometrio en las receptoras de gametos se utilizó terapia hormonal sustitutiva, consistente en la administración de estrógenos (valerianato de estradiol, VE) desde el primer día de ciclo menstrual.

El VE se administró indistintamente por vía oral (6 mg/día) o transdérmica (2 parches de 75 mg/48 horas). Tras 7-10 días de tratamiento estrogénico se llevó a cabo una ecografía transvaginal con el objetivo de medir el grosor endometrial a unos 1,5-2 cm del fondo uterino en un corte longitudinal del mismo y corroborar que se encontraba en fase proliferativa con el aspecto claramente trilaminar. En caso afirmativo, continuaron con el mismo tratamiento hasta recibir la donación, momento en el que se añadió el tratamiento con progesterona

vaginal micronizada a dosis de 400mg/12 horas desde el día 1 de desarrollo embrionario, una vez confirmada la fecundación correcta de los ovocitos.

Si el grosor endometrial era inferior a 6 mm, incrementamos la dosis de VE y se repitió la ecografía a los 7 días para comprobar que había llegado a ese espesor. Si el endometrio no superó los 6 mm de espesor, no se llevó a cabo la donación y la receptora no fue incluida en el estudio para evitar introducir un sesgo por factor uterino anómalo que pueda influir en las tasas de gestación.

En caso de que la receptora tuviera ciclos ováricos menstruales, fue necesario suprimir la función ovárica para tener el control del ciclo evitando una ovulación prematura. La supresión de la función ovárica se consigue con la inyección de una dosis única de 3,75 mg de acetato de triptorelina, un agonista de la GnRH de liberación prolongada (Decapeptyl Mensual®, Ipsen Pharma, Barcelona; España) en la fase lútea media del ciclo previo, sobre el día 18-22 de ciclo. En mujeres menopausicas no es necesaria esta medida, pues ya tienen suprimida la función ovárica. En este caso, iniciamos directamente la terapia hormonal sustitutiva.

En caso de sangrado durante la fase estrogénica se canceló el ciclo de la receptora por disminuir las posibilidades de implantación y se reinició posteriormente un nuevo ciclo de terapia hormonal sustitutiva.

PROTOCOLO

Si el embrión resultante de la fase 1 resultó euploide, se realizó una transferencia embrionaria intrauterina única. Si la paciente receptora logró una gestación evolutiva, los embriones procedentes de la fase 2 se donaron a una nueva receptora de óvulos y semen. Si no se logró una gestación evolutiva, la misma receptora recibió los embriones procedentes del ciclo estimulado.

Si el embrión resultante del ciclo no estimulado fue aneuploide, se canceló la transferencia embrionaria y la donante fue remitida al ciclo estimulado. Un máximo de 2 embriones fueron transferidos tras el ciclo estimulado (véase figura 2).

El intervalo de tiempo entre ambos ciclos fue de un máximo de 3 meses. En todos los casos, la muestra de semen fue la misma para ambos ciclos para minimizar al máximo el sesgo que pudiera suponer el factor seminal.

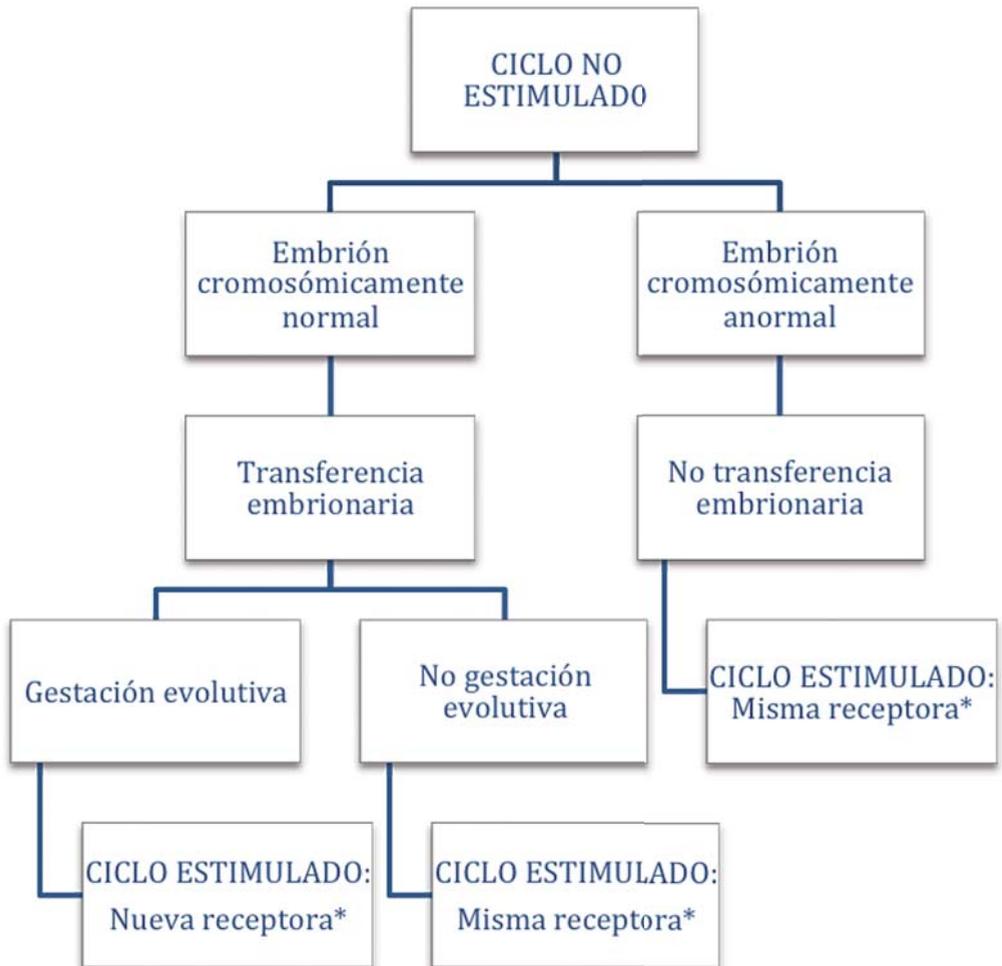


Figura 2: Protocolo del estudio. Las donantes de óvulos son sometidas a un ciclo no estimulado y posteriormente a un ciclo de estimulación ovárica controlada.

* La muestra de semen donado es la misma para los ciclos no estimulado y estimulado de la misma donante.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Calculo del tamaño muestral

El tamaño muestral fue calculado con el objetivo de detectar una diferencia de 22 puntos en la incidencia de aneuploidía entre ambos grupos (de un 33% en el ciclo no estimulado a un 55% tras EOC), en un test de 2 colas, con un poder estadístico del 80% (error $\beta = 0,2$), y un índice de confianza del 95% (error $\alpha = 0,05$), y estimando una media de 6 embriones analizados por ciclo estimulado. Esta diferencia se estimó de acuerdo a la incidencia de aneuploidía previamente descrita en donantes de ovocitos en ciclos de estimulación ovárica (Reis Soares et al. 2003, Munne et al. 2006) y también de acuerdo a la tasa de embriones normales aceptada en parejas fértiles (Reis Soares et al. 2003, Rodrigo et al. 2010). De acuerdo con estos criterios, era necesario reclutar a 45 donantes de ovocitos para comparar ambos ciclos (no estimulado versus estimulado) en la misma mujer. Estimamos una tasa de pérdidas del 15% entre las mujeres que completaron el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado, por lo que finalmente reclutamos donantes para el ciclo no estimulado hasta que 51 completaron éste.

Análisis estadístico

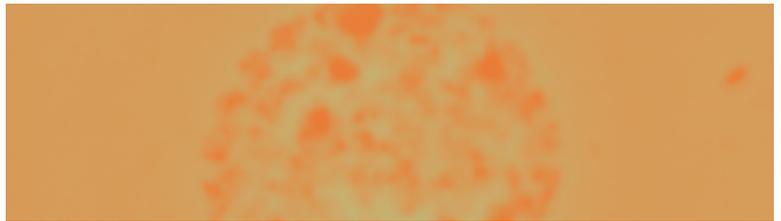
Se llevó a cabo una comparación de medias mediante *t* de student para las variables numéricas y Chi-cuadrado para variables categóricas entre ambos grupos. Igualmente se calcularon los riesgos relativos (RR) con su correspondiente intervalo de confianza del 95% para las comparaciones entre variables categóricas.

Para realización de análisis no paramétricos, se utilizó el test U-Mann Whitney.

Para la comparación intrasujeto de la tasa de embriones cromosómicamente anormales entre ambos grupos, se llevó a cabo un test *t* de muestras pareadas.

Para analizar la relación existente entre la respuesta ovárica en ciclos de EO y el número de embriones euploides, se realizó una regresión lineal.

RESULTADOS



FLUJO DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Fase 1: Ciclo no estimulado

El estudio incluye 185 donantes candidatas que fueron inicialmente reclutadas. De las mismas, 64 fueron canceladas en el ciclo no estimulado por los siguientes motivos: ovulación precoz (n=37), ciclo anovulatorio (n= 17) y auto-cancelación por voluntad propia (n=10).

Se realizó la punción folicular en 121 mujeres (65,4%), obteniendo ovocito en 99 de ellas (tasa de obtención de ovocito por punción: 81,8%). De los 99 ovocitos, 89 resultaron metafase II (89,9%), 8 fueron inmaduros y 2 presentaron zona rota. La tasa de fecundación fue del 64,0% (57 ovocitos fecundados de 89 metafase II). Cincuenta y uno de los 57 cigotos llegaron a día 3 de desarrollo y cumplieron criterios para poder biopsiar una blastómera con el fin de llevar a cabo un screening genético preimplantacional mediante FISH.

Fase 2: Ciclo estimulado

De las 51 mujeres que completaron el ciclo no estimulado, 4 rechazaron continuar el protocolo por motivos personales y no se sometieron al ciclo estimulado. De las 47 restantes que fueron sometidas a la estimulación ovárica controlada, 46 casos completaron el protocolo. Un caso no fue completado porque ninguno de los embriones fue apto para ser biopsiado.

En resumen, 51 casos completaron el ciclo no estimulado, de las cuales 46 completaron igualmente el ciclo estimulado. Definimos un protocolo o ciclo completo cuando al menos un embrión fue candidato a ser biopsiado para llevar a cabo un FISH-PGS en ambos ciclos.

La figura 3 muestra, de forma gráfica, el flujo de la población del estudio.

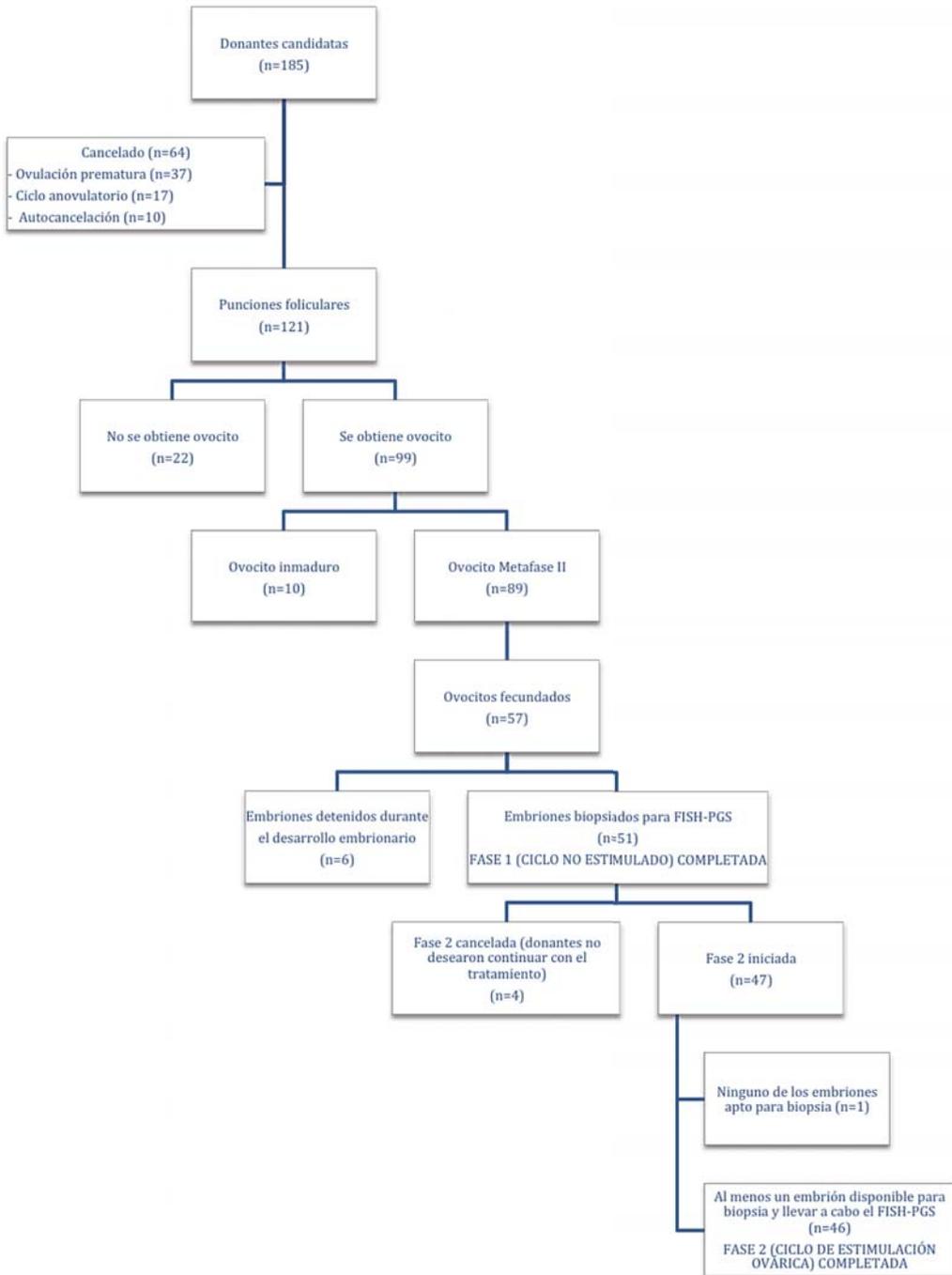


Figura 3: Flujo de la población del estudio.

CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO

La edad media de las donantes de óvulos que completaron el estudio fue de $25,4 \pm 4,0$ años. Su índice de masa corporal (IMC) fue de $22,5 \pm 2,8$ (Kg/m²) y los niveles de FSH y E2 en estado basal (3º día de ciclo menstrual) fueron de $6,1 \pm 2,1$ UI/L y 48 ± 15 pg/ml, respectivamente.

La población de receptoras de óvulos y semen tienen una edad media de $39,7 \pm 3,5$ años con un IMC de $25,6 \pm 4,1$ (Kg/m²).

FASE FOLICULAR Y DESARROLLO EMBRIONARIO

Los datos descriptivos de los parámetros de la fase folicular y desarrollo embrionario en ambos ciclos se muestran en la tabla 1.

El nivel medio de E2 sérico al final de la fase folicular (el día de la administración de rCG) fue $195,2 \pm 63,3$ pg/ml en el ciclo no estimulado, significativamente inferior al observado en el ciclo estimulado (2707 ± 1135 pg/ml, $p < 0,0001$). El nivel medio de P sérica al final de la fase folicular fue igualmente significativamente inferior en el ciclo no estimulado respecto al ciclo estimulado ($0,4 \pm 0,2$ vs. $0,8 \pm 0,3$ ng/ml, respectivamente, $p < 0,001$).

En el ciclo no estimulado, los valores séricos de E2, P y LH fueron significativamente más altos en las donantes que ovularon precozmente (37 casos) respecto a las que llegaron a realizarse una punción folicular (121 casos): para el E2: 215 ± 71 vs. 174 ± 69 pg/ml, respectivamente, $p = 0,006$; para la P: $0,66 \pm 0,29$ vs. $0,38 \pm 0,17$ ng/ml, respectivamente, $p < 0,001$ y para la LH: $33,5 \pm 19,5$ vs. $10,1 \pm 8,0$ UI/L, respectivamente, $p < 0,001$. El diámetro del folículo dominante el día de la administración de rCG no difería en los casos de ovulación precoz y los que llegaron a punción folicular: $18,7 \pm 1,3$ mm vs. $18,4 \pm 1,0$ mm, respectivamente, $p = 0,121$.

RESULTADOS

El número de ovocitos MII necesarios para obtener un embrión euploide resultó de 3 en el ciclo no estimulado y 3,4 en el ciclo estimulado ($p=0,376$).

En el ciclo no estimulado todos los embriones biopsiados resultaron ser informativos para los cromosomas estudiados, mientras que en el ciclo estimulado, cuatro de los 307 embriones no fueron informativos. Consideramos embrión informativo a aquel en el que se obtienen resultados concluyentes tras el análisis mediante FISH. Un embrión se clasifica como normal o euploide con resultado concluyente cuando la blastómera muestra dos señales para cada uno de los cromosomas analizados. Por el contrario, un embrión aneuploide muestra un número anormal de señales para uno o varios cromosomas estudiados, independientemente de si alguno de los demás cromosomas muestra un resultado no concluyente.

<i>Ciclo no estimulado (n=51 donantes)</i>	
Estradiol sérico el día de rCG (pg/ml)	195,2 ± 63,3
Progesterona sérica el día de rCG (ng/ml)	0,4 ± 0,2
LH sérica el día de rCG (UI/L)	10,54 ± 8,1
Número de ovocitos obtenidos	99 (81,8% por punción folicular)
Número de ovocitos metafase II	89 (89,9% de los ovocitos obtenidos)
Número de ovocitos fecundados	57 (64% de los ovocitos metafase II)
Número de embriones no biopsiables	6
Número de embriones biopsiados	51
Número de embriones informativos	51
<i>Ciclo estimulado (n=46 donantes)</i>	
Duración de la estimulación (días)	10,1 ± 2,3
Dosis total de gonadotropinas (UI)	2230 ± 670
Estradiol sérico el día de rCG (pg/ml)	2707 ± 1135
Progesterona sérica el día de rCG (ng/ml)	0,8 ± 0,3
Nº de ovocitos obtenidos	820 (17,8 ± 7,7)
Nº de ovocitos metafase II	618 (13,4 ± 6,2) (75,4% de los ovocitos obtenidos)
Número de ovocitos fecundados	469 (10,2 ± 4,8) (75,9% de los ovocitos metafase II)
Número de embriones no biopsiables	162
Número de embriones biopsiados	307
Número de embriones informativos	303

Tabla 1: Análisis descriptivo de los parámetros de la fase folicular y del desarrollo embrionario de los 51 ciclos no estimulados y de los 46 ciclos estimulados en los cuales se llevó a cabo el FISH-PGS.

- Los datos presentados con el símbolo ± hacen referencia a media ± desviación estándar (DE).

RESULTADOS

La tabla 2 muestra las comparaciones entre parámetros relacionados con el laboratorio de FIV entre el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado.

	<i>Ciclo no estimulado</i>	<i>Ciclo estimulado</i>	<i>p</i>
% de ovocitos MII respecto al total de ovocitos	89,9% (82,2-95,0)	75,4% (72,3-78,3)	0,00
Tasa de fecundación	64,0% (53,2-73,9)	75,9 % (72,3-79,2)	0,02
% de embriones no biopsiables *	10,5% (4,0-21,5)	34,5% (30,2-39,0)	0,00

Tabla 2: Análisis comparativo entre parámetros del laboratorio de FIV en ambos ciclos.

• Los datos se presentan como porcentaje (%) e Intervalo de Confianza del 95% (IC 95%). Valor $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

* Los embriones no biopsiables son aquellos que no cumplieron los criterios establecidos de biopsia embrionaria.

RESULTADOS DEL PGS EN CICLO NO ESTIMULADO Y CICLO ESTIMULADO

Un total de 51 y 307 embriones fueron biopsiados en el ciclo no estimulado (n=51 ciclos) y el estimulado (n=46 ciclos), respectivamente.

La proporción de anomalías cromosómicas embrionarias en la muestra total de 51 ciclos no estimulados completados fue de 35,3% (18/51).

De éstos 51 ciclos no estimulados, cinco no completaron el posterior ciclo estimulado. Las comparaciones de los resultados del PGS de las 46 donantes que completaron el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado se presentan en la tabla 3.

Hubo 2 casos en el ciclo estimulado en los cuales la totalidad de los embriones analizados resultaron aneuploides, en los cuales se pudieron biopsiar sólo 2 y 3 embriones, respectivamente.

La media de embriones criopreservados en el ciclo estimulado fue de $1,8 \pm 2,2$.

Como queda reflejado en la tabla 3, la proporción de embriones aneuploides en el ciclo no estimulado fue de 34,8% (16/46) mientras que en el ciclo estimulado fue de 40,6% (123/303), con una diferencia de riesgos de 5,8 (IC 95%: -20,6-9,0) y un riesgo relativo (RR) de 1,17 (IC 95%: 0,77-1,77); (p=0,454).

Cuando llevamos a cabo la comparación intrasujeto, es decir, comparando la media del porcentaje de embriones aneuploides por sujeto en cada uno de los ciclos, la tasa de aneuploidias fue del 34,8% (IC 95%: 20,5-49,1) en el ciclo no estimulado, y del 38,2% (IC 95%: 30,5-45,8) en el ciclo estimulado, con una diferencia de riesgos de 3,4 (IC 95%: -17,9-11,2) (p=0,64) y una odds ratio (OR) de 1,10 (IC 95%: 0,50-2,41).

Respecto a la proporción de embriones euploides por ovocito MII obtenido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado (33,7% vs. 29,1%, respectivamente, p=0,38).

RESULTADOS

	Ciclo no estimulado	Ciclo estimulado	RR/OR (IC 95%)	p
Embriones biopsiados	46	307		
Embriones informativos	46	303		
Blastómeras en día 3 de los embriones biopsiados	7,4 ± 1,4	7,9 ± 0,9		0,07
Fragmentación en día 3 de los embriones biopsiados	7,4 ± 6,2	9,1 ± 4,7		0,13
Embriones aneuploides/ embriones informativos (%, n)	34,8% (16/46) (22,7-49,2)	40,6% (123/303) (35,0-46,4)	RR: 1,17 (0,8-1,8)	0,45
Media del porcentaje de embriones aneuploides por sujeto* (%)	34,8% (20,5-49,1)	38,2% (30,5-45,8)	OR: 1,10 (0,5-2,4)	0,64
Blastocistos en día 5/ embrión biopsiado (%,n)	67,4% (31/46) (53,0-79,1)	77,5% (238/307) (72,5-81,8)	RR: 1,15 (0,9-1,4)	0,13
Embriones euploides/ ovocito MII (%,n)	33,7% (30/89) (24,0-44,5)	29,1% (180/618) (25,6-32,9)	RR: 1,16 (0,8-1,6)	0,38
Embriones euploides/ donante	0,7 ± 0,5 (0,5-0,8)	3,9 ± 2,3 (3,2-4,6)		<0,001
Embriones transferidos	0,7 ± 0,5	1,7 ± 0,7		<0,001

Tabla 3: Resultados del PGS de 46 donantes que completaron el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado.

• Los datos se presentan como media ± desviación estándar (DE); porcentaje y número absoluto (% ,n). Entre paréntesis se presenta el IC 95%. Valor p<0,05 se considera estadísticamente significativo.

* Test t de muestras pareadas.

La figura 4 muestra de forma gráfica cómo la diferencia en la tasa de aneuploidías se hace menos notable cuando llevamos a cabo la comparación intrasujeto entre ambos ciclos.

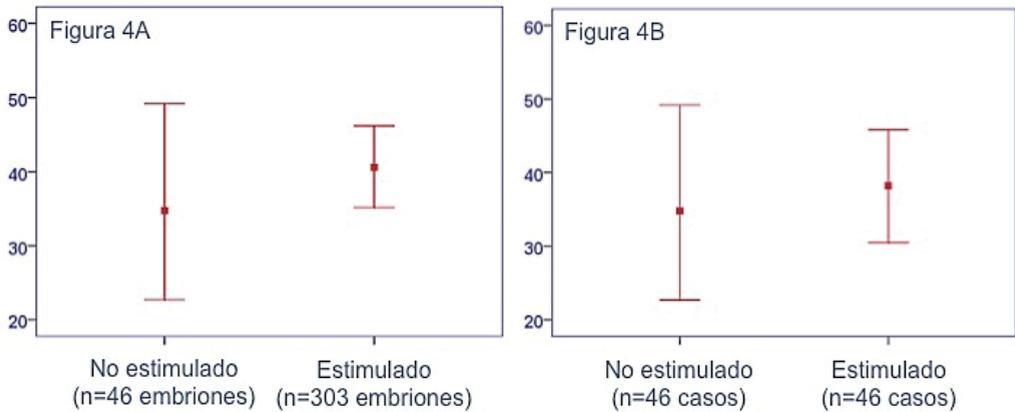


Figura 4: La figura 4A (izquierda) muestra la tasa de aneuploidías en la muestra global de embriones procedentes del ciclo no estimulado (46 embriones analizados) y del ciclo estimulado (303 embriones analizados procedentes de 46 ciclos). La figura 4B (derecha) muestra la comparación intrasujeto de la media de la tasa de aneuploidías de cada una de las donantes (46 casos de ciclo no estimulado vs. 46 casos de ciclo estimulado).

RELACIÓN ENTRE EL RESULTADO DEL CICLO

NO ESTIMULADO Y ESTIMULADO EN LA MISMA DONANTE

Tratamos de investigar si existía algún tipo de relación entre el estatus cromosómico del embrión obtenido en el ciclo no estimulado y la tasa de aneuploidías observada en el conjunto de embriones obtenidos tras el ciclo estimulado en la misma donante de óvulos. Si el embrión procedente del ciclo no estimulado resultó ser cromosómicamente anormal, la tasa de aneuploidías en el ciclo estimulado en la misma donante fue 46,2%, mientras que fue 33,9% si el embrión procedente del ciclo no estimulado resultó euploide.

Aunque no resultó estadísticamente significativo ($p=0,12$), hay una tendencia hacia una mayor tasa de anomalías embrionarias cromosómicas cuando el embrión procedente del ciclo no estimulado fue anormal.

EMBRIONES EUPLOIDES POR DONANTE EN UN CICLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA

En el ciclo estimulado, el número medio de embriones euploides por donación ovocitaria es de 3,9 (IC 95%: 3,2-4,6).

El 50% central de la distribución está entre 2 y 5 embriones euploides, mientras que el 90% central de la distribución se encuentra entre 1 y 7 embriones euploides (véase figura 5 y tabla 4).

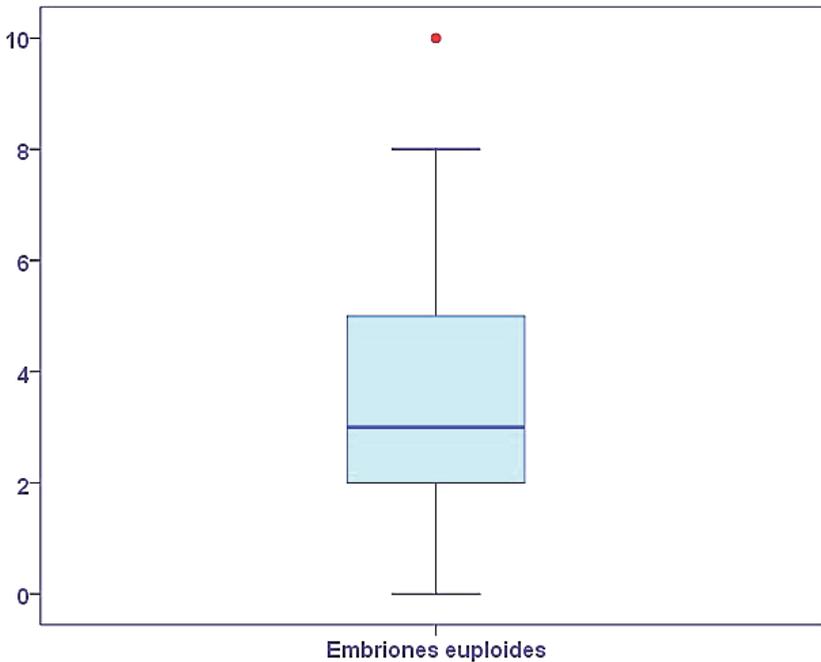


Figura 5: Diagrama de cajas y bigotes del número de embriones euploides por donación en el ciclo estimulado.

Ciclo estimulado	Media ± DE	Rango	P10	P25	P50	P75	P90
Embriones euploides	3,9 ± 2,3	0-10	1	2	3	5	7

Tabla 4: Distribución del número de blastocistos euploides en el ciclo estimulado.

El percentil 50 (P50) corresponde a la mediana. P significa percentil.

EMBRIONES EUPLOIDES, ANEUPLOIDES Y NO BIOPSIADOS EN CADA UNO DE LOS 46 CASOS EN EL CICLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA

El gráfico de columnas apiladas que corresponde a la figura 6 muestra caso a caso el número absoluto de embriones en cada una de las 46 donantes sometidas al ciclo de estimulación ovárica. Se ha llevado a cabo una diferenciación entre embriones euploides, aneuploides y no biopsiables (incluimos en este último grupo a los embriones detenidos y a aquellos que no cumplían criterios de biopsia en día 3 de desarrollo embrionario).

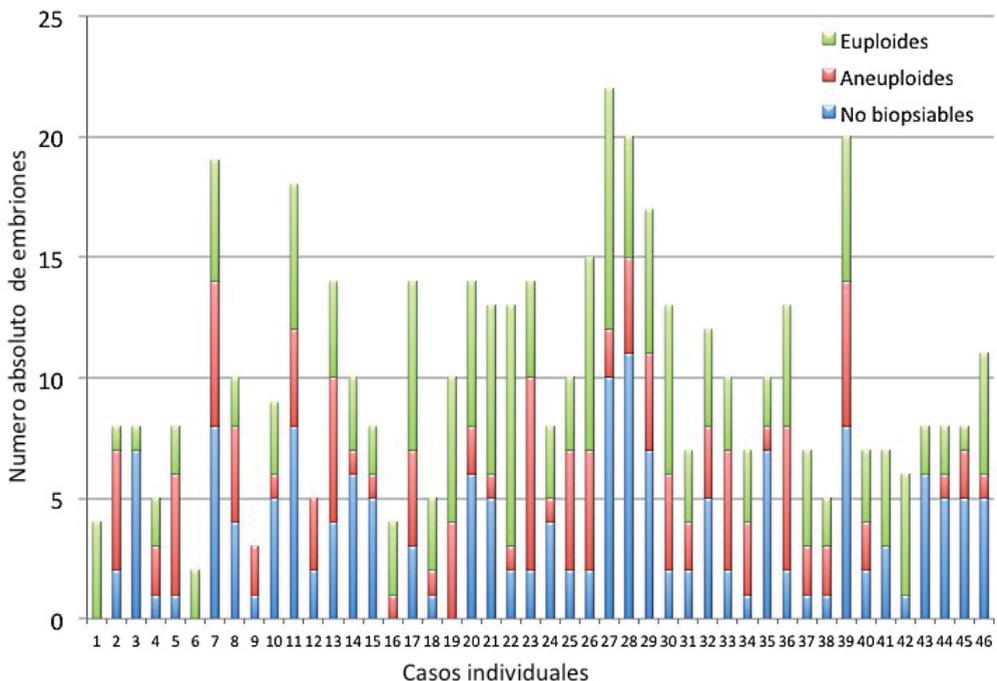


Figura 6: Número de embriones euploides, aneuploides y no biopsiables en cada caso individual (n=46) en el ciclo de estimulación ovárica.

En la mencionada figura 6, se aprecia visualmente cómo los casos con mayor número de embriones totales, disponen de mayor número de embriones tanto euploides, como aneuploides y no biopsiables.

RELACIÓN ENTRE RESPUESTA OVÁRICA Y NÚMERO ABSOLUTO DE EMBRIONES EUPLOIDES, ANEUPLOIDES Y NO BIOPSIABLES

Para cuantificar la correlación mencionada en el apartado previo, llevamos a cabo un análisis de regresión lineal relacionando diferentes parámetros de respuesta ovárica (número de ovocitos totales, número de ovocitos maduros (ó MII) y número de ovocitos fecundados con los resultados en términos de número de embriones euploides, aneuploides y no biopsiables.

Como se puede apreciar en las siguientes figuras, la relación entre respuesta ovárica y número de embriones euploides (figuras 7, 8 y 9), número de embriones aneuploides (figuras 10, 11 y 12) y número de embriones no biopsiables (figuras 13, 14 y 15) es significativamente positiva ($p < 0,05$).

Esto implica que a mayor respuesta, mayor número de embriones, tanto viables (euploides o aneuploides) como no viables (o no biopsiables).

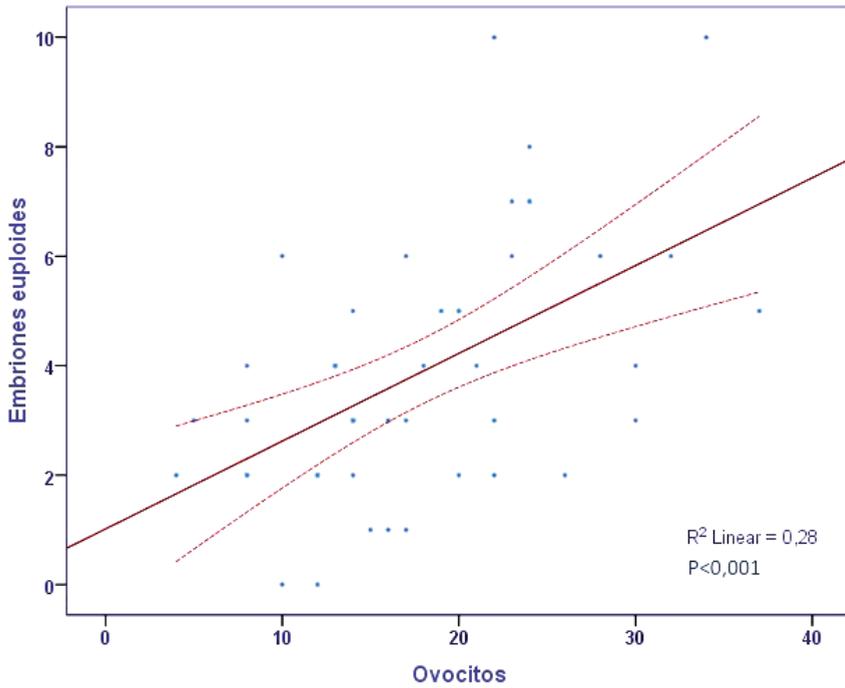


Figura 7: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con el número total de embriones euploides por donante.

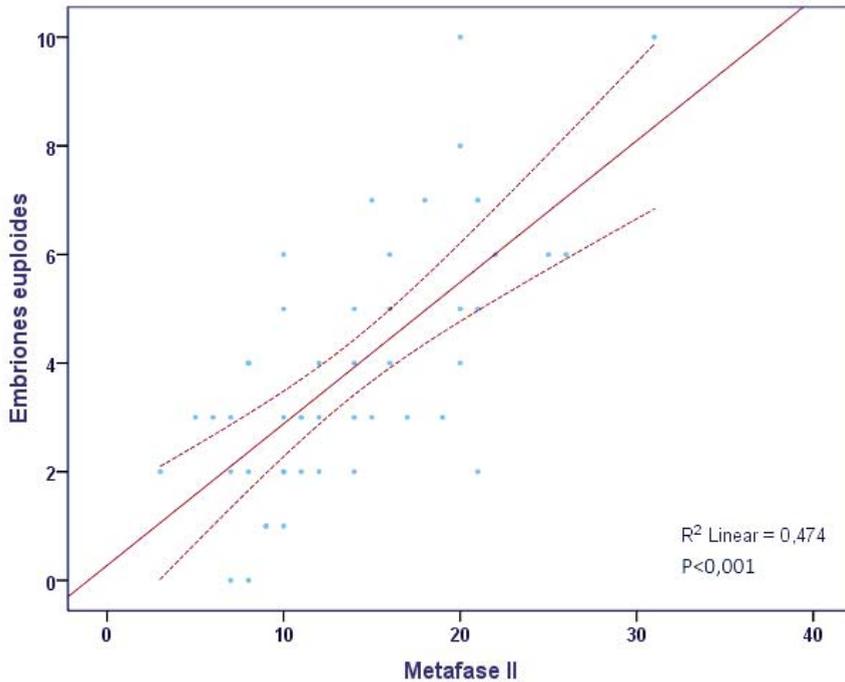


Figura 8: Correlación entre número de ovocitos metafase II con el número total de embriones euploides por donante.

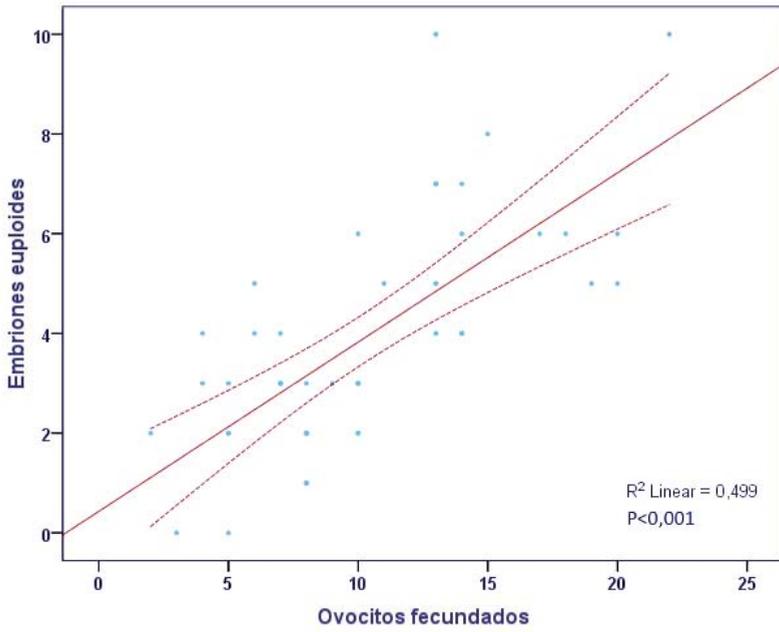


Figura 9: Correlación entre número de ovocitos fecundados con el número total de embriones euploides por donante.

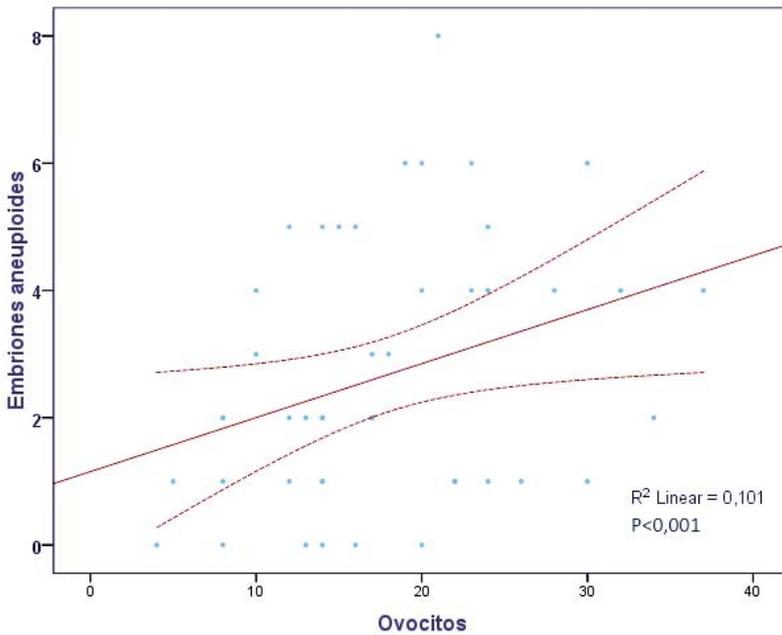


Figura 10: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con el número total de embriones aneuploides por donante.

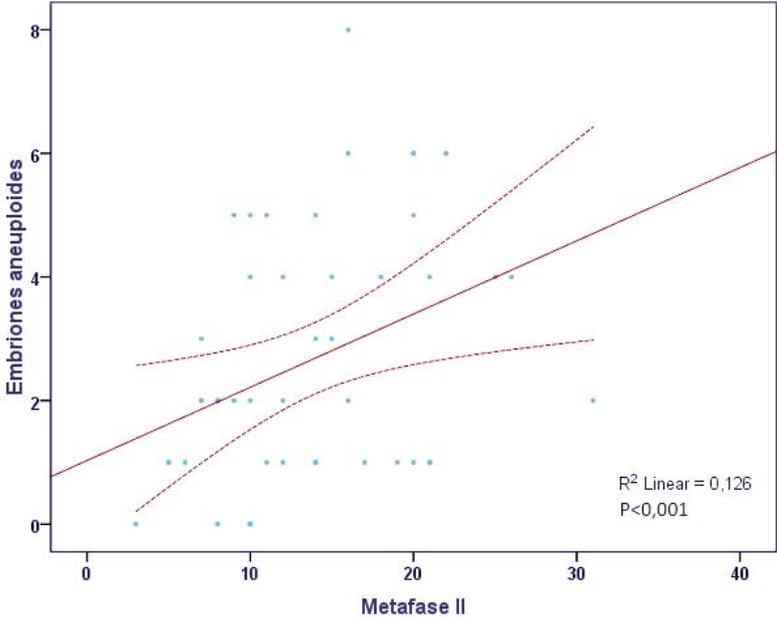


Figura 11: Correlación entre número de ovocitos metafase II con el número total de embriones aneuploides por donante.

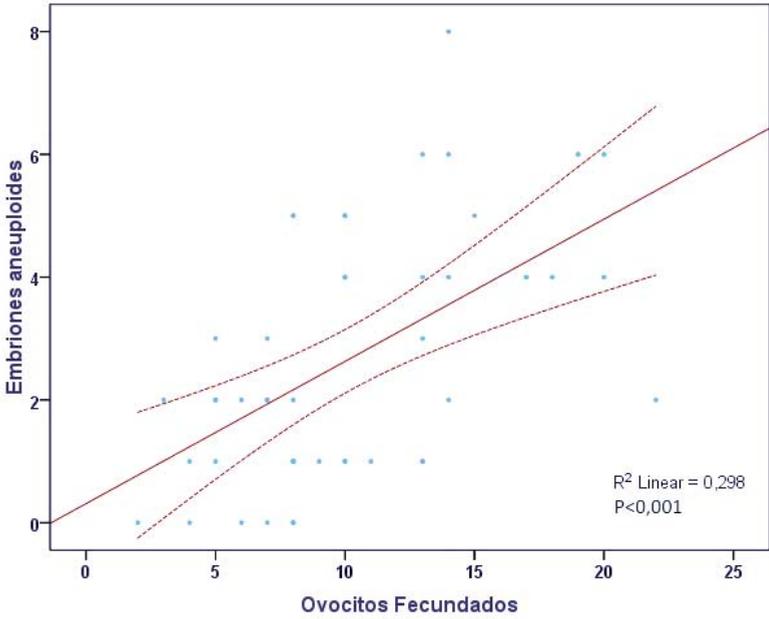


Figura 12: Correlación entre número de ovocitos fecundados con el número total de embriones aneuploides por donante.

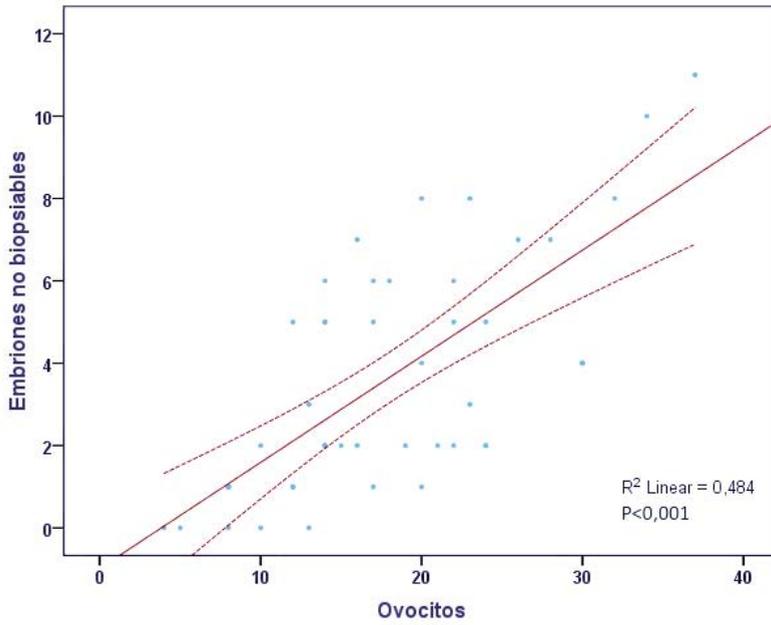


Figura 13: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con el número total de embriones no biopsiables por donante.

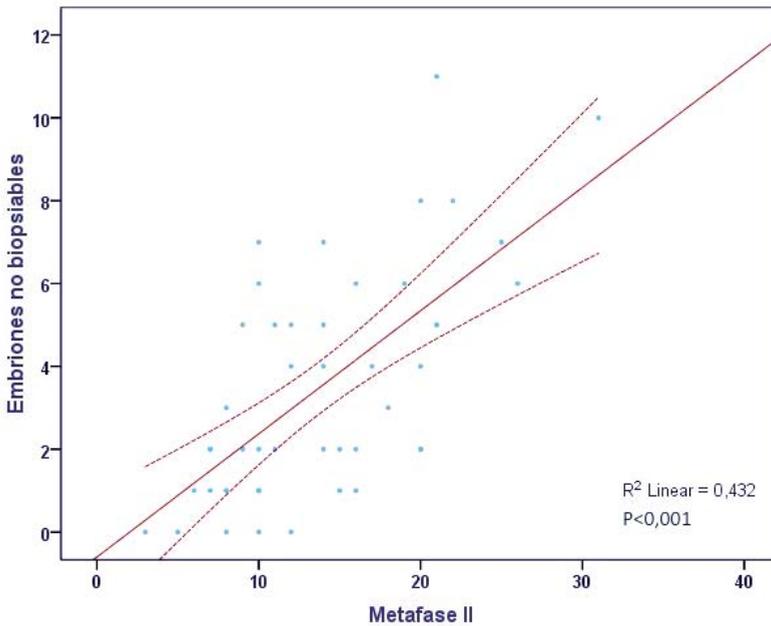


Figura 14: Correlación entre número de ovocitos metafase II con el número total de embriones no biopsiables por donante.

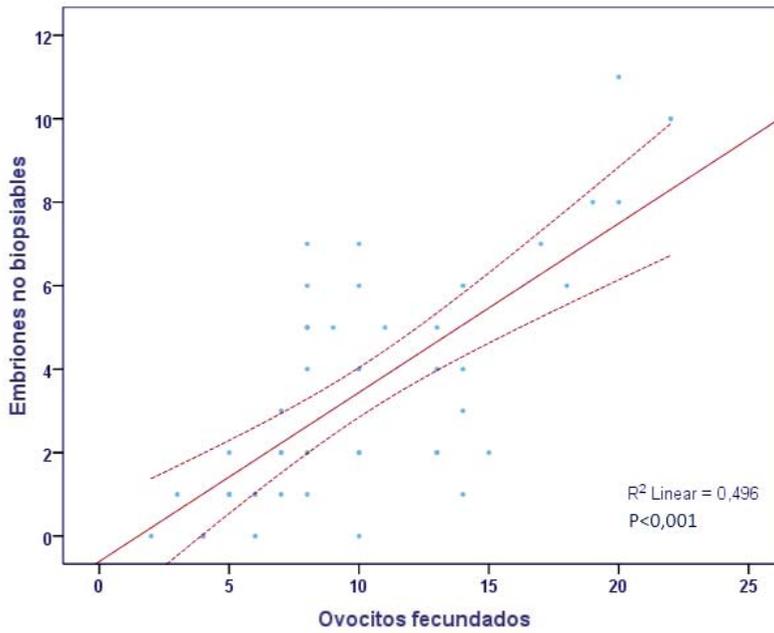


Figura 15: Correlación entre número de ovocitos fecundados con el número total de embriones no biopsiables por donante.

Media de embriones euploides por donante en función de si la respuesta ovárica era inferior o superior a la mediana

Tratamos de cuantificar el incremento de la media de embriones euploides en función del aumento de la respuesta ovárica a la estimulación. Para ello, calculamos dicha media en función de si el número de ovocitos totales, de ovocitos metafase II (MII) y de ovocitos fecundados se encontraba por encima o debajo de la mediana (o percentil 50) en la muestra total de las 46 pacientes.

En primer lugar, calculamos la media \pm DE y la mediana y el rango intercuartil de los 3 parámetros de respuesta ovárica estudiados en los ciclos estimulados. Los resultados se muestran en la tabla 5.

<i>Ciclo estimulado</i>	<i>Media \pm DE</i>	<i>P25</i>	<i>P50</i>	<i>P75</i>
Ovocitos totales	17,9 \pm 7,7	13	17	23
Ovocitos MII	13,8 \pm 6,2	9	13	19
Ovocitos fecundados	10,2 \pm 4,8	7	10	13

Tabla 5: Media \pm desviación estándar, mediana y rango intercuartil de los parámetros de respuesta ovárica en el ciclo estimulado (número de ovocitos totales, ovocitos MII y ovocitos fecundados). El percentil 50 corresponde a la mediana.

- Relación entre número de ovocitos totales y media de embriones euploides

Considerando la mediana como punto de referencia, observamos que si la donante está en la mediana o por encima en lo que respecta a número de ovocitos totales obtenidos, la media de embriones euploides por ciclo es de 5,04. Sin embargo, cuando el número de ovocitos totales obtenidos está por debajo de la mediana (menos de 17 ovocitos), se obtienen 2,55 embriones euploides de media; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,00$).

- Relación entre número de ovocitos metafase II y media de embriones euploides

Si la donante está en la mediana o por encima en lo que respecta a ovocitos MII, la media de embriones euploides por ciclo es de 5,26. Cuando el número de ovocitos MII está por debajo de la mediana (menos de 13 ovocitos MII), se obtienen 2,43 embriones euploides de media; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,00$).

- Relación entre número de ovocitos fecundados y media de embriones euploides

Cuando la donante está en la mediana o por encima en lo que respecta a ovocitos fecundados, la media de embriones euploides por ciclo es de 5,39. Sin embargo, cuando el número de ovocitos fecundados está por debajo de la mediana (menos de 10 ovocitos fecundados), se obtienen 2,3 embriones euploides de media; siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,00$).

La tabla 6 resume los hallazgos previamente descritos.

<i>Ciclo estimulado</i>	<i>P50</i>	<i>Media embriones</i>		<i>p</i>
		<i>euploides si <P50</i>	<i>euploides si ≥P50</i>	
Ovocitos totales	17	2,55	5,04	0,00
Ovocitos MII	13	2,43	5,26	0,00
Ovocitos fecundados	10	2,30	5,39	0,00

Tabla 6: Media de embriones euploides por donante en función de si la respuesta ovárica (en términos de número de ovocitos totales, MII y fecundados) está por debajo del percentil 50 (P50=mediana) o es igual o superior al P50.

RELACIÓN ENTRE RESPUESTA OVÁRICA Y TASA DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS

En lo referente a tasa de aneuploidías embrionarias, el análisis de regresión lineal muestra cómo dicha tasa no se incrementa ni disminuye significativamente conforme aumenta la respuesta ovárica a la estimulación, como se puede apreciar en las figura 16, 17 y 18 ($p > 0,05$).

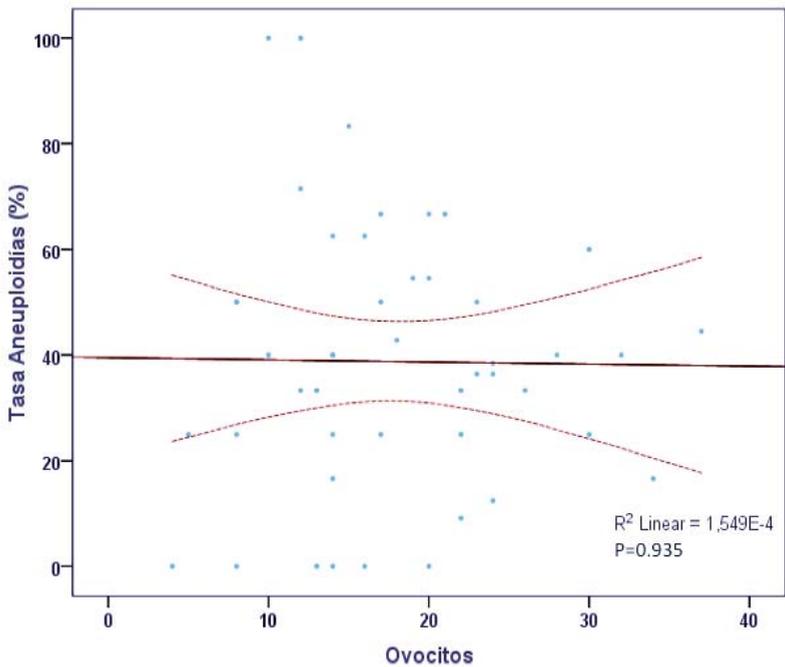


Figura 16: Correlación entre número de ovocitos totales obtenidos con la tasa de aneuploidías embrionarias.

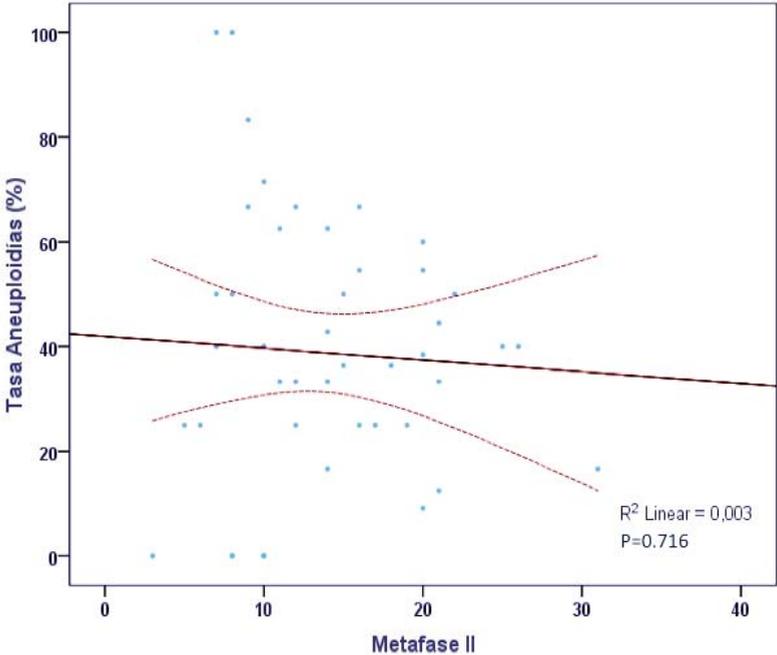


Figura 17: Correlación entre número de ovocitos metafase II con la tasa de aneuploidías embrionarias.

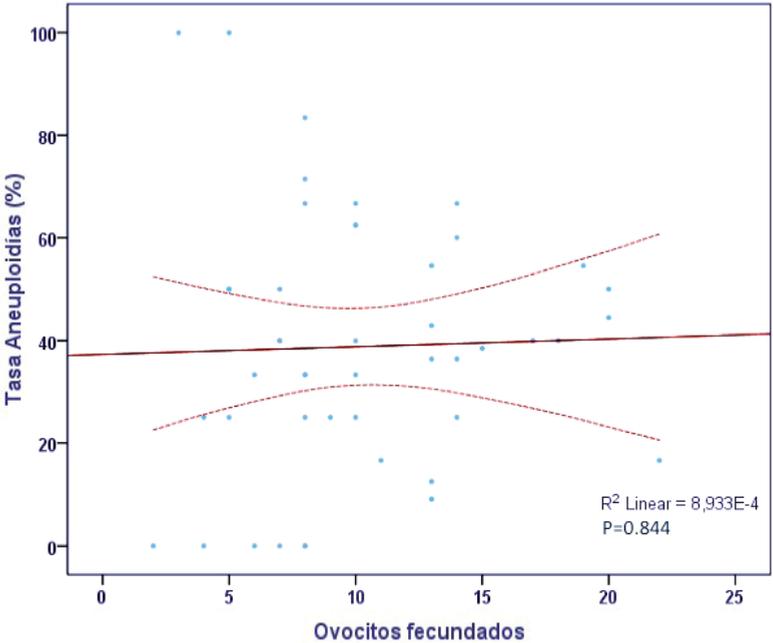


Figura 18: Correlación entre número de ovocitos fecundados con la tasa de aneuploidías embrionarias.

RELACIÓN ENTRE DOSIS DE GONADOTROPINAS Y TASA DE ANEUPLOIDÍAS EMBRIONARIAS

El análisis de regresión lineal que correlaciona la dosis total de gonadotropinas administradas a lo largo del ciclo de EO y la tasa de aneuploidías, muestra cómo el incremento de dosis de gonadotropinas no conlleva un aumento en la tasa de aneuploidías (véase figura 19).

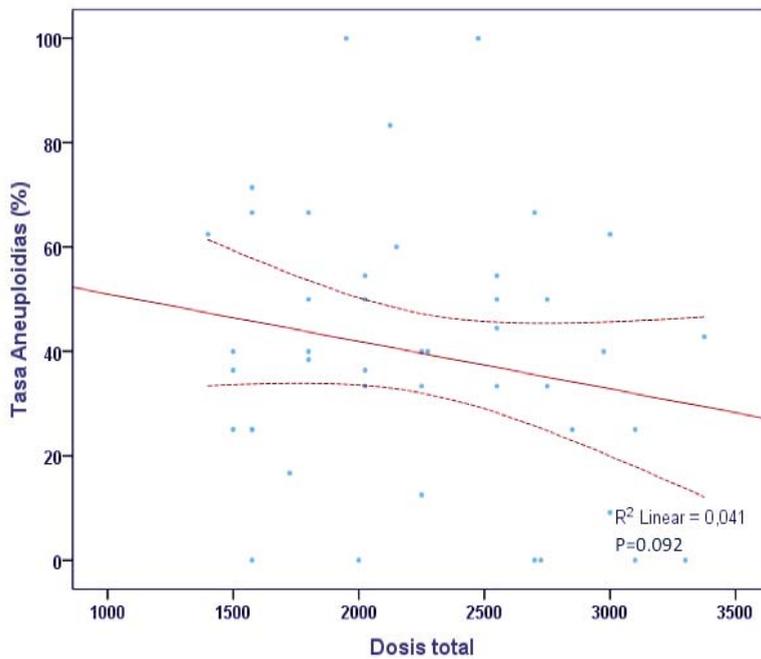


Figura 19: Correlación entre dosis total de gonadotropinas administradas con la tasa de aneuploidías embrionarias.

TIPO DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN AMBOS CICLOS

La distribución del tipo de anomalías cromosómicas en el ciclo no estimulado fue la siguiente: 62,5% de monosomías, 12,5% de trisomías y 18,8% de haploidías; y en el ciclo estimulado: 55,3% de monosomías, 24,4% de trisomías y 4,1% de haploidías. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la distribución de anomalías cromosómicas entre ambos grupos ($p=0,87$).

Hubo un caso más de monosomía y un caso de tetraploidía que posteriormente no se realizaron ciclo estimulado, por lo que no han sido incluidos en el análisis comparativo.

Por otra parte, no se vieron diferencias entre ambos ciclos respecto al tipo de cromosoma afecto, como se muestra en la tabla 7. Por orden de frecuencia, los cromosomas más frecuentemente alterados en el ciclo no estimulado fueron el 16 (50% de aneuploidías contenían alteración de este cromosoma), el cromosoma 18 (50%) y el cromosoma 21 (43,8%); mientras que en el ciclo estimulado fueron el cromosoma 15 (41,5%), el cromosoma 18 (39%), el cromosoma 16 (36,6%) y el cromosoma 22 (36,6%).

<i>Cromosoma afectado</i>	<i>Ciclo no estimulado</i>	<i>Ciclo estimulado</i>	<i>p</i>
Cromosoma 13	31,3%	33,3%	0,87
Cromosoma 15	37,5%	41,5%	0,76
Cromosoma 16	50,0%	36,6%	0,30
Cromosoma 17	28,6%	26,8%	0,92
Cromosoma 18	50,0%	39,0%	0,40
Cromosoma 21	43,8%	35,0%	0,49
Cromosoma 22	37,5%	36,6%	0,94
Cromosoma sexuales	12,5%	24,4%	0,29

Tabla 7: Frecuencia de afectación de un determinado cromosoma en el grupo de embriones aneuploides. No se observan diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los cromosomas entre los ciclos no estimulado y estimulado.

RECONFIRMACIÓN

Con el propósito de validar la fiabilidad de nuestro diagnóstico en día 3, treinta y seis embriones fueron aleatoriamente seleccionados y reanalizados en día 5 mediante FISH.

El reanálisis en día 5 mediante FISH de 36 embriones mostró una tasa de confirmación del 91,7%. Se estudiaron una media de $32,9 \pm 21,9$ células por blastocisto.

En el ciclo no estimulado, reanalizamos 7 de los 18 embriones cromosómicamente anormales con una tasa de confirmación del 100%. En el ciclo estimulado, reanalizamos 29 embriones, de los cuales 26 embriones habían sido diagnosticados como aneuploides y 3 como euploides pero se bloquearon en periodo de división. Treinta y tres de los 36 embriones fueron confirmados (tasa de confirmación = 91,7%), mientras que en 3 casos encontramos un diagnóstico falso positivo (véase tabla 8). De los 33 casos confirmados, 10 blastocistos fueron diagnosticados como homogéneamente aneuploides (>80% con la misma anomalía cromosómica) y 23 como mosaicos (≥ 2 líneas celulares, cada una con $\geq 20\%$ de células anormales). Por tanto, en 23 casos, el embrión anormal en día 3 resultó ser un mosaico en el estadio de blastocisto.

<i>Tipo de ciclo</i>	<i>Resultado en día 3</i>	<i>Resultado en día 5</i>	<i>Tasa de confirmación</i>
No estimulado (7 re-analizados)	7 aneuploides	7 aneuploides	100%
Estimulado (29 re-analizados)	3 euploides*	3 euploides	100%
	26 aneuploides	23 aneuploides	88,5% 3 falsos positivos

Tabla 8: Re-análisis mediante FISH en día 5 de desarrollo en una muestra de 36 embriones.

* embriones euploides detenidos

RESULTADOS GESTACIONALES EN LAS RECEPTORAS DE GAMETOS

Los resultados gestacionales en las pacientes receptoras de óvulos y semen son objetivos secundarios del estudio, ya que la intención del mismo no es comparar las tasas de gestación entre las receptoras que han recibido embriones procedentes de un ciclo no estimulado o estimulado. Para cubrir dicho objetivo el tamaño muestral debería haber sido sustancialmente mayor.

Por otra parte, la media de embriones transferidos fue significativamente mayor en el ciclo estimulado ($0,7 \pm 0,5$ vs. $1,7 \pm 0,6$; $p < 0,001$). Teniendo esto en cuenta, consideramos la tasa de implantación como el único parámetro fiable para realizar una comparación entre ambos ciclos. Definimos tasa de implantación como el número de sacos gestacionales por embrión transferido. La tasa de implantación fue comparable entre el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado, 39,3% vs. 32,5% ($p = 0,68$).

La tasa de gestación bioquímica (beta-hCG positiva a los 11 días de la transferencia embrionaria) y de gestación clínica evolutiva (gestación evolutiva de más de 20 semanas) por transferencia embrionaria fueron 42,9 vs. 68,2% ($p = 0,06$) y 21,4 vs. 47,7% ($p = 0,05$), respectivamente.

En el ciclo no estimulado hubo 30 embriones euploides de los cuales fueron transferidos 28 porque uno detuvo su crecimiento y no llegó a estadio de blastocisto, y otro fue congelado por razones personales de la receptora, la cual no se transfirió posteriormente el embrión euploide.

La tasa de pérdida gestacional fue de 41,7% vs. 16,7% ($p = 0,09$).

La tasa de recién nacido vivo por ciclo completado fue 13% en el ciclo no estimulado mientras que fue 45,7% en el estimulado ($p = 0,001$). Los detalles acerca de los resultados gestacionales están expuestos en la tabla 9.

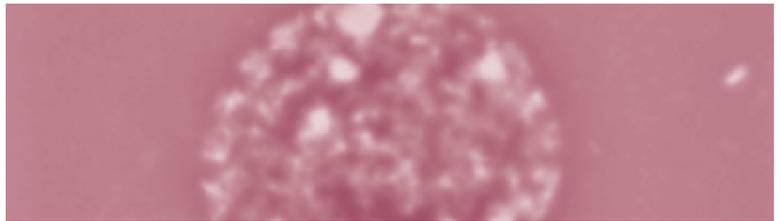
	Ciclo	Ciclo	RR
	no estimulado	estimulado	p
Gestación bioquímica /TE	42,9% (12/28) (24,5-62,8)	68,2% (30/44) (52,4-81,4)	1,59 (0,9-2,5) p=0,06
Gestación clínica /TE	39,3% (11/28) (21,5-59,4)	56,8% (25/44) (41,0-71,7)	1,45 (0,9-2,5) p=0,15
Implantación	39,3% (11/28) (21,5-59,4)	31,3% (25/80) (21,3-42,6)	1,26 (0,7-2,2) p=0,44
RNV/TE	21,4% (6/28) (8,3-41,0)	47,7% (21/44) (32,5-63,3)	2,23 (1,0-4,8) p=0,05
RNV/ciclo	13,0% (6/46) (4,9-26,3)	45,7% (21/46) (30,9-61,0)	3,50 (1,6-7,9) p=0,00
Pérdidas gestacionales	41,7% (5/12) (15,2-72,3)	16,7% (5/30) (5,6-34,7)	2,50 (0,9-7,1) p=0,09
Tasa acumulada de RNV /TE	21,4% (6/28) (8,3-41,0)	63,6% (28/44) (47,8-77,6)	2,97 (1,4-6,3) p<0,001
Tasa acumulada de RNV /ciclo completado	13,0% (6/46) (4,9-26,3)	60,9% (28/46) (45,4-74,9)	0,21 (0,1-0,5) p<0,001

Tabla 9: Resultados gestacionales en las receptoras de gametos.

Los datos se presentan como (% , n, IC 95%) y Riesgo Relativo (RR, IC 95%, valor p).

TE: Transferencia embrionaria; RNV: Recién Nacido vivo.

DISCUSIÓN



La hipótesis planteada en el presente trabajo de que la EO aumenta la incidencia de aneuploidías en la especie humana queda refutada tras observar como en mujeres jóvenes, y por tanto libres del factor edad que pudiera influir en la incidencia de aneuploidías, el mencionado tratamiento no incrementa significativamente la incidencia de aneuploidías cuando comparamos la misma en el ciclo no estimulado y en el ciclo estimulado en la misma mujer. Hemos observado una incidencia de aneuploidías del 34,8% en el ciclo no estimulado versus del 38,2% en el ciclo de estimulación ovárica convencional con dosis moderadas de gonadotropinas ($p=0,64$). Este es el primer estudio que ha llevado a cabo la comparación intrasujeto, evitando de este modo los sesgos derivados de las variaciones interpaciente y de la diferencia temporal entre la realización de un ciclo y otro.

A continuación se hará un análisis detallado de los procedimientos y resultados de nuestro estudio.

ACERCA DE LA HIPÓTESIS Y LOS OBJETIVOS DE TRABAJO

El efecto de la EO con gonadotropinas en la génesis de anomalías cromosómicas durante la fecundación y la división embrionaria temprana ha sido motivo de preocupación y debate desde hace muchos años. Esto hace que se haga necesario interpretar con cautela los resultados de revisiones de la literatura, ya que los medios de cultivo actuales, las TRA y los métodos diagnósticos han ido cambiando y evolucionando a lo largo del tiempo y por tanto no es posible extrapolar los resultados con total exactitud (Hart, Norman 2013a).

En todo caso, la literatura científica ofrece mucha más información sobre estudios en animales que en humanos, existiendo más trabajos sobre EO y calidad embrionaria (en términos de morfología y desarrollo embrionario temprano) que sobre EO y aneuploidías. Si bien en animales la EO parece afectar a la calidad embrionaria, esto no ha podido ser demostrado en humanos (Ziebe et al. 2004). Algunos autores han sugerido que la EO pudiera incrementar la incidencia de aneuploidías embrionarias en humanos (Munne et al. 1997, Katz-Jaffe, Trounson & Cram 2005, Baart et al. 2007); pero estos hallazgos no se confirmaron hace ya tiempo a nivel ovocitario (Gras et al. 1992) ni actualmente a nivel postimplantatorio en estudios de restos abortivos o biopsias coriales (Martinez et al. 2010, Conway et al. 2011, Qin et al. 2013, Pendina et al. 2013).

Por todo ello consideramos fundamental averiguar si la EO tiene un posible efecto deletéreo, pues no existe una evidencia científica clara sobre el tema. Lo que sí es cierto es que, por una parte, las aneuploidías embrionarias son altamente frecuentes en la especie humana (Hassold, Hall & Hunt 2007) y su hallazgo tras un tratamiento de PGS quizá no esté tan directamente relacionado con la TRA en sí; y por otra, hemos asistido en los últimos años a un movimiento hacia la estimulación ovárica suave o menos agresiva (Macklon, Fauser 2003), por lo que los estudios que han surgido en este periodo acerca de los posibles efectos negativos de la EO han causado un gran impacto.

Dicho esto, y con el propósito de poder cuantificar en qué medida las gonadotropinas pudieran incrementar o no la tasa de aneuploidías, consideramos necesario conocer de antemano cual era la proporción de embriones aneuploides en un ciclo de FIV sin EO previa y de este modo, compararíamos dicha tasa a la obtenida en un ciclo de FIV tras EO.

El objetivo principal de nuestro estudio fue la comparación intrasujeto de la incidencia de aneuploidías en estos dos escenarios diferentes (sin y con EO con gonadotropinas) en una población exenta de factores de riesgo que pudieran afectar a su tasa de anomalías cromosómicas. Los resultados de este análisis podrán ayudar a esclarecer qué protagonismo tiene la EO con gonadotropinas sobre la génesis de anomalías cromosómicas embrionarias.

ACERCA DE LA METODOLOGÍA

Tamaño muestral

El presente estudio de cohortes prospectivo describe el análisis cromosómico de 46 embriones procedentes de un tratamiento de FIV sin EO previa y de 303 embriones de las mismas mujeres tras una EO para FIV, con el fin de determinar el efecto de la EO en la incidencia de anomalías cromosómicas numéricas o aneuploidías en los embriones humanos a nivel preimplantatorio. Los resultados del estudio concluyen que la EO no incrementa de forma estadísticamente significativa la tasa de aneuploidías.

El estudio calculó un tamaño muestral para detectar una diferencia en la tasa de aneuploidías del 22% entre ambos ciclos, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que existan pequeños incrementos en dicha tasa en ciclos estimulados vs. no estimulados. En todo caso, para detectar diferencias más pequeñas (menores del 22%), sería necesaria una muestra de pacientes mucho mayor. Como se demuestra en los resultados de nuestro estudio, esto sería difícilmente planteable desde el punto de vista logístico puesto que precisamos incluir a 185 donantes con el fin de llevar a cabo 46 ciclos consecutivos (estimulado y no estimulado). Además, la inclusión de más pacientes conllevaría con alta probabilidad al fenómeno estadístico de regresión a la media, es decir,

que las diferencias entre ambos grupos tenderían a ser menores y difícilmente llegarían a alcanzar la significancia estadística.

El presente trabajo ha incluido el tamaño muestral más grande hasta la fecha que ha analizado el estatus cromosómico de embriones procedentes de ciclos no estimulados, es decir, sin el influjo de las gonadotrofinas exógenas sobre el desarrollo folicular. Por ello, nuestro grupo de donantes sometidas a un ciclo no estimulado pudiera ser considerado como el grupo control verdadero que no había estado disponible hasta la fecha (Munne et al. 2006), y ello permitirá comparar la incidencia de aneuploidías embrionarias entre diferentes grupos de pacientes y bajo distintas condiciones.

Un valor añadido de nuestro estudio, e independientemente del tamaño muestral, es que pudimos llevar a cabo la comparación intrasujeto con el test t de muestras pareadas, que mostró cómo la tasa media de aneuploidias fue del 34,8% en el ciclo no estimulado y del 38,2% en el ciclo estimulado, con una diferencia de riesgos de 3,4 ($p=0,64$). Esta diferencia de riesgos es más baja que la observada si solo hacemos la comparación global de los ciclos no estimulados y estimulados del estudio, observando una tasa de aneuploidías del 34,8% y del 40,6%, respectivamente ($p=0,454$).

Un análisis exhaustivo del ciclo no estimulado

El objetivo fundamental de nuestro estudio fue analizar el impacto de la EO en la tasa de anomalías cromosómicas numéricas embrionarias, partiendo de un punto de referencia que era la tasa observada en el ciclo no estimulado.

Esto nos permitió evaluar en primer lugar el estatus cromosómico del embrión humano en ausencia de EO, intentando definir el estado basal en la especie humana *in vitro*, ya que su estudio *in vivo* es técnicamente imposible. Nuestros resultados muestran que en mujeres sanas, jóvenes, fértiles y sin antecedentes de estimulación ovárica, aproximadamente un tercio de los embriones procedentes de un ciclo no estimulado son cromosómicamente anormales (35,3% en la muestra de 51 ciclos no estimulados a los que se les realizó PGS). Este hallazgo está en consonancia con un estudio previo a menor escala que halló una tasa de aneuploidías del 36,4% en 11 ciclos no estimulados tras realización de PGS mediante FISH (Verpoest et al. 2008).

Ello significa que la incidencia de aneuploidías embrionarias en la especie humana no es desdeñable, y ello explicaría la baja fecundidad observada en humanos (Macklon, Geraedts & Fauser 2002).

El ciclo no estimulado de FIV pudiera ser considerado como el escenario más cercano al ciclo natural *in vivo*, aunque no podemos descartar el impacto potencial de otros factores que pudieran afectar a la constitución cromosómica del embrión, como las condiciones del laboratorio de FIV (Beyer et al. 2009), el uso de rCG para desencadenar la maduración ovocitaria final y la ovulación, o incluso el uso de ICSI (Davies et al. 2012). Aunque reconocemos estas limitaciones, no podemos evitarlas y debemos aceptar que son inherentes al proceso en sí, sin el cual no podríamos llevar a cabo el PGS.

Uno de los problemas de nuestro estudio fue la necesidad de incluir un elevado número de donantes de ovocitos en ciclo natural, para poder disponer finalmente de embriones candidatos a biopsia. A pesar de llevar a cabo ciclos naturales modificados (con inyección de rCG para inducir la maduración ovocitaria final), la tasa de cancelación global por ovulación precoz o no obtención de ovocito resultó del 37,3%.

DISCUSIÓN

Nuestra tasa de llegada a punción folicular de las 175 donantes que llevaron a cabo el ciclo no estimulado (pues 10 de 185 renunciaron a continuar con el estudio) resultó del 69,1% (121/175). Esta es similar a la presentada por Pelinck en su revisión sobre CN, donde hace un sub análisis en 14 estudios en los que utilizaron la misma estrategia (planear la punción folicular tras administración de hCG o cancelar el ciclo si ocurre un pico de LH), pues la tasa de punción folicular por ciclo iniciado fue del 67,3% (833/1238) (Pelinck 2002).

Por otra parte, nuestra tasa de obtención de ovocito por punción resultó del 81,8%, la cual es idéntica a la presentada por Nargund (81,6%) en un total de 181 ciclos naturales llevados a cabo en un total de 52 mujeres (Nargund et al. 2001).

Teniendo en cuenta la alta tasa de cancelación presente en este trabajo y en los publicados en la literatura científica, queda patente la baja eficacia del CN pues fue necesario reclutar a 185 donantes de ovocitos para obtener finalmente 51 embriones candidatos a biopsia en día 3 de desarrollo. Si no se hubiera llevado a cabo el PGS, todos estos embriones hubieran sido transferidos puesto que cumplían criterios de calidad para ello. En ese hipotético caso, nuestra tasa de transfer por ciclo iniciado hubiera sido del 28,1%; y si excluyéramos a las 10 donantes que voluntariamente decidieron no continuar el seguimiento de su CN (situación improbable en una paciente infértil sometida a un CN) la tasa se incrementaría hasta un 29,7%, es decir, que en pacientes de buen pronóstico, dicho porcentaje de pacientes llegarían a transfer en el contexto de un ciclo no estimulado si el PGS no se llevara a cabo. Teniendo en cuenta la tasa de aneuploidías descrita en nuestro estudio, el transfer sería ineficaz en un tercio de los casos puesto que el embrión transferido en ciclo natural hubiera resultado aneuploide.

El objetivo de obtener varios ovocitos para la realización de un FIV, es el de disponer finalmente de al menos uno o dos embriones euploides y aptos para transferir. Es lógico pensar que si se consiguen más embriones, será más probable hallar el predestinado a implantar. Ello justifica la alta tasa de nacidos vivos acumulada en el ciclo estimulado en comparación con la tasa observada en el ciclo no estimulado en nuestro estudio (60,9% vs. 13%, respectivamente, $p < 0,001$).

Estos hallazgos están en consonancia con lo publicado en la literatura. Con el fin de valorar la eficacia del CN en comparación con el ciclo estimulado, se llevó a cabo una revisión sobre los resultados gestacionales de 4 estudios aleatorizados comparando ambos protocolos, en un total de 339 mujeres sometidas a FIV (Verberg et al. 2009b). El CN fue comparado con uso de citrato de clomifeno (1 estudio); con hMG en protocolo largo con agonistas de la GnRH (2 estudios); y finalmente, en mujeres con baja respuesta a la estimulación ovárica, con FSH purificada en protocolo microflare con microdosis de agonistas de la GnRH (1 estudio). A pesar del número bajo de pacientes, y de los diferentes números de ciclos entre cada una de las mismas, se pudo concluir que el ciclo natural resultó en unas tasas de gestación evolutiva extremadamente bajas (0-6,1%).

Una revisión reciente de la base de datos Cochrane sobre el CN en la FIV en parejas subfértiles (Allersma, Farquhar & Cantineau 2013) ha incluido seis ensayos controlados aleatorios con un total de 788 mujeres, con el objetivo de comparar la seguridad y eficacia del ciclo natural (incluyendo tanto CN como CNM) con la estimulación ovárica para FIV. No han encontrado diferencias significativas entre ambos protocolos en lo que respecta a resultados gestacionales, SHO o cancelación de ciclo, pero todas las pruebas realizadas son de baja, muy baja o moderada calidad y la limitación principal fue la imprecisión porque los datos fueron insuficientes. Se concluye la necesidad de disponer de ensayos clínicos más amplios y bien realizados para poder emitir conclusiones, buscando la comparación

DISCUSIÓN

entre el ciclo natural y el ciclo estándar para FIV, en términos de tasas acumuladas de embarazo y nacidos vivos, número de ciclos necesarios para conseguir un nacido vivo, los costes del tratamiento y los efectos adversos. Los resultados de nuestro estudio muestran como, en lo que respecta a las tasas acumuladas de nacidos vivos por ciclo completado, el ciclo no estimulado es significativamente inferior al ciclo estimulado para FIV, sin olvidar que el tamaño muestral de nuestro estudio no fue diseñado con el fin de detectar diferencias en los resultados gestacionales.

Aunque algunos trabajos han sugerido el uso del CN en pacientes de mal pronóstico, fundamentalmente mujeres añosas o bajas respondedoras a la EOC (Schimberni et al. 2009), otros no encuentran ningún beneficio en el uso del CN en bajas respondedoras (Morgia et al. 2004, Kolibianakis et al. 2004, Reyftmann et al. 2007, Polyzos et al. 2012). Nuestros resultados sugieren que las anomalías cromosómicas están presentes incluso en ausencia de estimulación con gonadotropinas. Por tanto, el uso del ciclo natural en este tipo de pacientes probablemente ofrezca un resultado pobre, de acuerdo con la alta tasa de aneuploidía observada en embarazos espontáneos de mujeres añosas (Thum, Abdalla & Taylor 2008).

Es por ello que, si en el futuro no se logran mejorar las tasas de éxito tras el uso del CN, tanto en pacientes normo-respondedoras como pacientes de mal pronóstico, se reafirma la necesidad de recurrir a la EOC para inducir el desarrollo de varios ovocitos maduros con el fin de mejorar las posibilidades de embarazo en tratamientos de reproducción asistida.

De acuerdo con los resultados observados en nuestro estudio, la EO debería llevarse a cabo de manera moderada, ya que es de este modo como hemos observado que no se incrementa de forma significativa la tasa de aneuploidías con respecto al ciclo no estimulado, no pudiendo aseverar que una estimulación ovárica agresiva con la utilización

de 300UI diarias o más de gonadotropinas puedan incrementar o no las aneuploidías embrionarias. De todos modos, en nuestro grupo de donantes de ovocitos, no hemos observado una relación lineal entre las dosis totales de gonadotropinas administradas y la tasa de aneuploidías.

Población de estudio homogénea

El mero hecho de realizar este estudio en el contexto de un tratamiento de FIV/ICSI, conlleva una serie de condicionantes intrínsecos a la técnica que podrían sesgar los resultados. De hecho, ya se ha mencionado que las condiciones del laboratorio de FIV pueden afectar a la incidencia de aneuploidías.

Siendo conscientes de este posible sesgo, consideramos que el único modo certero de valorar exclusivamente el efecto neto de las gonadotropinas sobre las aneuploidías era comparar dicha incidencia en dos ciclos de FIV exactamente iguales con la única diferencia en el uso o no de gonadotropinas. Se trató que el resto de factores fuese lo más semejante posible entre un ciclo y otro. Es por ello que utilizamos a la misma mujer como control de si misma, así como el mismo donante de semen en ambos ciclos (no estimulado y estimulado). El motivo de escoger donantes de gametos fue el intento de encontrar una población de estudio libre de factores de confusión, como edad materna, infertilidad o factores masculinos severos.

Por otra parte, los medios de cultivo y condiciones del laboratorio fueron idénticos en ambos ciclos, así como las técnicas de manipulación de gametos y de biopsia embrionaria. El personal destinado a la realización de la biopsia de blastómeras, a la realización de la técnica de PGS y a la interpretación de las señales de FISH fue un grupo reducido y experimentado con el objetivo de evitar los sesgos de observador.

La comparación intrasujeto entre ambos protocolos de estudio

La comparación en la tasa de aneuploidías embrionarias entre un ciclo no estimulado (o natural modificado en nuestro trabajo) y estimulado (bajo estimulación ovárica controlada) se llevó a cabo en la misma mujer con una diferencia de tiempo máxima de 3 meses entre ambos ciclos porque consideramos que era algo fundamental para evitar la variabilidad intrasujeto secundaria al posible efecto del paso del tiempo sobre la calidad ovocitaria, y con ello calcularíamos el supuesto incremento individual de anomalías cromosómicas de un ciclo a otro. De hecho, no sólo calculamos la media de embriones aneuploides en ambos grupos, sino que llevamos a cabo una comparación intrasujeto de la media del porcentaje de aneuploidías embrionarias.

En base a la literatura científica existente hasta el momento de escritura de esta tesis, podemos aseverar que éste es el primer trabajo que ha realizado este tipo de análisis comparativo intrasujeto. De hecho, tampoco se hallan trabajos publicados comparando la incidencia de aneuploidías entre un ciclo no estimulado y un ciclo estimulado en grupos diferentes de pacientes, mientras que sí que existen estudios comparando diferentes dosis de gonadotropinas en diferentes grupos de pacientes (Baart et al. 2007) o entre las mismas donantes (Rubio et al. 2010a).

En el caso de obtener un embrión euploide en el ciclo no estimulado, se llevó a cabo la transferencia embrionaria en la mujer receptora. En estos casos, debimos esperar al resultado del test de embarazo para decidir programar el ciclo de estimulación ovárica a la donante de ovocitos en la segunda o tercera menstruación tras el ciclo natural. Esta es la razón por la cual no se decidió llevar a cabo la estimulación ovárica en el ciclo inmediatamente posterior al ciclo natural.

Reproductibilidad de los datos en población diferente

El estudio, realizado íntegramente en un único centro, el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) de Valencia, incluye mujeres donantes de ovocitos que llevaron a cabo un ciclo no estimulado seguido de un ciclo de EO moderada. La muestra de semen empleada para inseminar los ovocitos procedía igualmente de un donante varón, que fue el mismo tanto para el primer como para el segundo ciclo, con el fin de que los gametos procedieran de los mismos progenitores en los dos ciclos.

Nuestros resultados sugieren que la EO moderada no incrementa de forma estadísticamente significativa la tasa de aneuploidías embrionarias tras FIV en una muestra poblacional de mujeres jóvenes sin antecedentes de infertilidad o tratamientos de inducción de la ovulación.

Queda por dilucidar si estos hallazgos son aplicables a mujeres con antecedentes de infertilidad.

En línea con nuestros resultados, recientemente se han publicado varios trabajos en los que no se aprecia un incremento en la incidencia de anomalías cromosómicas en abortos de fetos procedentes de embarazos logrados tras una estimulación con FSH en comparación con concepciones espontáneas (Martinez et al. 2010, Massie et al. 2011, Bingol et al. 2012, Qin et al. 2013, Pendina et al. 2013). Igualmente, en varios estudios retrospectivos caso-control, no se ha evidenciado un incremento en la tasa de anomalías cromosómicas al final del primer trimestre en gestaciones obtenidas tras TRA y estimulación con gonadotropinas en comparación con gestaciones espontáneas (Shevell et al. 2005, Conway et al. 2011). En el estudio de Shevell, con un tamaño muestral de 36062 pacientes, el uso de cualquier

tipo de TRA se asociaba significativamente a un mayor riesgo de problemas obstétricos en comparación con la gestación espontánea. Sin embargo, no se apreció un incremento en la incidencia de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales fetales en pacientes sometidas a TRA.

El FISH como técnica

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que la técnica utilizada para analizar los embriones ha sido el FISH sobre una sola blastómera, lo cual no analiza el estatus cromosómico global porque analiza un número limitado de cromosomas y blastómeras. Esto se debe a que esta técnica era la más precisa y la única utilizada en nuestro centro cuando el estudio fue diseñado.

Nuevas técnicas como aCGH o los SNP microarrays permiten un análisis más exhaustivo de la constitución cromosómica del embrión. Actualmente, hemos introducido en nuestro laboratorio el sistema de aCGH en nuestro programa de PGS, permitiendo el análisis de 24 cromosomas.

A pesar de las limitaciones técnicas de nuestro estudio, nuestro grupo y otros autores han mostrado que el análisis mediante FISH en día 3 usando rondas adicionales con sondas teloméricas incrementa la exactitud diagnóstica de la técnica y los resultados son representativos del estado cromosómico del correspondiente embrión en día 5 (Colls et al. 2007, Mir et al. 2010).

De hecho, la tasa de confirmación que obtuvimos con la técnica FISH en nuestro estudio estaba alrededor del 92% según nuestros resultados del re análisis en día 5. Además, se

ha visto que los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y, pueden identificar el 80% de las anomalías cromosómicas más comunes en muestras de abortos espontáneos (Lathi, Westphal & Milki 2008). Por tanto, si tenemos en mente el riesgo de aneuploidías en la descendencia, todos los cromosomas estarían cubiertos por la técnica FISH.

No podemos confirmar que se hubieran hallado los mismos resultados si hubiéramos llevado a cabo los aCGH en los embriones analizados. En todo caso, el FISH no debe haber supuesto un sesgo en la interpretación de los resultados pues es la técnica que se ha utilizado del mismo modo en ambos grupos y no sería esperable una conclusión distinta en el caso de haber aplicado una técnica de aCGH.

La no biopsia de los embriones detenidos

En nuestro estudio, los embriones detenidos o no viables no fueron analizados, sino solo aquellos con buen desarrollo embrionario, siguiendo los bien establecidos criterios en ciclos de FISH-PGS considerando que solo los embriones evolutivos pueden implantar y, por tanto, el riesgo de aneuploidía en la descendencia estaría relacionado solamente con aquellos embriones que podrían llegar a estadio de blastocisto y dar lugar a un embarazo.

Siguiendo estos criterios, el 89,5% y el 65,5% de los embriones fueron biopsiados en el ciclo no estimulado y en el ciclo estimulado, respectivamente. Nuestra tasa de embriones biopsiados en el ciclo estimulado está en consonancia con la observada en el estudio de Baart (67,8%), que siguió criterios similares a los nuestros. Además, nuestra tasa de resultados informativos por embrión fecundado fue 64,6%, mientras que fue 58,7% en el mencionado estudio (Baart et al. 2007).

Biopsia de una sola blastómera. El fenómeno del mosaicismo

El análisis de los gametos humanos ha revelado que la aneuploidía embrionaria es fundamentalmente causada por errores de segregación meiótica cromosómica en los ovocitos. Si la EO puede ejercer un efecto deletéreo sobre el embrión, sería porque induce errores meióticos en el ovocito, más que errores mitóticos tras la fecundación, que comúnmente conducen a mosaicismo (Frumkin et al. 2008). Los dos mecanismos de errores meióticos más conocidos son la no disyunción y la separación prematura de cromátidas hermanas (Pellestor et al. 2002) y ello habitualmente resulta en un embrión uniformemente aneuploide (monosomía, trisomía, haploidía o poliploidía); por tanto, estas anomalías se manifiestan tanto en el análisis de la blastómera en día 3 de desarrollo embrionario y en el re análisis en día 5.

En el presente estudio, una sola blastómera fue biopsiada por embrión en día 3 de desarrollo, lo cual pudiera infra-diagnosticar los casos de mosaicismo. Sin embargo, ha quedado claramente demostrado que la biopsia de 2 células o blastómeras no aporta información adicional, y pudiera afectar negativamente la viabilidad embrionaria (Michiels et al. 2006, Goossens et al. 2008).

Nuestros resultados muestran una tasa de confirmación citogenética global del 91,7%, que está en concordancia con datos previamente publicados por nuestro centro (Mir et al. 2010). De hecho, Mir y colaboradores demostraron, tras validación de resultados en embriones en día 5, que había similares tasas de confirmación de diagnóstico entre día 3 y día 5 cuando una o dos blastómeras habían sido analizadas en día 3 (90,2% y 90%, respectivamente); concluyendo que la biopsia de 2 blastómeras no incrementa la exactitud diagnóstica de la técnica FISH.

Por tanto, esta baja tasa de error no podría afectar radicalmente los resultados y las conclusiones del presente estudio. Además, todos los embriones mosaicos en día 5 observados en nuestro estudio tras el re análisis tenían todas las líneas celulares aneuploides, por lo que habrían sido desestimados tras el diagnóstico llevado a cabo en día 3. Por tanto, debería asumirse que los casos de mosaicismo deberían ser igualmente distribuidos entre los ciclos no estimulados y estimulados. Por otra parte, el mosaicismo es más frecuente en embriones detenidos o morfológicamente anormales (Munne et al. 1997), y nuestro grupo sólo biopsia embriones con criterios de buena morfología, por lo que no podemos considerar esto como factor de confusión.

ACERCA DE LOS RESULTADOS

Comparación de la dinámica folicular entre el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado

Los resultados hormonales séricos el día de la administración de la rCG muestran cómo la dinámica folicular es sustancialmente diferente entre ambos ciclos.

El nivel medio de E2 sérico al final de la fase folicular fue significativamente inferior en el ciclo no estimulado que en el ciclo estimulado ($p < 0,0001$); ya que en éste se desarrollan un mayor número de folículos por efecto de la EOC. Igualmente, el nivel de P sérica fue significativamente inferior en el ciclo no estimulado que en el ciclo estimulado ($p < 0,001$).

En el ciclo no estimulado, en el cual no utilizamos análogos de la GnRH para evitar el riesgo de ovulación prematura, pudimos observar cómo los valores séricos de E2, P y

DISCUSIÓN

LH fueron significativamente más elevados en las pacientes que ovularon precozmente respecto a las que llegaron a una punción folicular; mientras que el diámetro folicular no resultó diferente entre ambos grupos. Por tanto, concluimos que en el seguimiento de un ciclo natural, resultan más predictivos de riesgo de ovulación los valores de hormonas séricas, que la simple medición ecográfica del folículo dominante.

Comparación en la tasa de aneuploidías entre el ciclo no estimulado y el ciclo estimulado

El resultado principal de nuestro estudio muestra una diferencia de riesgos de 3,4 en la media de la tasa de de aneuploidías por paciente (test t de muestras pareadas). Esta diferencia no resulta estadísticamente significativa ($p=0,64$). Es importante valorar el hecho de que se ha hecho la comparación intrasujeto para poder evaluar el efecto neto de la EO sobre la tasa individual de cada donante.

De hecho, si sólo tenemos en cuenta la tasa global de aneuploidías en la muestra de 46 embriones biopsiados del ciclo no estimulado y 303 del ciclo estimulado, observamos cómo la diferencia de riesgos es algo mayor, resultando ser 5,8, aunque sigue siendo no estadísticamente significativa ($p=0,45$).

En base a estos resultados, podemos concluir que la estimulación ovárica no incrementa de forma estadísticamente significativa la incidencia de aneuploidías embrionarias en mujeres < 34 años, que es el grupo que ha sido analizado en este estudio.

Por otra parte, la proporción de embriones euploides por ovocito metafase II obtenido no es significativamente diferente entre ambos ciclos, de modo que aproximadamente 1 de

cada 3 ovocitos metafase II dio lugar a 1 embrión euploide tanto en el ciclo no estimulado como en el ciclo estimulado. Ello sugiere que la calidad de los ovocitos obtenidos es similar y que el potencial de este grupo de mujeres de generar un embrión euploide era el mismo independientemente de si habían recibido un tratamiento de estimulación ovárica o no.

Importancia de las dosis de gonadotropinas administradas durante la estimulación

Nuestro estudio en donantes de ovocitos no ha observado una correlación positiva entre las dosis totales de gonadotropinas y la tasa de aneuploidías. Sin embargo, Baart encontró una relación positiva entre la dosis de gonadotropinas y la tasa de anomalías cromosómicas en pacientes infértiles (Baart et al. 2007).

Esta discordancia de resultados pudiera deberse a que en realidad estos dos estudios no son comparables, puesto que la población analizada y el objetivo de su estudio y el nuestro son diferentes.

Por una parte, el grupo holandés comparó la tasa de anomalías cromosómicas embrionarias tras la aplicación de dos regímenes de protocolo diferentes (protocolo largo con agonistas de la GnRH vs. protocolo con antagonistas de la GnRH) con 2 diferentes dosis de gonadotropinas (225 vs. 150 UI/día) y en dos grupos de pacientes distintas, aunque fueran de características demográficas similares; mientras que nuestro trabajo comparó la tasa de aneuploidías en estado basal o fisiológico (ciclo natural modificado) con un estado no fisiológico (bajo estimulación ovárica) el el mismo grupo de pacientes. En segundo lugar, la población de estudio eran pacientes infértiles y mayores que en nuestro estudio (33,5 vs. 25,4 años, respectivamente), el cual sólo ha incluido pacientes fértiles (donantes de ovocitos y semen de fertilidad probada).

DISCUSIÓN

El estudio de Baart se detuvo repentinamente habiendo incluido el 61 % de las pacientes previstas según cálculo del tamaño muestral tras la realización de un análisis intermedio que evidenció diferencias significativas a favor de la estimulación ovárica suave. El PGS se llevó a cabo en 33 pacientes sometidas a EO convencional y en 40 pacientes tras estimulación suave, biopsiando 1 o 2 blastómeras según características del embrión (≤ 6 ó >6 blastómeras, respectivamente).

Cuando tuvieron en cuenta solamente el análisis de la primera blastómera, observaron un 63% de aneuploidías en el grupo de EO convencional y un 45% en el grupo de EO suave. Cuando incluyeron el análisis de las dos blastómeras, se observó un 73% de aneuploidías en el grupo de EO convencional y un 55% en el grupo de EO suave.

El porcentaje de embriones con mosaicismo resultó del 65% en el grupo de EO convencional en comparación con el 37% en el grupo de EO suave ($p=0,004$). Aunque los autores atribuyen el incremento de anomalías cromosómicas en el grupo convencional a la mayor incidencia de mosaicismo, esta aseveración no está clara, porque cuando se biopsian 2 blastómeras (lo cual permite diagnosticar los casos de mosaicismo) la incidencia de aneuploidías se incrementa exactamente un 10% en ambos grupos. Si la EO convencional incrementara el mosaicismo, el porcentaje de cambio tras biopsia de 2 blastómeras en lugar de 1 blastómera debería ser mucho mayor en este grupo.

El mosaicismo parece deberse fundamentalmente a errores de segregación mitótica, por lo que la EO no debiera ser una causa directa de la génesis de mosaicismo. De todos modos, algunos autores sugieren que las gonadotropinas pudieran incrementar la probabilidad de generar embriones con errores de división celular tanto mitótica como meiótica (Katz-Jaffe, Trounson & Cram 2005). Por tanto, aunque el impacto que puedan tener las gonadotropinas sobre los ovocitos se justificaría por una disrupción de los mecanismos que mantienen una

propicia segregación cromosómica (Munne et al. 1997, Hodges et al. 2002), generando consecuentemente aneuploidías; no está claro en qué medida pudiera afectar a la división mitótica tras una concepción diploide normal y consecuentemente, incrementar las tasas de mosaicismo (Yuan et al. 2002, Lightfoot et al. 2006).

De todos modos, la incidencia de mosaicismo al final del primer trimestre de gestación es similar en pacientes que han gestado espontáneamente en comparación con aquellas que han precisado un tratamiento de estimulación ovárica (Huang et al. 2009), por lo que si es que existe algún tipo de diferencia en la tasa de mosaicismo a nivel preimplantatorio en embriones procedentes de estimulación ovárica, ésta se reduce a nivel postimplantatorio en gestaciones clínicamente establecidas indicando que la mayoría de mosaicismos se eliminan antes del primer trimestre. De hecho, está sólo presente en el 5% de abortos aneuploides detenidos entre la semana 6 y 20 de gestación (Hassold 1982).

En lo que respecta a relación entre dosis de gonadotropinas y tasas de gestación, encontramos un meta-análisis que incluyó 3 estudios aleatorizados comparando EO suave vs. convencional y valorando las tasas gestacionales en función de la respuesta ovárica (Verberg et al. 2009a).

Se observó que tras una EO suave, el obtener un número bajo de ovocitos (con una mediana de 5 ovocitos) se asocia con las tasas de gestación evolutiva más elevadas por embrión transferido cuando se usa protocolo con antagonistas de la GnRH, mientras que si se obtienen 8 o más ovocitos, hay una caída significativa en la tasa de implantación. Por tanto, en este grupo conviene obtener un número menor de ovocitos, representando a un grupo homogéneo de buena calidad, resultado de la mínima interferencia con la fisiología ovárica con la consecuente selección natural de gametos de buena calidad o de la disminución de la exposición de los folículos en desarrollo a la EO que puede tener efectos potencialmente negativos.

DISCUSIÓN

Por otra parte, en el grupo de EO convencional en protocolo largo, la tasa de gestación más elevada la obtienen con una mediana de 10 ovocitos ya que esto permite la selección del mejor embrión para transferir. Sin embargo, cuando generan menos de 10 ovocitos, los resultados son peores, sugiriendo el autor que una menor respuesta a una dosis convencional se asocia a envejecimiento ovárico. Esto refuerza la idea de que la calidad de la cohorte ovocitaria y embrionaria depende de la respuesta ovárica a una dosis determinada de gonadotropinas.

En los 2 protocolos de estimulación, una respuesta ovárica moderada acarrea mejores resultados gestacionales que la hiper-respuesta (≥ 9 ó 18 ovocitos, en ciclo suave o convencional, respectivamente), probablemente por los efectos negativos de la elevación de hormonas esteroideas sobre la calidad ovocitaria y embrionaria, y la receptividad endometrial (Simon et al. 1995, Labarta et al. 2011b).

Lo que si que es constante en los diferentes estudios que comparan ambas dosis de gonadotropinas, es que la estimulación suave no conlleva mejores resultados gestacionales, pero su justificación es que logra disminuir molestias y costes a la paciente, sin reducir la tasa de embarazo (Fauser et al. 1999).

Los resultados del estudio de Verberg, no serían aplicables a la población de donantes de ovocitos, puesto que por una parte, el efecto que puedan tener las hormonas esteroideas elevadas sobre el endometrio no se evidenciaría en la receptora de ovocitos y por tanto, en sus tasas de gestación.

Por otra parte, la respuesta ovárica en donantes de ovocitos es notablemente superior que en pacientes infértiles, pues las primeras dotan de una buena reserva folicular. De hecho, teniendo en cuenta que la dosis administrada en nuestras donantes de ovocitos fue

considerada moderada (2230UI totales), la mediana de ovocitos totales obtenidos resultó de 17. Esto significa que en donantes se ha precisado una media de 130UI de gonadotropinas para cada ovocito obtenido, mientras que en el meta-análisis de Verberg la media de gonadotropinas necesaria era de 200UI por cada ovocito obtenido, independientemente del protocolo utilizado (suave o convencional).

Como se ha presentado en el apartado de resultados, si el número de ovocitos totales obtenidos estaba por encima de la mediana, el número de embriones euploides resultantes resultó ser significativamente mayor, por lo que la tasa de gestación acumulada sería claramente superior en estos casos.

Importancia de la respuesta ovárica a la estimulación

En nuestro grupo de donantes de ovocitos sometidas a una EO, el incremento en la respuesta ovárica no conllevó un incremento en la tasa de aneuploidías. De hecho, hablando de números absolutos y no de porcentajes, a mayor respuesta ovárica, se obtuvo un mayor número de embriones euploides.

Estudios preliminares sugirieron que la respuesta ovárica pudiera ser considerada como un factor determinante de la aparición de aneuploidías más que las dosis de gonadotropinas utilizadas. En este sentido, se describió que mujeres con mayor número de ovocitos mostraban más ovocitos diploides y una mayor inmadurez citoplasmática que mujeres con respuesta moderada o suave a las gonadotropinas (Tarin, Pellicer 1990), independientemente de las dosis de drogas administradas. Igualmente, Baart observa una relación positiva entre la respuesta ovárica y la tasa de aneuploidías en el grupo de estimulación suave, mientras que esto no se cumple en el grupo de EO convencional (Baart et al. 2007).

DISCUSIÓN

Sin embargo, estudios más recientes con biopsia de primer corpúsculo polar, muestran que la respuesta a la estimulación ovárica se relaciona positivamente con la aneuploidía ovocitaria y que la proporción de ovocitos normales estaba directamente relacionada con el número de ovocitos maduros, e inversamente relacionada con el número de unidades de FSH por ovocito y por ovocito metafase II. (Haaf et al. 2009, Gianaroli et al. 2010)

Esto sugiere que la obtención de ovocitos maduros en respuesta a dosis moderadas de gonadotropinas está relacionada con menor riesgo de aneuploidía, reflejando una “salud ovárica adecuada”. Estos folículos capaces de crecer y reclutarse con mínimo estímulo de gonadotropinas exógenas, son capaces de generar ovocitos competentes (Fragouli et al. 2009). Este hallazgo está en consonancia con un estudio en donantes de ovocitos, en las que cuando reducimos las dosis de gonadotropinas respecto a las utilizadas en un primer ciclo en la misma donante, y obtenemos el mismo número de ovocitos en el ciclo subsiguiente, se observa una reducción en la tasa de anomalías embrionarias (Rubio et al. 2010b).

Igualmente, un trabajo retrospectivo reciente ha evidenciado como la alta respuesta ovárica a la EOC convencional no incrementa la incidencia de anomalías cromosómicas cuando realizamos PGS a través de aCGH, ni en pacientes ni en donantes de ovocitos (Ata et al. 2012). La tasa de aneuploidía es constante independientemente de cuántos embriones biopsiables hay disponibles (bien en día 3 o en estadio de blastocisto); y la posibilidad de tener al menos un embrión euploide dentro de la cohorte se incrementa a medida que lo hace el número de embriones biopsiables. El número de embriones biopsiables refleja el estado de reserva ovárica en este contexto de estimulación ovárica convencional, ya que no se han usado protocolos suaves ni ciclos naturales. Sus resultados indirectamente corroboran que mujeres con alta reserva ovárica son más susceptibles de lograr un embarazo y un RNV ya que son más proclives a generar más embriones y tener al menos un embrión euploide. Un

estudio retrospectivo recientemente publicado ha evidenciado cómo en pacientes con 4 o más blastocistos euploides disponibles, la transferencia embrionaria única ofrece tasas de gestación clínica similares a la doble, mientras que la tasa de gestación múltiple se reducía considerablemente. Sin embargo, en las pacientes con 3 o menos blastocistos euploides, la tasa de gestación clínica era mayor si se llevaba a cabo transferencia embrionaria doble (Morin et al. 2014). Estos resultados soportan la hipótesis de que el tamaño de la cohorte de embriones euploides es un marcador de éxito en el ciclo de FIV, por lo que el número de embriones euploides, más que el porcentaje de embriones euploides/aneuploides, debe tenerse en cuenta como predictor de éxito.

La evidencia de que la mayor respuesta ovárica en un ovario con buena dotación folicular, conlleva un mayor número de embriones euploides, refuerza que en las donantes de ovocitos quizá no compense llevar a cabo una estimulación ovárica excesivamente suave, pues por un lado, tendría alto riesgo de cancelación por respuesta insuficiente. Por otro lado, hoy en día no tememos el riesgo de SHO en nuestras donantes, ya que en todas ellas se lleva a cabo una estimulación ovárica moderada en protocolo con antagonistas de la GnRH y desencadenamos la ovulación con un análogo de la GnRH, estrategia que evita el riesgo de hiperestimulación ovárica (Humaidan, Papanikolaou & Tarlatzis 2009). Esto quizá sería también aplicable a pacientes infértiles normorrespondedoras, en las cuales conviene obtener un número adecuado de ovocitos con una dosis moderada, y en caso de alta respuesta y consecuente elevación suprafisiológica de hormonas esteroideas, proceder a la vitrificación embrionaria y transferencia en un ciclo diferido con el fin de mejorar las tasas de implantación (Roque et al. 2013).

Se ha sugerido que ya que las aneuploidías no se relacionan con la respuesta ovárica, lo adecuado sería obtener alrededor de 15 ovocitos MII (Ata et al. 2012). Este número no parece arbitrario, puesto que se vió que la tasa de gestación tras un ciclo de FIV se

DISCUSIÓN

incrementa conforme lo hace el número de ovocitos siempre y cuando no se sobrepase el límite de 15 ovocitos, permanece estable entre 15 y 20 ovocitos y declina si se obtienen más de 20 ovocitos (Sunkara et al. 2011).

Sin embargo, otros autores no han observado una asociación entre alta respuesta a la estimulación y disminución de la tasa de implantación o de la fracción de embriones de alta calidad, concluyendo que la calidad ovocitaria no se altera con la alta respuesta (Kok et al. 2006). De hecho, en el estudio Engage se observó una media de 8 embriones de buena calidad en día 3 de desarrollo si el número de ovocitos obtenidos fue superior a 18 en respuesta a dosis suaves de gonadotropinas (Fatemi et al. 2013), por lo que de nuevo se observó que una alta respuesta a una dosis moderada no disminuye la calidad embrionaria.

Comparación entre la tasa de aneuploidías observada en las donantes de ovocitos de nuestro estudio con la histórica

En el ciclo estimulado, la tasa de anomalías cromosómicas embrionaria en nuestro grupo de donantes es más baja que la descrita previamente (40,6 vs. 57%) (Reis Soares et al. 2003, Munne et al. 2006). Una explicación a estos hallazgos es que la dosis utilizada hace unos años era mayor, como se puede observar a través de una respuesta ovárica mucho más elevada, ya que el número de embriones biopsiados por ciclo era claramente superior en dichos estudios (14,6 embriones/ciclo vs. 6,7 en nuestro estudio). Esto conduce a pensar que cuando el ovario es estimulado de forma moderada o convencional, la calidad de la cohorte embrionaria se asemeja más al ciclo natural, mientras que la proporción de embriones anormales se incrementa significativamente cuando sometemos a la paciente a estimulaciones muy agresivas.

Consideramos más fiables los estudios de PGS basados en el análisis de blastómeras que los basados en el estudio de corpúsculo polar, pues estudios de CGH en corpúsculos polares de ovocitos procedentes de donantes jóvenes describen datos dispares en las tasas de aneuploidía ovocitaria, desde el 3% (Fragouli et al. 2009) al 65% (Sher et al. 2007).

Aunque la tasa de aneuploidías descrita en este estudio e históricamente pueda parecer bastante alta para ser donantes de ovocitos, queda compensada por el número elevado de ovocitos que producen las mismas, ya que finalmente hay suficientes embriones euploides que resultan en unas tasas elevadas de embarazo tras FIV (Munne et al. 2006).

La importancia del número absoluto de embriones euploides por ciclo en comparación con el porcentaje de aneuploidías

En todo caso, el número total de embriones euploides por ciclo de estimulación ovárica debe considerarse más que el porcentaje de aneuploidías. La ventaja del ciclo estimulado es que en donantes de ovocitos obtenemos una media de cuatro embriones euploides en comparación con el ciclo no estimulado, que ofrece como máximo un embrión euploide.

En pacientes infértiles, se ha observado el mismo número final de embriones euploides (alrededor de 2) entre el ciclo de estimulación suave y el convencional, independientemente del número de ovocitos y embriones conseguidos (Baart et al. 2007). Sin embargo, como se ha comentado previamente, en donantes de ovocitos esto no ocurre, porque nuestro estudio ha demostrado cómo el número de embriones euploides tiene una relación positiva con el número de ovocitos totales, de ovocitos MII y de ovocitos fecundados.

DISCUSIÓN

En todo caso, tanto en mujeres fértiles como infértiles y de mayor edad, el número de embriones euploides obtenidos siempre será mayor que el logrado en un ciclo natural, en el que, si la paciente tiene menos de 35 años, tendremos un 65% de posibilidades de encontrar un único embrión euploide.

Correlación entre el resultado del PGS en el ciclo no estimulado y en el ciclo estimulado

En nuestro estudio hemos observado que el antecedente de aneuploidía tras la realización del PGS en el ciclo no estimulado, incrementa la tasa de aneuploidías en el ciclo estimulado del 33,9% al 46,2% ($p=0,12$).

Esta tendencia observada hacia una mayor tasa de anomalías embrionarias cromosómicas cuando el embrión procedente del ciclo no estimulado fue anormal, concuerda con lo previamente publicado en la literatura (Al-Asmar et al. 2012). Esto pone de manifiesto que el problema está en el sujeto más que en factores exógenos que puedan afectar a la tasa de anomalías cromosómicas.

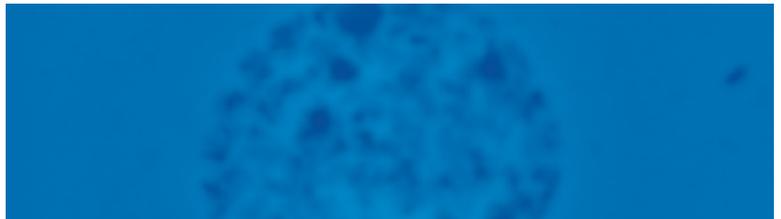
Resultados gestacionales

Aunque la tasa de implantación fue absolutamente comparable entre ambos ciclos, la diferencia en el número total de embriones euploides disponibles para transferir explica la mayor tasa de gestación acumulada que observamos en ciclos de donación ovocitaria cuando la donante ha sido estimulada. De hecho, la tasa de recién nacido vivo por ciclo completado fue del 13% en el ciclo no estimulado en comparación con el 45,7% en el estimulado ($p=0,001$).

Estos resultados, nos demuestran dos hechos fundamentales. Por una parte, la calidad embrionaria es similar en el ciclo no estimulado y estimulado, pues la tasa de implantación no se ve afectada por el uso de gonadotropinas. Por otra, la eficacia del ciclo natural es significativamente inferior que la del ciclo estimulado porque éste último ofrece unas tasas de gestación acumulada mucho mayores.

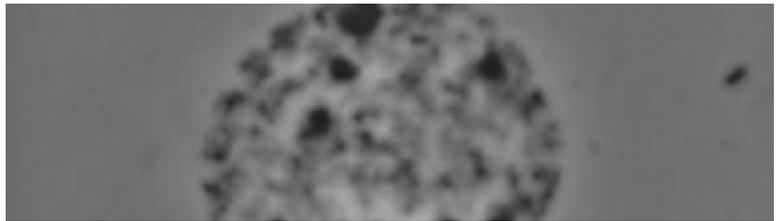
Finalmente, la tasa de nacidos vivos fue significativamente mayor en el ciclo estimulado ya que se transfirieron más embriones por ciclo. Resulta de interés el hecho de observar una mayor tasa de pérdida gestacional en el ciclo no estimulado, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Sin embargo, no debemos perder de vista que no podemos emitir conclusiones categóricas ya que el tamaño muestral no fue calculado para este propósito.

CONCLUSIONES



- El uso de dosis moderadas de gonadotropinas para la Estimulación Ovárica durante un ciclo de FIV no incrementa de forma estadísticamente significativa la tasa de aneuploidías embrionarias con respecto al ciclo no estimulado.
- Los resultados derivados del análisis de ciclos no estimulados para FIV en este estudio muestran que las alteraciones cromosómicas embrionarias humanas están presentes incluso en condiciones ováricas fisiológicas y en ausencia de estimulación con gonadotropinas, sugiriendo la causa de la baja fecundidad en humanos en un ciclo menstrual único.
- En mujeres jóvenes y fértiles, como las donantes de ovocitos, una mayor respuesta ovárica ante una misma dosis moderada de gonadotropinas, ofrece un mayor número absoluto de embriones euploides por ciclo iniciado.
- La tasa de aneuploidías observada en este grupo de mujeres no se correlaciona directamente con la respuesta ovárica ni con la dosis total de gonadotropinas administradas.
- El número de ovocitos metafase II necesario para dar lugar a un embrión euploide es similar en el ciclo no estimulado y en el ciclo estimulado.
- A pesar de que las tasas de implantación son comparables en ambos ciclos, en el ciclo estimulado existe una mayor tasa de gestación acumulada gracias a la disponibilidad de un mayor número de embriones euploides para transferir al útero materno.

BIBLIOGRAFÍA



- Aboulghar, M.A., Mansour, R.T., Serour, G.A., Amin, Y.M., Sattar, M.A. & Ramzy, A.M. 1995, "In vitro fertilization in a spontaneous cycle: a successful simple protocol", *Journal of obstetrics and gynaecology (Tokyo, Japan)*, vol. 21, no. 4, pp. 337-340.
- Al-Asmar, N., Peinado, V., Vera, M., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., Hassold, T. & Rubio, C. 2012, "Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage", *Fertility and sterility*, vol. 98, no. 1, pp. 145-150.
- Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Stevens, J., Gutierrez-Mateo, C., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G. & Wells, D. 2011, "The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 2, pp. 520-524.
- Allersma, T., Farquhar, C. & Cantineau, A.E. 2013, "Natural cycle in vitro fertilisation (IVF) for subfertile couples", *The Cochrane database of systematic reviews*, vol. 8, pp. CD010550.
- Almeida, P.A. & Bolton, V.N. 1995, "The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte", *Zygote (Cambridge, England)*, vol. 3, no. 4, pp. 357-365.
- Ata, B., Kaplan, B., Danzer, H., Glassner, M., Opsahl, M., Tan, S.L. & Munne, S. 2012, "Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated", *Reproductive biomedicine online*, vol. 24, no. 6, pp. 614-620.
- Baart, E.B., Martini, E., Eijkemans, M.J., Van Opstal, D., Beckers, N.G., Verhoeff, A., Macklon, N.S. & Fauser, B.C. 2007, "Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 4, pp. 980-988.
- Baart, E.B., Martini, E., van den Berg, I., Macklon, N.S., Galjaard, R.J., Fauser, B.C. & Van Opstal, D. 2006, "Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 1, pp. 223-233.
- Basile, N., Nogales Mdel, C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., Garcia-Velasco, J. & Meseguer, M. 2014, "Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis", *Fertility and sterility*, vol. 101, no. 3, pp. 699-704.
- Baxter Bendus, A.E., Mayer, J.F., Shipley, S.K. & Catherino, W.H. 2006, "Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading", *Fertility and sterility*, vol. 86, no. 6, pp. 1608-1615.

- Bean, C.J., Hassold, T.J., Judis, L. & Hunt, P.A. 2002, "Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 9, pp. 2362-2367.
- Bean, C.J., Hunt, P.A., Millie, E.A. & Hassold, T.J. 2001, "Analysis of a malsegregating mouse Y chromosome: evidence that the earliest cleavage divisions of the mammalian embryo are non-disjunction-prone", *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 9, pp. 963-972.
- Beaumont, H.M. & Smith, A.F. 1975, "Embryonic mortality during the pre- and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation", *Journal of reproduction and fertility*, vol. 45, no. 3, pp. 437-448.
- Beyer, C.E., Osianlis, T., Boekel, K., Osborne, E., Rombauts, L., Catt, J., Kravlevski, V., Aali, B.S. & Gras, L. 2009, "Preimplantation genetic screening outcomes are associated with culture conditions", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 24, no. 5, pp. 1212-1220.
- Bingol, B., Abike, F., Gedikbasi, A., Tapisiz, O.L. & Gunenc, Z. 2012, "Comparison of chromosomal abnormality rates in ICSI for non-male factor and spontaneous conception", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 29, no. 1, pp. 25-30.
- Bosch, E., Labarta, E., Crespo, J., Simon, C., Remohi, J. & Pellicer, A. 2011, "Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 3, pp. 1031-1036.
- Braude, P., Bolton, V. & Moore, S. 1988, "Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development", *Nature*, vol. 332, no. 6163, pp. 459-461.
- Buckett, W.M. & Tan, S.L. 2005, "Congenital abnormalities in children born after assisted reproductive techniques: how much is associated with the presence of infertility and how much with its treatment?", *Fertility and sterility*, vol. 84, no. 5, pp. 1318-9; discussion 1327.
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M. & Hickman, C.F. 2013, "Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics", *Reproductive biomedicine online*, vol. 26, no. 5, pp. 477-485.
- Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., Nagy, Z.P. & Ubaldi, F.M. 2014, "Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts", *Human reproduction (Oxford, England)*, .
- Ceelen, M., van Weissenbruch, M.M., Roos, J.C., Vermeiden, J.P., van Leeuwen, E.E. &

- Delemarre-van de Waal, H.A. 2007, "Body composition in children and adolescents born after in vitro fertilization or spontaneous conception", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 92, no. 9, pp. 3417-3423.
- Chang, A.S., Moley, K.H., Wangler, M., Feinberg, A.P. & Debaun, M.R. 2005, "Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients", *Fertility and sterility*, vol. 83, no. 2, pp. 349-354.
- Chang, M.C. 1977, "Digynic triploidy after superovulation", *Nature*, vol. 266, no. 5600, pp. 382-383.
- Chao, H.T., Lee, S.Y., Lee, H.M., Liao, T.L., Wei, Y.H. & Kao, S.H. 2005, "Repeated ovarian stimulations induce oxidative damage and mitochondrial DNA mutations in mouse ovaries", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1042, pp. 148-156.
- Christopikou, D., Tsorva, E., Economou, K., Shelley, P., Davies, S., Mastrominas, M. & Handyside, A.H. 2013, "Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 28, no. 5, pp. 1426-1434.
- Cohen, J., Wells, D. & Munne, S. 2007, "Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates", *Fertility and sterility*, vol. 87, no. 3, pp. 496-503.
- Colls, P., Escudero, T., Cekleniak, N., Sadowy, S., Cohen, J. & Munne, S. 2007, "Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue"", *Fertility and sterility*, vol. 88, no. 1, pp. 53-61.
- Colls, P., Goodall, N., Zheng, X. & Munne, S. 2009, "Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy by testing 12 chromosomes", *Reproductive biomedicine online*, vol. 19, no. 4, pp. 532-538.
- Conway, D.A., Patel, S.S., Liem, J., Fan, K.J., Jalian, R., Williams, J., 3rd & Pisarska, M.D. 2011, "The risk of cytogenetic abnormalities in the late first trimester of pregnancies conceived through assisted reproduction", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 2, pp. 503-506.
- Coulam, C.B., Jeyendran, R.S., Fiddler, M. & Pergament, E. 2007, "Discordance among blastomeres renders preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy ineffective", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 24, no. 1, pp. 37-41.
- Cox, G.F., Burger, J., Lip, V., Mau, U.A., Sperling, K., Wu, B.L. & Horsthemke, B. 2002, "Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects",

American Journal of Human Genetics, vol. 71, no. 1, pp. 162-164.

- Daphnis, D.D., Fragouli, E., Economou, K., Jerkovic, S., Craft, I.L., Delhanty, J.D. & Harper, J.C. 2008, "Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH", *Molecular human reproduction*, vol. 14, no. 2, pp. 117-125.
- Davies, M.J., Moore, V.M., Willson, K.J., Van Essen, P., Priest, K., Scott, H., Haan, E.A. & Chan, A. 2012, "Reproductive technologies and the risk of birth defects", *The New England journal of medicine*, vol. 366, no. 19, pp. 1803-1813.
- Dayal, M.B., Gindoff, P.R., Sarhan, A., Dubey, A., Peak, D. & Frankfurter, D. 2009, "Effects of triploidy after intracytoplasmic sperm injection on in vitro fertilization cycle outcome", *Fertility and sterility*, vol. 91, no. 1, pp. 101-105.
- De Geyter, C., De Geyter, M., Steimann, S., Zhang, H. & Holzgreve, W. 2006, "Comparative birth weights of singletons born after assisted reproduction and natural conception in previously infertile women", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 3, pp. 705-712.
- De Sutter, P., Dhont, M. & Vandekerckhove, D. 1992, "Hormonal stimulation for in vitro fertilization: a comparison of fertilization rates and cytogenetic findings in unfertilized oocytes", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 9, no. 3, pp. 254-258.
- Denomme, M.M., Zhang, L. & Mann, M.R. 2011, "Embryonic imprinting perturbations do not originate from superovulation-induced defects in DNA methylation acquisition", *Fertility and sterility*, vol. 96, no. 3, pp. 734-738.e2.
- Devroey, P., Polyzos, N.P. & Blockeel, C. 2011, "An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 26, no. 10, pp. 2593-2597.
- Doornbos, M.E., Maas, S.M., McDonnell, J., Vermeiden, J.P. & Hennekam, R.C. 2007, "Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 9, pp. 2476-2480.
- Eaton, J.L., Hacker, M.R., Harris, D., Thornton, K.L. & Penzias, A.S. 2009, "Assessment of day-3 morphology and euploidy for individual chromosomes in embryos that develop to the blastocyst stage", *Fertility and sterility*, vol. 91, no. 6, pp. 2432-2436.
- Eaton, J.L., Lieberman, E.S., Stearns, C., Chinchilla, M. & Racowsky, C. 2012, "Embryo culture media and neonatal birthweight following IVF", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 2, pp. 375-379.
- Edwards, L.J., Kind, K.L., Armstrong, D.T. & Thompson, J.G. 2005, "Effects of recombinant

- human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice”, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 288, no. 5, pp. E845-51.
- Edwards, R.G., Lobo, R. & Bouchard, P. 1996, “Time to revolutionize ovarian stimulation”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 11, no. 5, pp. 917-919.
- Egozcue, S., Blanco, J., Vidal, F. & Egozcue, J. 2002, “Diploid sperm and the origin of triploidy”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 1, pp. 5-7.
- Elbling, L. & Colot, M. 1985, “Abnormal development and transport and increased sister-chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice”, *Mutation research*, vol. 147, no. 4, pp. 189-195.
- El-Chaar, D., Yang, Q., Gao, J., Bottomley, J., Leader, A., Wen, S.W. & Walker, M. 2009, “Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction”, *Fertility and sterility*, vol. 92, no. 5, pp. 1557-1561.
- Ertzeid, G. & Storeng, R. 2001, “The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 2, pp. 221-225.
- Ertzeid, G. & Storeng, R. 1992, “Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice”, *Journal of reproduction and fertility*, vol. 96, no. 2, pp. 649-655.
- Ertzeid, G., Storeng, R. & Lyberg, T. 1993, “Treatment with gonadotropins impaired implantation and fetal development in mice”, *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 10, no. 4, pp. 286-291.
- Evers, J.L. 2002, “Female subfertility”, *Lancet*, vol. 360, no. 9327, pp. 151-159.
- Fatemi, H.M., Doody, K., Griesinger, G., Witjes, H. & Mannaerts, B. 2013, “High ovarian response does not jeopardize ongoing pregnancy rates and increases cumulative pregnancy rates in a GnRH-antagonist protocol”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 28, no. 2, pp. 442-452.
- Fausser, B.C., Devroey, P., Yen, S.S., Gosden, R., Crowley, W.F., Jr, Baird, D.T. & Bouchard, P. 1999, “Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 14, no. 11, pp. 2681-2686.
- Fausser, B.C., Nargund, G., Andersen, A.N., Norman, R., Tarlatzis, B., Boivin, J. & Ledger, W. 2010, “Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 25, no. 11, pp. 2678-2684.
- Fauzdar, A., Halder, A. & Kumar, A. 2009, “Effect of gonadotropins on chromosome

- aneuploidy, chromosome mosaicism & sex ratio in mouse preimplantation embryos”, *The Indian journal of medical research*, vol. 129, no. 6, pp. 669-675.
- Foote, R.H. & Carney, E.W. 1988, “Factors limiting reproductive efficiency in selected laboratory animals”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 541, pp. 683-696.
- Forman, E.J., Treff, N.R., Stevens, J.M., Garnsey, H.M., Katz-Jaffe, M.G., Scott, R.T., Jr & Schoolcraft, W.B. 2013, “Embryos whose polar bodies contain isolated reciprocal chromosome aneuploidy are almost always euploid”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 28, no. 2, pp. 502-508.
- Fortier, A.L., Lopes, F.L., Darricarrere, N., Martel, J. & Trasler, J.M. 2008, “Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta”, *Human molecular genetics*, vol. 17, no. 11, pp. 1653-1665.
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Daphnis, D.D., Goodall, N.N., Mania, A., Griffiths, T., Gordon, A. & Wells, D. 2011a, “Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 26, no. 2, pp. 480-490.
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Goodall, N.N., Sanchez-Garcia, J.F., Colls, P. & Wells, D. 2011b, “The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy”, *Molecular human reproduction*, vol. 17, no. 5, pp. 286-295.
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K. & Wells, D. 2013, “Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos”, *Molecular human reproduction*.
- Fragouli, E., Escalona, A., Gutierrez-Mateo, C., Tormasi, S., Alfarawati, S., Sepulveda, S., Noriega, L., Garcia, J., Wells, D. & Munne, S. 2009, “Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donors”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 19, no. 2, pp. 228-237.
- Frumkin, T., Malcov, M., Yaron, Y. & Ben-Yosef, D. 2008, “Elucidating the origin of chromosomal aberrations in IVF embryos by preimplantation genetic analysis”, *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 282, no. 1-2, pp. 112-119.
- Fujimoto, S., Pahlavan, N. & Dukelow, W.R. 1974, “Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation”, *Journal of reproduction and fertility*, vol. 40, no. 1, pp. 177-181.
- Garrido, N., Zuzuarregui, J.L., Meseguer, M., Simon, C., Remohi, J. & Pellicer, A. 2002, “Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 12, pp. 3142-3148.

- Ghosh, D., Stewart, D.R., Nayak, N.R., Lasley, B.L., Overstreet, J.W., Hendrickx, A.G. & Sengupta, J. 1997, "Serum concentrations of oestradiol-17beta, progesterone, relaxin and chorionic gonadotrophin during blastocyst implantation in natural pregnancy cycle and in embryo transfer cycle in the rhesus monkey", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 12, no. 5, pp. 914-920.
- Gianaroli, L., Magli, M.C., Cavallini, G., Crippa, A., Capoti, A., Resta, S., Robles, F & Ferraretti, A.P. 2010, "Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 25, no. 9, pp. 2374-2386.
- Gianaroli, L., Magli, M.C., Ferraretti, A.P. & Munne, S. 1999, "Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed", *Fertility and sterility*, vol. 72, no. 5, pp. 837-844.
- Golbus, M.S. 1981, "The influence of strain, maternal age, and method of maturation on mouse oocyte aneuploidy", *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 31, no. 2, pp. 84-90.
- Goossens, V., De Rycke, M., De Vos, A., Staessen, C., Michiels, A., Verpoest, W., Van Steirteghem, A., Bertrand, C., Liebaers, I., Devroey, P. & Sermon, K. 2008, "Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 3, pp. 481-492.
- Gosden, R., Trasler, J., Lucifero, D. & Faddy, M. 2003, "Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology", *Lancet*, vol. 361, no. 9373, pp. 1975-1977.
- Gras, L., McBain, J., Trounson, A. & Kola, I. 1992, "The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) unispermated human oocytes", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 7, no. 10, pp. 1396-1401.
- Griesinger, G., Kolibianakis, E.M., Diedrich, K. & Ludwig, M. 2008, "Ovarian stimulation for IVF has no quantitative association with birthweight: a registry study", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 11, pp. 2549-2554.
- Griffin, D.K., Wilton, L.J., Handyside, A.H., Atkinson, G.H., Winston, R.M. & Delhanty, J.D. 1993, "Diagnosis of sex in preimplantation embryos by fluorescent in situ hybridisation", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 306, no. 6889, pp. 1382.
- Griffin, D.K., Wilton, L.J., Handyside, A.H., Winston, R.M. & Delhanty, J.D. 1992, "Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei", *Human genetics*, vol. 89, no. 1, pp. 18-22.

- Gutierrez-Mateo, C., Colls, P., Sanchez-Garcia, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Wells, D. & Munne, S. 2011, "Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 3, pp. 953-958.
- Haaf, T., Hahn, A., Lambrecht, A., Grossmann, B., Schwaab, E., Khanaga, O., Hahn, T., Tresch, A. & Schorsch, M. 2009, "A high oocyte yield for intracytoplasmic sperm injection treatment is associated with an increased chromosome error rate", *Fertility and sterility*, vol. 91, no. 3, pp. 733-738.
- Haapaniemi Kouru, K., Malmgren, H., Nordenskjold, M., Fridstrom, M., Csemiczky, G. & Blennow, E. 2012, "One-cell biopsy significantly improves the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) treatment: retrospective analysis of 569 PGD cycles at the Stockholm PGD centre", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 9, pp. 2843-2849.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J. & Surani, M.A. 2002, "Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells", *Mechanisms of development*, vol. 117, no. 1-2, pp. 15-23.
- Handyside, A.H., Montag, M., Magli, M.C., Repping, S., Harper, J., Schmutzler, A., Vesela, K., Gianaroli, L. & Geraedts, J. 2012, "Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 20, no. 7, pp. 742-747.
- Hansen, M., Kurinczuk, J.J., Bower, C. & Webb, S. 2002, "The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization", *The New England journal of medicine*, vol. 346, no. 10, pp. 725-730.
- Hansmann, I. & Probeck, H.D. 1979, "Chromosomal imbalance in ovulated oocytes from Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) and Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*)", *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 23, no. 1-2, pp. 70-76.
- Hardarson, T., Caisander, G., Sjogren, 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", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 18, no. 2, pp. 399-407.
- Hart, R. & Norman, R.J. 2013a, "The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I-General health outcomes", *Human reproduction update*, vol. 19, no. 3, pp. 232-243.
- Hart, R. & Norman, R.J. 2013b, "The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment. Part II-Mental health and development outcomes", *Human*

- reproduction update*, vol. 19, no. 3, pp. 244-250.
- Harton, G.L., Munne, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D.H., Griffin, D.K., Wells, D. & PGD Practitioners Group 2013, "Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization", *Fertility and sterility*, .
- Hassold, T. 1982, "Mosaic trisomies in human spontaneous abortions", *Human genetics*, vol. 61, no. 1, pp. 31-35.
- Hassold, T., Abruazzo, M., Adkins, K., Griffin, D., Merrill, M., Millie, E., Saker, D., Shen, J. & Zaragoza, M. 1996, "Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology", *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 28, no. 3, pp. 167-175.
- Hassold, T., Hall, H. & Hunt, P. 2007, "The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going", *Human molecular genetics*, vol. 16 Spec No. 2, pp. R203-8.
- Hassold, T. & Hunt, P. 2001, "To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy", *Nature reviews. Genetics*, vol. 2, no. 4, pp. 280-291.
- Helmerhorst, F.M., Perquin, D.A., Donker, D. & Keirse, M.J. 2004, "Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 328, no. 7434, pp. 261.
- Hill, M.J., Levens, E.D., Levy, G., Ryan, M.E., Csokmay, J.M., DeCherney, A.H. & Whitcomb, B.W. 2012, "The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis", *Fertility and sterility*, vol. 97, no. 5, pp. 1108-14.e1.
- Hodes-Wertz, B., Grifo, J., Ghadir, S., Kaplan, B., Laskin, C.A., Glassner, M. & Munne, S. 2012, "Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos", *Fertility and sterility*, vol. 98, no. 3, pp. 675-680.
- Hodges, C.A., Ilagan, A., Jennings, D., Keri, R., Nilson, J. & Hunt, P.A. 2002, "Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 5, pp. 1171-1180.
- Hohmann, F.P., Macklon, N.S. & Fauser, B.C. 2003, "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", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 88, no. 1, pp. 166-173.
- Howles, C.M., Macnamee, M.C., Edwards, R.G., Goswamy, R. & Steptoe, P.C. 1986, "Effect of

- high tonic levels of luteinising hormone on outcome of in-vitro fertilisation”, *Lancet*, vol. 2, no. 8505, pp. 521-522.
- Huang, A., Adusumalli, J., Patel, S., Liem, J., Williams, J., 3rd & Pisarska, M.D. 2009, “Prevalence of chromosomal mosaicism in pregnancies from couples with infertility”, *Fertility and sterility*, vol. 91, no. 6, pp. 2355-2360.
- Humaidan, P., Papanikolaou, E.G. & Tarlatzis, B.C. 2009, “GnRHa to trigger final oocyte maturation: a time to reconsider”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 24, no. 10, pp. 2389-2394.
- Jackson, K.V., Ginsburg, E.S., Hornstein, M.D., Rein, M.S. & Clarke, R.N. 1998, “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”, *Fertility and sterility*, vol. 70, no. 1, pp. 60-66.
- Jacobs, P.A. & Hassold, T.J. 1995, “The origin of numerical chromosome abnormalities”, *Advances in Genetics*, vol. 33, pp. 101-133.
- Joo, B.S., Park, S.H., An, B.M., Kim, K.S., Moon, S.E. & Moon, H.S. 2010, “Serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation influence the pregnancy outcome of in vitro fertilization in a concentration-dependent manner”, *Fertility and sterility*, vol. 93, no. 2, pp. 442-446.
- Jun, S.H., O’Leary, T., Jackson, K.V. & Racowsky, C. 2006, “Benefit of intracytoplasmic sperm injection in patients with a high incidence of triploidy in a prior in vitro fertilization cycle”, *Fertility and sterility*, vol. 86, no. 4, pp. 825-829.
- Kaleli, S., Yanikkaya-Demirel, G., Erel, C.T., Senturk, L.M., Topcuoglu, A. & Irez, T. 2005, “High rate of aneuploidy in luteinized granulosa cells obtained from follicular fluid in women who underwent controlled ovarian hyperstimulation”, *Fertility and sterility*, vol. 84, no. 3, pp. 802-804.
- Katz-Jaffe, M.G., Trounson, A.O. & Cram, D.S. 2005, “Chromosome 21 mosaic human preimplantation embryos predominantly arise from diploid conceptions”, *Fertility and sterility*, vol. 84, no. 3, pp. 634-643.
- Keskintepe, L., Sher, G. & Keskintepe, M. 2007, “Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: comparison between fluorescence in-situ hybridization and comparative genomic hybridization”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 15, no. 3, pp. 303-309.
- Kok, J.D., Looman, C.W., Weima, S.M. & te Velde, E.R. 2006, “A high number of oocytes obtained after ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection is not associated with decreased pregnancy outcome”, *Fertility and sterility*, vol. 85, no. 4, pp. 918-924.

- Kolibianakis, E., Zikopoulos, K., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A. & Devroey, P. 2004, "Modified natural cycle for IVF does not offer a realistic chance of parenthood in poor responders with high day 3 FSH levels, as a last resort prior to oocyte donation", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 19, no. 11, pp. 2545-2549.
- Kuliev, A., Cieslak, J., Ilkevitch, Y. & Verlinsky, Y. 2003, "Chromosomal abnormalities in a series of 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies", *Reproductive biomedicine online*, vol. 6, no. 1, pp. 54-59.
- Kuliev, A. & Verlinsky, Y. 2004, "Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis", *Human reproduction update*, vol. 10, no. 5, pp. 401-407.
- Kushnir, V.A. & Frattarelli, J.L. 2009, "Aneuploidy in abortuses following IVF and ICSI", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 26, no. 2-3, pp. 93-97.
- La Marca, A. & Sunkara, S.K. 2014, "Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice", *Human reproduction update*, vol. 20, no. 1, pp. 124-140.
- Labarta, E., Martínez-Conejero, J.A., Alama, P., Horcajadas, J.A., Pellicer, A., Simon, C. & Bosch, E. 2011a, "Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 26, no. 7, pp. 1813-1825.
- Labarta, E., Martínez-Conejero, J.A., Alamá, P., Horcajadas, J.A., Pellicer, A., Simón, C. & Bosch, E. 2011b, "Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: A functional genomics analysis", *Human Reproduction*, vol. 26, no. 7, pp. 1813-1825.
- Lathi, R.B. & Milki, A.A. 2004, "Rate of aneuploidy in miscarriages following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection", *Fertility and sterility*, vol. 81, no. 5, pp. 1270-1272.
- Lathi, R.B., Westphal, L.M. & Milki, A.A. 2008, "Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis", *Fertility and sterility*, vol. 89, no. 2, pp. 353-357.
- Lee, S.T., Kim, T.M., Cho, M.Y., Moon, S.Y., Han, J.Y. & Lim, J.M. 2005, "Development of a hamster superovulation program and adverse effects of gonadotropins on microfilament formation during oocyte development", *Fertility and sterility*, vol. 83 Suppl 1, pp. 1264-1274.
- Lie, R.T., Lyngstadaas, A., Orstavik, K.H., Bakketeig, L.S., Jacobsen, G. & Tanbo, T. 2005, "Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by

- other IVF-methods; a meta-analysis”, *International journal of epidemiology*, vol. 34, no. 3, pp. 696-701.
- Lightfoot, D.A., Kouznetsova, A., Mahdy, E., Wilbertz, J. & Hoog, C. 2006, “The fate of mosaic aneuploid embryos during mouse development”, *Developmental biology*, vol. 289, no. 2, pp. 384-394.
- Los, F.J., Van Opstal, D. & van den Berg, C. 2004, “The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model”, *Human reproduction update*, vol. 10, no. 1, pp. 79-94.
- Lundqvist, M., Johansson, U., Lundqvist, O., Milton, K., Westin, C. & Simberg, N. 2001, “Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential?”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 2, no. 1, pp. 12-16.
- Macklon, N.S. & Fauser, B.C. 2003, “Mild stimulation in in vitro fertilization”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 997, pp. 105-111.
- Macklon, N.S., Geraedts, J.P. & Fauser, B.C. 2002, “Conception to ongoing pregnancy: the ‘black box’ of early pregnancy loss”, *Human reproduction update*, vol. 8, no. 4, pp. 333-343.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Gordts, S., Fredericks, V. & Crippa, A. 2009, “Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 18, no. 4, pp. 536-542.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A. & Farfalli, V. 2007, “Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement”, *Fertility and sterility*, vol. 87, no. 3, pp. 534-541.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Munne, S. & Ferraretti, A.P. 1998, “Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients”, *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 15, no. 5, pp. 297-301.
- Magli, M.C., Jones, G.M., Gras, L., Gianaroli, L., Korman, I. & Trounson, A.O. 2000, “Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, no. 8, pp. 1781-1786.
- Market-Velker, B.A., Zhang, L., Magri, L.S., Bonvissuto, A.C. & Mann, M.R. 2010, “Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner”, *Human molecular genetics*, vol. 19, no. 1, pp. 36-51.
- Marquez, C., Sandalinas, M., Bahce, M., Alikani, M. & Munne, S. 2000, “Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 1, no. 1, pp. 17-26.

- Martinez, M.C., Mendez, C., Ferro, J., Nicolas, M., Serra, V. & Landeras, J. 2010, "Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment", *Fertility and sterility*, vol. 93, no. 1, pp. 289-292.
- Massie, J.A., Shahine, L.K., Milki, A.A., Westphal, L.M. & Lathi, R.B. 2011, "Ovarian stimulation and the risk of aneuploid conceptions", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 3, pp. 970-972.
- Maudlin, I. & Fraser, L.R. 1977, "The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro", *Journal of reproduction and fertility*, vol. 50, no. 2, pp. 275-280.
- McFadden, D.E., Jiang, R., Langlois, S. & Robinson, W.P. 2002, "Dispermy--origin of diandric triploidy: brief communication", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 12, pp. 3037-3038.
- McKiernan, S.H. & Bavister, B.D. 1998, "Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one-cell hamster embryos", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 13, no. 3, pp. 724-729.
- McKiernan, S.H. & Bavister, B.D. 1990, "Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage", *Biology of reproduction*, vol. 43, no. 3, pp. 404-413.
- Mercader, A., Garcia-Velasco, J.A., Escudero, E., Remohi, J., Pellicer, A. & Simon, C. 2003, "Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study", *Fertility and sterility*, vol. 80, no. 5, pp. 1162-1168.
- Mersereau, J.E., Pergament, E., Zhang, X. & Milad, M.P. 2008, "Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial", *Fertility and sterility*, vol. 90, no. 4, pp. 1287-1289.
- Mertzanidou, A., Wilton, L., Cheng, J., Spits, C., Vanneste, E., Moreau, Y., Vermeesch, J.R. & Sermon, K. 2013, "Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 28, no. 1, pp. 256-264.
- Meyer, L.R., Klipstein, S., Hazlett, W.D., Nasta, T., Mangan, P. & Karande, V.C. 2009, "A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the "good prognosis" patient", *Fertility and sterility*, vol. 91, no. 5, pp. 1731-1738.
- Michiels, A., Van Assche, E., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. & Staessen, C. 2006, "The analysis of one or two blastomeres for PGD using fluorescence in-situ hybridization",

Human reproduction (Oxford, England), vol. 21, no. 9, pp. 2396-2402.

- Mir, P., Rodrigo, L., Mateu, E., Peinado, V., Milan, M., Mercader, A., Buendia, P., Delgado, A., Pellicer, A., Remohi, J. & Rubio, C. 2010, "Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 25, no. 7, pp. 1812-1817.
- Mitwally, M.F., Bhakoo, H.S., Crickard, K., Sullivan, M.W., Batt, R.E. & Yeh, J. 2006, "Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with treatment outcome in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer", *Fertility and sterility*, vol. 86, no. 3, pp. 588-596.
- Mochtar, M.H., Van der, V., Ziech, M. & van Wely, M. 2007, "Recombinant Luteinizing Hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles", *The Cochrane database of systematic reviews*, vol. (2), no. 2, pp. CD005070.
- Morgia, F., Sbracia, M., Schimberni, M., Giallonardo, A., Piscitelli, C., Giannini, P. & Aragona, C. 2004, "A controlled trial of natural cycle versus microdose gonadotropin-releasing hormone analog flare cycles in poor responders undergoing in vitro fertilization", *Fertility and sterility*, vol. 81, no. 6, pp. 1542-1547.
- Morin, S., Melzer-Ross, K., McCulloh, D., Grifo, J. & Munne, S. 2014, "A greater number of euploid blastocysts in a given cohort predicts excellent outcomes in single embryo transfer cycles", *Journal of assisted reproduction and genetics*, .
- Munne, S. 2006, "Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos", *Reproductive biomedicine online*, vol. 12, no. 2, pp. 234-253.
- Munne, S., Alikani, M., Tomkin, G., Grifo, J. & Cohen, J. 1995, "Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities", *Fertility and sterility*, vol. 64, no. 2, pp. 382-391.
- Munne, S., Ary, J., Zouves, C., Escudero, T., Barnes, F., Cinioglu, C., Ary, B. & Cohen, J. 2006, "Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors", *Reproductive biomedicine online*, vol. 12, no. 3, pp. 340-346.
- Munne, S., Fragouli, E., Colls, P., Katz-Jaffe, M., Schoolcraft, W. & Wells, D. 2010, "Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test", *Reproductive biomedicine online*, vol. 20, no. 1, pp. 92-97.
- Munne, S., Magli, C., Adler, A., Wright, G., de Boer, K., Mortimer, D., Tucker, M., Cohen, J. & Gianaroli, L. 1997, "Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 12, no. 4, pp. 780-784.

- Munne, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Marquez, C. & Cohen, J. 2002, "Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect", *Reproductive biomedicine online*, vol. 4, no. 3, pp. 223-232.
- Munne, S., Sandalinas, M., Magli, C., Gianaroli, L., Cohen, J. & Warburton, D. 2004, "Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions", *Prenatal diagnosis*, vol. 24, no. 8, pp. 638-643.
- Munne, S. & Wells, D. 2003, "Questions concerning the suitability of comparative genomic hybridization for preimplantation genetic diagnosis", *Fertility and sterility*, vol. 80, no. 4, pp. 871-2; discussion 875.
- Murray, J.D., Boland, M.P. & Moran, C. 1986, "Frequency of chromosomal abnormalities in embryos from superovulated merino ewes", *Journal of reproduction and fertility*, vol. 78, no. 2, pp. 433-437.
- Nargund, G., Fauser, B.C., Macklon, N.S., Ombelet, W., Nygren, K., Frydman, R. & Rotterdam ISMAAR Consensus Group on Terminology for Ovarian Stimulation for IVF 2007, "The ISMAAR proposal on terminology for ovarian stimulation for IVF", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 11, pp. 2801-2804.
- Nargund, G., Waterstone, J., Bland, J., Philips, Z., Parsons, J. & Campbell, S. 2001, "Cumulative conception and live birth rates in natural (unstimulated) IVF cycles", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 2, pp. 259-262.
- Natale, D.R., De Sousa, P.A., Westhusin, M.E. & Watson, A.J. 2001, "Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR", *Reproduction (Cambridge, England)*, vol. 122, no. 5, pp. 687-693.
- Nelissen, E.C., Van Montfoort, A.P., Coonen, E., Derhaag, J.G., Geraedts, J.P., Smits, L.J., Land, J.A., Evers, J.L. & Dumoulin, J.C. 2012, "Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 7, pp. 1966-1976.
- Nicolaidis, P. & Petersen, M.B. 1998, "Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 13, no. 2, pp. 313-319.
- Northrop, L.E., Treff, N.R., Levy, B. & Scott, R.T., Jr 2010, "SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts", *Molecular human reproduction*, vol. 16, no. 8, pp. 590-600.
- Olivennes, F., Howies, C.M., Borini, A., Germond, M., Trew, G., Wikland, M., Zegers-Hochschild, F., Saunders, H. & Alam, V. 2011, "Individualizing FSH dose for assisted

reproduction using a novel algorithm: the CONSORT study”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 22 Suppl 1, pp. S73-82.

Ombelet, W., Martens, G., De Sutter, P., Gerris, J., Bosmans, E., Ruysinck, G., Defoort, P., Molenberghs, G. & Gyselaers, W. 2006, “Perinatal outcome of 12,021 singleton and 3108 twin births after non-IVF-assisted reproduction: a cohort study”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 4, pp. 1025-1032.

Orstavik, K.H., Eiklid, K., van der Hagen, C.B., Spetalen, S., Kierulf, K., Skjeldal, O. & Buiting, K. 2003, “Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection”, *American Journal of Human Genetics*, vol. 72, no. 1, pp. 218-219.

Ottolini, C., Rienzi, L. & Capalbo, A. 2014, “A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 28, no. 3, pp. 273-275.

Owen, C.M. & Segars, J.H., Jr 2009, “Imprinting disorders and assisted reproductive technology”, *Seminars in reproductive medicine*, vol. 27, no. 5, pp. 417-428.

Pabon, J.E., Jr, Findley, W.E. & Gibbons, W.E. 1989, “The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development”, *Fertility and sterility*, vol. 51, no. 5, pp. 896-900.

Paternot, G., Wetzels, A.M., Thonon, F., Vansteenbrugge, A., Willemen, D., Devroe, J., Debrock, S., D’Hooghe, T.M. & Spiessens, C. 2011, “Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: a multicentre study”, *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, vol. 9, pp. 127-7827-9-127.

Pehlivan, T., Rubio, C., Rodrigo, L., Remohi, J., Pellicer, A. & Simon, C. 2003a, “Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls”, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, vol. 10, no. 6, pp. 315-322.

Pehlivan, T., Rubio, C., Rodrigo, L., Romero, J., Remohi, J., Simon, C. & Pellicer, A. 2003b, “Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 6, no. 2, pp. 232-237.

Pelinc, M.J., Hadders-Algra, M., Haadsma, M.L., Nijhuis, W.L., Kiewiet, S.M., Hoek, A., Heineman, M.J. & Middelburg, K.J. 2010a, “Is the birthweight of singletons born after IVF reduced by ovarian stimulation or by IVF laboratory procedures?”, *Reproductive biomedicine online*, vol. 21, no. 2, pp. 245-251.

- Pelinck, M.J., Hoek, A., Simons, A.H. & Heineman, M.J. 2002, "Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature", *Human reproduction update*, vol. 8, no. 2, pp. 129-139.
- Pelinck, M.J., Keizer, M.H., Hoek, A., Simons, A.H., Schelling, K., Middelburg, K. & Heineman, M.J. 2010b, "Perinatal outcome in singletons after modified natural cycle IVF and standard IVF with ovarian stimulation", *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, vol. 148, no. 1, pp. 56-61.
- Pelinck, M.J., Vogel, N.E., Arts, E.G., Simons, A.H., Heineman, M.J. & Hoek, A. 2007, "Cumulative pregnancy rates after a maximum of nine cycles of modified natural cycle IVF and analysis of patient drop-out: a cohort study", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 9, pp. 2463-2470.
- Pelinck, M.J., Vogel, N.E., Hoek, A., Simons, A.H., Arts, E.G., Mochtar, M.H., Beemsterboer, S., Hondelink, M.N. & Heineman, M.J. 2006, "Cumulative pregnancy rates after three cycles of minimal stimulation IVF and results according to subfertility diagnosis: a multicentre cohort study", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 21, no. 9, pp. 2375-2383.
- Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C. & Demaille, J. 2002, "Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 8, pp. 2134-2145.
- Pellicer, A., Rubio, C., Vidal, F., Minguez, Y., Gimenez, C., Egozcue, J., Remohi, J. & Simon, C. 1999, "In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos", *Fertility and sterility*, vol. 71, no. 6, pp. 1033-1039.
- Pendina, A.A., Efimova, O.A., Chiryayeva, O.G., Tikhonov, A.V., Petrova, L.I., Dudkina, V.S., Sadik, N.A., Fedorova, I.D., Galembo, I.A., Kuznetzova, T.V., Gzgzzyan, A.M. & Baranov, V.S. 2013, "A comparative cytogenetic study of miscarriages after IVF and natural conception in women aged under and over 35 years", *Journal of assisted reproduction and genetics*, .
- Pickering, S.J., Braude, P.R., Johnson, M.H., Cant, A. & Currie, J. 1990, "Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte", *Fertility and sterility*, vol. 54, no. 1, pp. 102-108.
- Pieters, M.H., Dumoulin, J.C., Engelhart, C.M., Bras, M., Evers, J.L. & Geraedts, J.P. 1991, "Immaturity and aneuploidy in human oocytes after different stimulation protocols", *Fertility and sterility*, vol. 56, no. 2, pp. 306-310.
- Pinborg, A., Henningsen, A.K., Malchau, S.S. & Loft, A. 2013, "Congenital anomalies after

- assisted reproductive technology”, *Fertility and sterility*, vol. 99, no. 2, pp. 327-332.
- Plachot, M. 2003, “Genetic analysis of the oocyte--a review”, *Placenta*, vol. 24 Suppl B, pp. S66-9.
- Plachot, M. 2001, “Chromosomal abnormalities in oocytes”, *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 183 Suppl 1, pp. S59-63.
- Polyzos, N.P., Blockeel, C., Verpoest, W., De Vos, M., Stoop, D., Vloeberghs, V., Camus, M., Devroey, P. & Tournaye, H. 2012, “Live birth rates following natural cycle IVF in women with poor ovarian response according to the Bologna criteria”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 12, pp. 3481-3486.
- Qin, J.Z., Pang, L.H., Li, M.Q., Xu, J. & Zhou, X. 2013, “Risk of chromosomal abnormalities in early spontaneous abortion after assisted reproductive technology: a meta-analysis”, *PloS one*, vol. 8, no. 10, pp. e75953.
- Raatikainen, K., Kuivasaari-Pirinen, P., Hippelainen, M. & Heinonen, S. 2012, “Comparison of the pregnancy outcomes of subfertile women after infertility treatment and in naturally conceived pregnancies”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 4, pp. 1162-1169.
- Rancourt, RC., Harris, HR., Michels, KB. 2012 “Methylation levels at imprinting control regions are not altered with ovulation induction or in vitro fertilization in a birth cohort”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 7, pp. 2208-2216.
- Reis Soares, S., Rubio, C., Rodrigo, L., Simon, C., Remohi, J. & Pellicer, A. 2003, “High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles”, *Fertility and sterility*, vol. 80, no. 3, pp. 656-657.
- Reyftmann, L., Dechaud, H., Loup, V., Anahory, T., Brunet-Joyeux, C., Lacroix, N., Hamamah, S. & Hedon, B. 2007, “Natural cycle in vitro fertilization cycle in poor responders”, *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, vol. 35, no. 4, pp. 352-358.
- Roberts, R., Iatropoulou, A., Ciantar, D., Stark, J., Becker, D.L., Franks, S. & Hardy, K. 2005, “Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro”, *Biology of reproduction*, vol. 72, no. 1, pp. 107-118.
- Rodrigo, L., Mateu, E., Mercader, A., Cobo, AC., Peinado, V., Milán, M., Al-Asmar, N., Campos-Galindo, I., García-Herrero, S., Mir, P., Simón, C., Rubio, C. New tools for embryo selection: Comprehensive Chromosome Screening by Array Comparative Genomic Hybridization. *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 517125, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/517125>.

- Rodrigo, L., Peinado, V., Mateu, E., Remohi, J., Pellicer, A., Simon, C., Gil-Salom, M. & Rubio, C. 2010, "Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos", *Fertility and sterility*, vol. 94, no. 4, pp. 1380-1386.
- Romundstad, L.B., Romundstad, P.R., Sunde, A., von Düring, V., Skjaerven, R., Gunnell, D. & Vatten, L.J. 2008, "Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study", *Lancet*, vol. 372, no. 9640, pp. 737-743.
- Rooke, J.A., McEvoy, T.G., Ashworth, C.J., Robinson, J.J., Wilmut, I., Young, L.E. & Sinclair, K.D. 2007, "Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction", *Theriogenology*, vol. 67, no. 3, pp. 639-647.
- Roque, M., Lattes, K., Serra, S., Solà, I., Geber, S., Carreras, R. & Checa, M.A. 2013, "Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: A systematic review and meta-analysis", *Fertility and sterility*, vol. 99, no. 1, pp. 156-162.
- Rosen, M.P., Shen, S., Dobson, A.T., Fujimoto, V.Y., McCulloch, C.E. & Cedars, M.I. 2006, "Triploidy formation after intracytoplasmic sperm injection may be a surrogate marker for implantation", *Fertility and sterility*, vol. 85, no. 2, pp. 384-390.
- Rosenbusch, B., Sterzik, K., Sasse, V. & Djalali, M. 1993, "Cytogenetics of unfertilized or undivided oocytes within the scope of in vitro fertilization: relation to the kind of hormonal stimulation", *Zentralblatt für Gynäkologie*, vol. 115, no. 5, pp. 225-227.
- Rubio, C., Bellver, J., Castellón, G., Guillén, A., Vidal, C., Remohí, J., Pellicer, A. & Simón, C. 2014, "RCT study in advanced maternal age patients using array-CGH: interim analysis", accepted in ESRHE (oral communication).
- Rubio, C., Bellver, J., Rodrigo, L., Bosch, E., Mercader, A., Vidal, C., De Los Santos, M.J., Giles, J., Labarta, E., Domingo, J., Crespo, J., Remohí, J., Pellicer, A. & Simón, C. 2013, "Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: Two randomized trials", *Fertility and sterility*, vol. 99, no. 5, pp. 1400-1407.
- Rubio, C., Mercader, A., Alama, P., Lizan, C., Rodrigo, L., Labarta, E., Melo, M., Pellicer, A. & Remohi, J. 2010a, "Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 25, no. 9, pp. 2290-2297.
- Rubio, C., Mercader, A., Alama, P., Lizan, C., Rodrigo, L., Labarta, E., Melo, M., Pellicer, A. & Remohi, J. 2010b, "Prospective cohort study in high responder oocyte donors

using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 25, no. 9, pp. 2290-2297.

Rubio, C., Pehlivan, T., Rodrigo, L., Simon, C., Remohi, J. & Pellicer, A. 2005, “Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview”, *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, vol. 53, no. 4, pp. 159-165.

Rubio, C., Rodrigo, L., Mercader, A., Mateu, E., Buendia, P., Pehlivan, T., Vilorio, T., De los Santos, M.J., Simon, C., Remohi, J. & Pellicer, A. 2007, “Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development”, *Prenatal diagnosis*, vol. 27, no. 8, pp. 748-756.

Rubio, C., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohi, J. & Pellicer, A. 2003, “Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 18, no. 1, pp. 182-188.

Sachs, A.R., Politch, J.A., Jackson, K.V., Racowsky, C., Hornstein, M.D. & Ginsburg, E.S. 2000, “Factors associated with the formation of triploid zygotes after intracytoplasmic sperm injection”, *Fertility and sterility*, vol. 73, no. 6, pp. 1109-1114.

Sadowy, S., Tomkin, G., Munne, S., Ferrara-Congedo, T. & Cohen, J. 1998, “Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size”, *Zygote (Cambridge, England)*, vol. 6, no. 2, pp. 137-141.

Santalo, J., Estop, A.M. & Egozcue, J. 1986, “The chromosome complement of first-cleavage mouse embryos after in vitro fertilization”, *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer : IVF*, vol. 3, no. 2, pp. 99-105.

Santos, F., Hyslop, L., Stojkovic, P., Leary, C., Murdoch, A., Reik, W., Stojkovic, M., Herbert, M. & Dean, W. 2010a, “Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 25, no. 9, pp. 2387-2395.

Santos, M.A., Teklenburg, G., Macklon, N.S., Van Opstal, D., Schuring-Blom, G.H., Krijtenburg, P.J., de Vreeden-Elbertse, J., Fauser, B.C. & Baart, E.B. 2010b, “The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 25, no. 8, pp. 1916-1926.

Sato, A., Otsu, E., Negishi, H., Utsunomiya, T. & Arima, T. 2007, “Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes”, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 22, no. 1, pp. 26-35.

- Sazonova, A., Kallen, K., Thurin-Kjellberg, A., Wennerholm, U.B. & Bergh, C. 2011, "Factors affecting obstetric outcome of singletons born after IVF", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 26, no. 10, pp. 2878-2886.
- Schieve, L.A., Rasmussen, S.A. & Reefhuis, J. 2005, "Risk of birth defects among children conceived with assisted reproductive technology: providing an epidemiologic context to the data", *Fertility and sterility*, vol. 84, no. 5, pp. 1320-4; discussion 1327.
- Schimberni, M., Morgia, F., Colabianchi, J., Giallonardo, A., Piscitelli, C., Giannini, P., Montigiani, M. & Sbracia, M. 2009, "Natural-cycle in vitro fertilization in poor responder patients: a survey of 500 consecutive cycles", *Fertility and sterility*, vol. 92, no. 4, pp. 1297-1301.
- Scott, K.L., Hong, K.H. & Scott, R.T., Jr 2013, "Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing", *Fertility and sterility*, vol. 100, no. 3, pp. 608-614.
- Sengoku, K. & Dukelow, R.W. 1988, "Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos", *Biology of reproduction*, vol. 38, no. 1, pp. 150-155.
- Sher, G., Keskinetepe, L., Keskinetepe, M., Ginsburg, M., Maassarani, G., Yakut, T., Baltaci, V., Kotze, D. & Unsal, E. 2007, "Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study", *Fertility and sterility*, vol. 87, no. 5, pp. 1033-1040.
- Shevell, T., Malone, F.D., Vidaver, J., Porter, T.F., Luthy, D.A., Comstock, C.H., Hankins, G.D., Eddleman, K., Dolan, S., Dugoff, L., Craigo, S., Timor, I.E., Carr, S.R., Wolfe, H.M., Bianchi, D.W. & D'Alton, M.E. 2005, "Assisted reproductive technology and pregnancy outcome", *Obstetrics and gynecology*, vol. 106, no. 5 Pt 1, pp. 1039-1045.
- Simon, C., Cano, E., Valbuena, D., Remohi, J. & Pellicer, A. 1995, "Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 10, no. 9, pp. 2432-2437.
- Spielmann, H. & Vogel, R. 1993, "Genotoxic and embryotoxic effects of gonadotropin hyperstimulated ovulation on murine oocytes, preimplantation embryos and term fetuses", *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, vol. 29, no. 1, pp. 35-39.
- Staessen, C., Verpoest, W., Donoso, P., Haentjens, P., Van der Elst, J., Liebaers, I. & Devroey, P. 2008, "Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 12, pp. 2818-2825.

- Stephens, P.C. & Edwards, R.G. 1978, "Birth after the reimplantation of a human embryo", *Lancet*, vol. 2, no. 8085, pp. 366.
- Stevens, V.C. 1997, "Some reproductive studies in the baboon", *Human reproduction update*, vol. 3, no. 6, pp. 533-540.
- Sunkara, S.K., Rittenberg, V., Raine-Fenning, N., Bhattacharya, S., Zamora, J. & Coomarasamy, A. 2011, "Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 26, no. 7, pp. 1768-1774.
- Takagi, N. & Sasaki, M. 1976, "Digynic triploidy after superovulation in mice", *Nature*, vol. 264, no. 5583, pp. 278-281.
- Tarin, J.J. & Pellicer, A. 1990, "Consequences of high ovarian response to gonadotropins: a cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes", *Fertility and sterility*, vol. 54, no. 4, pp. 665-670.
- Taylor, A. 2003, "ABC of subfertility: extent of the problem", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 327, no. 7412, pp. 434-436.
- Taylor, T.H., Gitlin, S.A., Patrick, J.L., Crain, J.L., Wilson, J.M. & Griffin, D.K. 2014, "The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans", *Human reproduction update*, .
- Thomson, F., Shanbhag, S., Templeton, A. & Bhattacharya, S. 2005, "Obstetric outcome in women with subfertility", *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, vol. 112, no. 5, pp. 632-637.
- Thum, M.Y., Abdalla, H.I. & Taylor, D. 2008, "Relationship between women's age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment", *Fertility and sterility*, vol. 90, no. 2, pp. 315-321.
- Ubaldi, F. & Rienzi, L. 2009, "Possible impact of LH-containing gonadotrophins on diploidy rates in preimplantation embryos", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 24, no. 5, pp. 1238-9; author reply 1239-40.
- Valbuena, D., Martin, J., de Pablo, J.L., Remohi, J., Pellicer, A. & Simon, C. 2001, "Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo", *Fertility and sterility*, vol. 76, no. 5, pp. 962-968.
- Van Blerkom, J. & Davis, P. 2001, "Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 4, pp. 757-764.

- Van Blerkom, J. & Henry, G. 1992, "Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 7, no. 3, pp. 379-390.
- Van der Auwera, I. & D'Hooghe, T. 2001, "Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 6, pp. 1237-1243.
- Van der Auwera, I., Pijnenborg, R. & Koninckx, P.R. 1999, "The influence of in-vitro culture versus stimulated and untreated oviductal environment on mouse embryo development and implantation", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 14, no. 10, pp. 2570-2574.
- van Echten-Arends, J., Mastenbroek, S., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J.C., Heineman, M.J., van der Veen, F. & Repping, S. 2011, "Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review", *Human reproduction update*, vol. 17, no. 5, pp. 620-627.
- Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., Fryns, J.P., Verbeke, G., D'Hooghe, T., Moreau, Y. & Vermeesch, J.R. 2009, "Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos", *Nature medicine*, vol. 15, no. 5, pp. 577-583.
- Verberg, M.F., Eijkemans, M.J., Macklon, N.S., Heijnen, E.M., Baart, E.B., Hohmann, F.P., Fauser, B.C. & Broekmans, F.J. 2009a, "The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis", *Human reproduction update*, vol. 15, no. 1, pp. 5-12.
- Verberg, M.F., Macklon, N.S., Nargund, G., Frydman, R., Devroey, P., Broekmans, F.J. & Fauser, B.C. 2009b, "Mild ovarian stimulation for IVF", *Human reproduction update*, vol. 15, no. 1, pp. 13-29.
- Vergouw, C.G., Kostelijk, E.H., Doejaaren, E., Hompes, P.G., Lambalk, C.B. & Schats, R. 2012, "The influence of the type of embryo culture medium on neonatal birthweight after single embryo transfer in IVF", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 27, no. 9, pp. 2619-2626.
- Verpoest, W., Fauser, B.C., Papanikolaou, E., Staessen, C., Van Landuyt, L., Donoso, P., Tournaye, H., Liebaers, I. & Devroey, P. 2008, "Chromosomal aneuploidy in embryos conceived with unstimulated cycle IVF", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 10, pp. 2369-2371.
- Viuff, D., Greve, T., Avery, B., Hyttel, P., Brockhoff, P.B. & Thomsen, P.D. 2000, "Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination",

Biology of reproduction, vol. 63, no. 4, pp. 1143-1148.

- Viuff, D., Hendriksen, P.J., Vos, P.L., Dieleman, S.J., Bibby, B.M., Greve, T., Hyttel, P. & Thomsen, P.D. 2001, "Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation", *Biology of reproduction*, vol. 65, no. 1, pp. 204-208.
- Viuff, D., Rickords, L., Offenbergh, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, J.L., Callesen, H. & Thomsen, P.D. 1999, "A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid", *Biology of reproduction*, vol. 60, no. 6, pp. 1273-1278.
- Voullaire, L., Slater, H., Williamson, R. & Wilton, L. 2000, "Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization", *Human genetics*, vol. 106, no. 2, pp. 210-217.
- Warburton, D., Dallaire, L., Thangavelu, M., Ross, L., Levin, B. & Kline, J. 2004, "Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data", *American Journal of Human Genetics*, vol. 75, no. 3, pp. 376-385.
- Weghofer, A., Munne, S., Brannath, W., Chen, S., Barad, D., Cohen, J. & Gleicher, N. 2009, "The impact of LH-containing gonadotropin stimulation on euploidy rates in preimplantation embryos: antagonist cycles", *Fertility and sterility*, vol. 92, no. 3, pp. 937-942.
- Weghofer, A., Munne, S., Brannath, W., Chen, S., Tomkin, G., Cekleniak, N., Garrisi, M., Barad, D., Cohen, J. & Gleicher, N. 2008, "The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 23, no. 3, pp. 499-503.
- Wells, D. 2010, "Embryo aneuploidy and the role of morphological and genetic screening", *Reproductive biomedicine online*, vol. 21, no. 3, pp. 274-277.
- Wells, D. & Delhanty, J.D. 2000, "Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization", *Molecular human reproduction*, vol. 6, no. 11, pp. 1055-1062.
- Wilding, M., Forman, R., Hogewind, G., Di Matteo, L., Zullo, F., Cappiello, F. & Dale, B. 2004, "Preimplantation genetic diagnosis for the treatment of failed in vitro fertilization-embryo transfer and habitual abortion", *Fertility and sterility*, vol. 81, no. 5, pp. 1302-1307.
- Wilkins-Haug, L. 2008, "Assisted reproductive technology, congenital malformations, and epigenetic disease", *Clinical obstetrics and gynecology*, vol. 51, no. 1, pp. 96-105.

- Wilton, L. 2005, "Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization", *Human reproduction update*, vol. 11, no. 1, pp. 33-41.
- Wilton, L. 2002, "Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review", *Prenatal diagnosis*, vol. 22, no. 6, pp. 512-518.
- Yang, Z., Liu, J., Collins, G.S., Salem, S.A., Liu, X., Lyle, S.S., Peck, A.C., Sills, E.S. & Salem, R.D. 2012a, "Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study", *Molecular cytogenetics*, vol. 5, no. 1, pp. 24-8166-5-24.
- Yang, Z., Liu, J., Collins, G.S., Salem, S.A., Liu, X., Lyle, S.S., Peck, A.C., Sills, E.S. & Salem, R.D. 2012b, "Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study", *Molecular cytogenetics*, vol. 5, no. 1, pp. 24-8166-5-24.
- Yuan, L., Liu, J.G., Hoja, M.R., Wilbertz, J., Nordqvist, K. & Hoog, C. 2002, "Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 296, no. 5570, pp. 1115-1118.
- Zenzes, M.T. & Casper, R.F. 1992, "Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization", *Human genetics*, vol. 88, no. 4, pp. 367-375.
- Zhu, J.L., Basso, O., Obel, C., Bille, C. & Olsen, J. 2006, "Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 333, no. 7570, pp. 679.
- Ziebe, S., Bangsboll, S., Schmidt, K.L., Loft, A., Lindhard, A. & Nyboe Andersen, A. 2004, "Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 19, no. 6, pp. 1457-1460.

ANEXOS



ANEXO 1: INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**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 la Dra. Elena Labarta Demur titulado:

“Influencia de la estimulación ovàrica en el índice de aneuploidías.”

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 la Dra. Elena Labarta Demur

Lo que firmo en Valencia a 12 de Junio de 2.006


Firmado: Josep Lluís Romero

ANEXO 2: HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LAS RECEPTORAS DE GAMETOS

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO PARA LAS RECEPTORAS DE GAMETOS

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Influencia de la estimulación ovárica durante un tratamiento de fecundación *in vitro* en la incidencia de aneuploidías embrionarias”

INVESTIGADOR PRINCIPAL/DPTO./EMAIL: Dra. Elena Labarta, Departamento de Reproducción Humana. elabarta@ivi.es

CENTRO: IVI Valencia, 96 3050900

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. 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

Estamos realizando un estudio con el fin de evaluar la incidencia de alteraciones cromosómicas, tanto en los embriones obtenidos tras un ciclo natural como en aquellos obtenidos tras un protocolo de estimulación ovárica. Para que la población de estudio sea homogénea, los embriones procederán de donantes de óvulos y semen.

Resumen del plan de trabajo:

Se procederá a la obtención de un ovocito de donante en un ciclo natural mediante punción folicular. En una segunda fase dicha donante será sometida a una estimulación ovárica con el fin de obtener un mayor número de ovocitos. Los ovocitos obtenidos de ambos ciclos se inseminarán con la misma muestra de semen donado. Se realizará una técnica de diagnóstico genético preimplantacional a los embriones obtenidos en ciclo natural y en ciclo estimulado y se realizará una comparación entre ambos ciclos. Usted, como receptora de óvulos y semen, se realizará una transferencia embrionaria, siempre y cuando el embrión obtenido de cada uno de los ciclos sea cromosómicamente normal, con el objetivo de lograr una gestación evolutiva.

Diseño del Estudio:

Preparación de la receptora de óvulos:

Para poder realizar la transferencia de un embrión en el útero, la receptora debe preparar el endometrio (mucosa que recubre el interior de la cavidad del útero) con el uso de terapia hormonal sustitutiva.

La terapia hormonal sustitutiva consiste en la administración de estrógenos (valerianato de estradiol) desde el primer día de ciclo menstrual. Este tipo de tratamiento permite que su endometrio esté listo para la donación en cualquier momento, y facilita la sincronización entre la donante y la receptora.

El VE se administrará por vía oral (6 mg/día) o transdérmica (2 parches de 75 mg/48 horas).

Tras 7-10 días de tratamiento se llevará a cabo una ecografía transvaginal con el objetivo de medir el grosor endometrial. Si éste es superior a 6 mm, se continuará con la misma dosis de tratamiento hasta recibir la donación, momento en el que se añadirá el tratamiento con progesterona vaginal desde el día en que confirmamos la fecundación correcta de los ovocitos.

Si el grosor endometrial es inferior a 6 mm, la dosis de VE será incrementada y se repetirá una ecografía a los 7 días para comprobar que se alcanza ese espesor. Si el endometrio no supera los 6 mm de espesor, no se llevará a cabo la donación y la receptora no será incluida en el estudio.

En caso de que la receptora tenga ciclos ováricos regulares, será necesario suprimir la función ovárica con una inyección intramuscular (triptorelina depot, 3,75mg) en día 21 de

ciclo menstrual previo, para tener el control del ciclo evitando una ovulación prematura. En mujeres diagnosticadas de menopausia no es necesaria esta medida, pues ya tienen suprimida la función ovárica. En este caso, se puede iniciar directamente la terapia hormonal sustitutiva.

En caso de sangrado durante la fase estrogénica se cancelará el ciclo de la receptora por disminuir las posibilidades de implantación y se reiniciará posteriormente un nuevo ciclo de terapia hormonal sustitutiva.

Diseño del Estudio:

Fase 1: Ciclo Natural de la donante:

- En el ciclo natural de la donante la receptora de gametos se realizará la transferencia de un blastocisto en día 5 de desarrollo siempre y cuando éste resulte cromosómicamente normal.
- La receptora estará previamente preparada para recibir la donación mediante un ciclo sustituido de terapia hormonal.
- El ciclo natural puede no dar lugar a la existencia de un embrión por la alta tasa de cancelación observada en este tipo de protocolo, debida fundamentalmente a ovulación prematura, no obtención de óvulo tras la punción folicular, no fecundación, detención del desarrollo embrionario o resultado anómalo del diagnóstico genético preimplantacional.
- El ciclo natural se repetirá al siguiente ciclo si no se logra realizar biopsia embrionaria en día 3 por los motivos previamente mencionados en el apartado anterior. Realizaremos un máximo de 2 ciclos naturales por donante.
- Si se fracasa tras la realización de dos ciclos naturales de la misma donante, la receptora tendrá la posibilidad de decidir si se retira del estudio para recibir una donación ovocitaria convencional.

Fase 2: Ciclo de Hiperestimulación Ovárica Controlada de la donante:

- La fase 2 no se iniciará hasta que la fase 1 haya sido finalizada, es decir, hasta que hayamos llevado a cabo la biopsia embrionaria y dispongamos del resultado de la fase 1.
- En el ciclo estimulado la receptora recibirá un número mayor de ovocitos, siendo menor el riesgo de cancelación del ciclo.
- Si quedan embriones cromosómicamente normales sobrantes, éstos serán

congelados y serán propiedad de la pareja receptora para poder disponer de los mismos cuando sea necesario.

- Transferencia de uno o dos blastocistos cromosómicamente normales (para los cromosomas estudiados) en día 5 de desarrollo. La decisión de transferir uno o dos embriones dependerá de la opinión de la paciente, pero en todo momento bajo criterio médico.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

El estudio no conlleva riesgos ni inconvenientes para la salud de las pacientes participantes. La participación en este estudio no entra en conflicto con su ciclo de reproducción asistida. Para participar en este estudio no es necesario realizar visitas extraordinarias a la clínica, ni pruebas adicionales.

En el caso de que no se obtenga un embrión euploide del ciclo natural de la donante, y por tanto, la receptora no tenga la posibilidad de llevar a cabo una transferencia embrionaria, este ciclo será completamente gratis para la paciente. En el caso de obtener un embrión euploide del ciclo natural de la donante y transferir el mismo a la receptora, el coste del tratamiento de donación es significativamente menor al de un tratamiento de donación convencional, pues en el primer caso solo se dispone de un embrión para transferir.

El beneficio para las parejas receptoras es la posibilidad de llevar a cabo un ciclo previo natural de la donante, con un menor coste y sin ninguna repercusión sobre sus tasas de éxito en el tratamiento actual ni en los posteriores.

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 investigador del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo.

Los pacientes participantes en este estudio lo hacen voluntariamente y por tanto no existe compensación económica.

Entrar en este estudio no comportará gastos adicionales para los pacientes en la técnica de reproducción que los mismos estén realizando. De este modo, los pacientes no deberán correr a cargo con los gastos derivados de la realización del diagnóstico genético preimplantacional, ni en el ciclo natural ni en el posterior ciclo estimulado.

Asimismo, en caso de no poder llevar a cabo la transferencia de un embrión cromosómicamente normal tras el ciclo natural, este no supondrá ningún coste a la paciente receptora de gametos.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Se entiende que en cualquier momento usted tiene derecho a cambiar de opinión y no participar en este estudio.

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.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Código del Estudio:

Yo (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio): SI NO

Firma del paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

ANEXO 3: HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LAS DONANTES DE ÓVULOS

HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO PARA LAS DONANTES DE ÓVULOS

TÍTULO DEL ESTUDIO: “Influencia de la estimulación ovárica durante un tratamiento de fecundación *in vitro* en la incidencia de aneuploidías embrionarias”

INVESTIGADOR PRINCIPAL/DPTO./EMAIL: Dra. Elena Labarta, Departamento de Reproducción Humana. elabarta@ivi.es

CENTRO: IVI Valencia, 96 3050900

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. 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

Estamos realizando un estudio con el fin de evaluar la incidencia de alteraciones cromosómicas, tanto en los embriones obtenidos tras un ciclo natural como en aquellos obtenidos tras un protocolo de estimulación ovárica. Para que la población de estudio sea homogénea, los embriones procederán de donantes de óvulos y semen.

Resumen del plan de trabajo:

Se procederá a la obtención de un ovocito de donante en un ciclo natural mediante punción folicular. En una segunda fase dicha donante será sometida a una estimulación ovárica con el fin de obtener un mayor número de ovocitos. Los ovocitos obtenidos de ambos ciclos se inseminarán con la misma muestra de semen donado. Se realizará una técnica de diagnóstico genético preimplantacional a los embriones obtenidos en ciclo natural y en ciclo estimulado y se realizará una comparación entre ambos ciclos.

Fases del estudio:

Fase 1: Ciclo Natural de la donante:

- La donante debe acudir a la clínica a la semana en los primeros 5 días de regla para realización de una ecografía.
- Se realizarán controles ecográficos hasta que el folículo alcance 18 mm de diámetro, momento en que se programa la punción folicular o extracción ovocitaria.
- El día que se programa la punción, se inyectarán 250 mcg de coriogonadotropina recombinante (Ovitrelle®) para inducir la maduración ovocitaria final y la ovulación.
- 36 horas más tarde, se realiza una punción folicular bajo control ecográfico y bajo sedación.

Fase 2: Ciclo de Hiperestimulación Ovárica Controlada de la donante:

- Realizaremos un protocolo largo con análogos de la GnRH, comenzando a mitad de fase lútea del ciclo previo con acetato de leuprolide (0.2mg/dia). La donante debe acudir a la clínica aproximadamente una semana antes de la menstruación para iniciar el mencionado tratamiento.
- Tras la regla, deberá acudir de nuevo a la clínica para realizar una ecografía y una vez confirmado el reposo ovárico, reduciremos la dosis de análogo a la mitad (0,1 mg diarios) y comenzaremos la estimulación ovárica.
- La estimulación ovárica se llevará a cabo con gonadotropinas, con dosis fija durante los 3 primeros días y variable durante el resto del tratamiento en función del nivel de hormonas en sangre y de la medida de los folículos.
- Se administrarán 250 mcg de coriogonadotropina recombinante (Ovitrelle®) para

inducir la maduración ovocitaria final y la ovulación (se realizará punción folicular si se tienen al menos 6 folículos \geq 17 mm).

- 36 horas más tarde, se realiza una punción folicular bajo control ecográfico y bajo sedación.
- El tratamiento completo dura aproximadamente unos 15-20 días. Durante el tratamiento, la donante deberá venir a consulta para realización de ecografías los días que el médico le indique. Asimismo, realizaremos extracciones seriadas de sangre para control hormonal.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

El estudio no conlleva riesgos ni inconvenientes para la salud de las donantes participantes. La participación en este estudio no entra en conflicto con su ciclo de donación ovocitaria. Para participar en este estudio es necesario realizar visitas extraordinarias a la clínica, pues antes de llevar a cabo el ciclo de donación ovocitaria convencional se realizará el seguimiento de un ciclo natural previo.

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

Por el tiempo dedicado al estudio o por las molestias que se le ocasionen, las donantes recibirán una compensación económica tanto por el ciclo natural como por el ciclo estimulado.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Se entiende que en cualquier momento usted tiene derecho a cambiar de opinión y no participar en este estudio.

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.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Código del Estudio:

Yo (nombre y apellidos).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:..... (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

- Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio): SI NO

Firma de la paciente:

Firma del investigador:

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

ANEXO 4: ARTÍCULO PUBLICADO

Labarta, E., Bosch, E., Alamá, P., Rubio, C., Rodrigo, L. & Pellicer, A. 2012, "Moderate ovarian stimulation does not increase the incidence of human embryo chromosomal abnormalities in *in vitro* fertilization cycles", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 97, no. 10, pp. E1987-E1994.

JCEM ONLINE

Advances in Genetics—Endocrine Research

Moderate Ovarian Stimulation Does Not Increase the Incidence of Human Embryo Chromosomal Abnormalities in *in Vitro* Fertilization Cycles

Elena Labarta, Ernesto Bosch, Pilar Alamá, Carmen Rubio, Lorena Rodrigo, and Antonio Pellicer

Department of Human Reproduction, Instituto Valenciano de Infertilidad, University of Valencia, 46015, Valencia, Spain

Context: A high chromosomal abnormalities rate has been observed in human embryos derived from *in vitro* fertilization (IVF) treatments. The real incidence in natural cycles has been poorly studied, so whether this frequency may be induced by external factors, such as use of gonadotropins for ovarian stimulation, remains unknown.

Design: We conducted a prospective cohort study in a University-affiliated private infertility clinic with a comparison between unstimulated and stimulated ovarian cycles in the same women. Preimplantation genetic screening by fluorescence *in situ* hybridization was performed in all viable of 3 embryos.

Objective: The primary objective was to compare the incidence of embryo chromosomal abnormalities in an unstimulated cycle and in an ulterior moderate ovarian stimulated cycle. Secondary outcome measures were embryo quality, blastocyst rate of biopsied embryos, number of normal blastocysts per donor, type of chromosomal abnormalities, and clinical outcome.

Results: One hundred eighty-five oocyte donors were initially recruited for the unstimulated cycle, and preimplantation genetic screening could be performed in 51 of them, showing 35.3% of embryo chromosomal abnormalities. Forty-six of them later completed a stimulated cycle. The sperm donor sample was the same for both cycles. The proportion of embryos displaying abnormalities in the unstimulated cycle was 34.8% (16 of 46), whereas it was 40.6% (123 of 303) in the stimulated cycle with risk difference = 5.8 [95% confidence interval (CI) = -20.6-9.0], and relative risk = 1.17 (95% CI = 0.77-1.77) ($P = 0.45$). When an intrasubject comparison was made, the abnormalities rate was 34.8% (95% CI = 20.5-49.1) in the unstimulated cycle and 38.2% (95% CI = 30.5-45.8) in the stimulated cycle [risk difference = 3.4 (95% CI = -17.9-11.2); $P = 0.64$]. No differences were observed for embryo quality and type of chromosomal abnormalities.

Conclusions: Moderate ovarian stimulation in young normo-ovulatory women does not significantly increase the embryo aneuploidies rate in *in vitro* fertilization-derived human embryos as compared with an unstimulated cycle. Whether these results can be extrapolated to infertile patients is still unknown. (*J Clin Endocrinol Metab* 97: E1987-E1994, 2012)

In vitro fertilization (IVF) treatment is a routine method to overcome infertility in humans. Despite having been developed more than three decades ago, IVF efficacy in terms of the live birth rate per started cycle is still lower than desired (1). This is due, in part, to the low fecundity of our species but

can also be influenced by the potentially detrimental effects of the procedure, which has raised many questions in epidemiological studies on IVF babies (2, 3).

The low fecundity observed in humans, if compared with other mammalian species (4), could be due to embryo

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1944-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/er.2012-1738 Received March 21, 2012. Accepted July 5, 2012.
First Published Online August 3, 2012

Abbreviations: BMI, Body mass index; CI, confidence interval; COS, controlled ovarian stimulation; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IVF, *in vitro* fertilization; PGS, preimplantation genetic screening; rCG, recombinant chorionic gonadotropin.

chromosomal abnormalities, which may lead to preimplantation embryonic death, implantation failure, and spontaneous miscarriages (5). In fact, 32–64% of IVF-derived embryos have chromosomal errors and aneuploidies in young good-prognosis women (6, 7).

It is still unknown whether this high frequency of embryo aneuploidy reflects a true picture in early human conceptuses under natural conditions or whether it is induced by external factors, such as *in vitro* culture conditions (8, 9) or use of gonadotropins for controlled ovarian stimulation (COS) (10). Obtaining data from naturally *in vivo*-fertilized human embryos would be ethically and technically unfeasible, but dissecting the different IVF steps to search for potential negative influences is also of paramount importance to reassure and improve IVF outcome.

The influence of COS is of particular interest. There is a trend toward less aggressive protocols to avoid clinical complications and to also reduce chromosomal abnormalities (11). In animals, ovarian stimulation seems to affect embryo development (12, 13) and to increase the frequency of chromosomal abnormalities (14, 15). In humans, data on the direct effect of COS are scarce. However, it has been recently suggested that use of gonadotropins may raise the chromosomal abnormality rate in a dose-dependent manner (11).

To investigate the influence of ovarian stimulation on chromosomal abnormalities, we need to establish the basal status in humans by analyzing the natural cycle in fertile women. The closest approach to date is based on 11 embryos derived from unstimulated cycles, which indicates that a chromosome aneuploidy is present in 36.4% of embryos (16).

Given this background, the current study has a dual purpose: first, to ascertain the actual incidence of chromosomal abnormalities in young fertile women to define a reference rate for human embryos fertilized *in vitro* after an unstimulated cycle, and second, to investigate to what extent COS could increase the chromosomal abnormalities rate in human embryos.

Subjects and Methods

This prospective cohort study was carried out in a University-affiliated infertility clinic between September 2006 and March 2010. Approval was obtained from the Institutional Review Board and the Institution's Ethics Committee before starting the study. The www.clinicaltrials.gov registration number is NCT00707525.

Study population

The study was performed within our oocyte donation program in couples for whom a sperm donation was also required.

Therefore, only gametes from young subjects free of an infertility background were considered.

Inclusion criteria for both oocyte and sperm donors were aged between 18 and 34, had a normal physical examination, had no family history of hereditary or chromosomal diseases, tested negative in a screening for sexually transmitted diseases, and had a normal karyotype.

Specific inclusion criteria for oocyte donors were fertile (at least one child born and/or voluntary interrupted pregnancy), regular menstrual cycles (25–35 d); body mass index (BMI) between 18 and 25 kg/m², no previous ovarian stimulation treatments, normal basal serum FSH (<10 IU/liter) and estradiol (<50 pg/ml) levels. Exclusion criteria were endometriosis, polycystic ovary syndrome, and recurrent miscarriage (at least three previous clinical miscarriages).

Specific inclusion criteria for sperm donors were more than 90×10^6 total motile progressive sperm and more than 14% of normal forms in the ejaculate and having proved to be fertile in our artificial insemination program (17).

Inclusion criteria for gametes recipients were under 45 yr old, BMI below 30 kg/m², and no uterine or adnexa abnormalities assessed by vaginal ultrasound. Exclusion criteria were recurrent miscarriage, implantation failure, and organic or systemic diseases. All the donors and gametes recipients gave their written informed consent.

Study design

Procedures

Follicular phase. Oocyte donors underwent two IVF cycles: first, an unstimulated cycle without medical intervention, except for 250 µg recombinant choriogonadotropin (rCG) (Ovitrelle; Merck-Serono, Geneva, Switzerland) administered when the spontaneous preovulatory follicle reached 18 mm in diameter. Second, a stimulated cycle in which ovarian stimulation was carried out by following a GnRH agonist long protocol, with a combination of 150 IU recombinant FSH (Gonal F; Merck-Serono) and 75 IU highly purified human menopausal gonadotropin (Menopur; Ferring Pharmaceuticals, Copenhagen, Denmark). When six or more follicles were more than 17 mm in diameter, rCG was administered for triggering ovulation. Doses were adjusted according to the ovarian response, as judged by serum estradiol concentrations and ultrasound scans every 2–3 d.

In both cycles, ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval was scheduled 36 h after triggering ovulation. Serum estradiol and progesterone were determined on the day of rCG administration. In the unstimulated cycle, the LH was also measured.

Lab procedures. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was performed in all cases by following our routine practice in preimplantation genetic screening (PGS) cycles to avoid contamination by extraneous DNA and to increase the number of fertilized embryos and, therefore, the potential number of embryos available for testing. Fertilization was assessed 17–20 h afterward, and embryo cleavage was recorded every 24 h. Embryos were grown in IVF/CCM medium (1:1 ratio) (Vitrolife, Göteborg, Sweden) until d 3 and were subsequently cultured in CCM medium (Vitrolife) with a monolayer of endometrial epithelial cells until d 5 (18).

An embryo biopsy was performed on d 3 using a noncontact laser system (OCTAX, Herbronn, Germany). Only those embryos

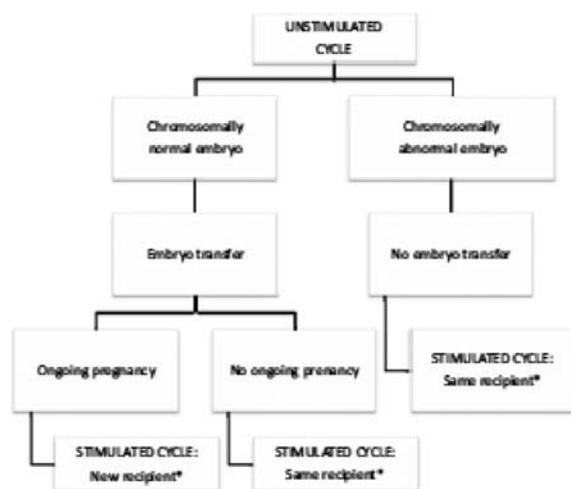


FIG. 1. Study protocol. Oocyte donors underwent an unstimulated cycle and a subsequent stimulated cycle. *, Donated oocytes were always inseminated with the same sperm sample in a given couple of recipients.

with at least five nucleated blastomeres of a similar size and a fragmentation degree of less than 20% were biopsied. (Fragmentation is a parameter related to embryo quality. It refers to the percentage of the total volume of the embryo with fragments resulting from the degeneration of one or more blastomeres.) A single blastomere was removed and a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis was performed for nine chromosomes in two consecutive hybridization rounds: first, MultiVysion PB panel for chromosomes 13, 16, 18, 21, and 22, and second, MultiVysion 4 Color Custom panel for chromosomes 15, 17, X, and Y (Vysis, Inc. Downers Grove, IL). Additional hybridization rounds for these chromosomes, using probes that bind to different loci, were conducted to rescue the nonconclusive results and to confirm certain aneuploidies, as previously described (19). Thirty-six randomly selected embryos, diagnosed as chromosomally abnormal on d 3, were reanalyzed on d 5 to validate their diagnosis.

Protocol

If the sole embryo from the unstimulated cycle was chromosomally normal, then an embryo transfer was performed. If ongoing pregnancy was accomplished, the embryos obtained in the stimulated cycle were donated to a new recipient. If after the first embryo transfer no ongoing pregnancy was achieved, the same recipient received embryos from the stimulated cycle (Fig. 1).

If the embryo resulting from the unstimulated cycle was abnormal, the transfer was cancelled and the donor was submitted to the stimulated cycle. A maximum of two embryos were then transferred to the recipient. In all cases, the sperm donor was the same for both cycles to rule out male influence.

The time frame between both cycles was a maximum of 3 months. All the oocyte recipients received hormonal replacement therapy, as described elsewhere (20).

Statistical analysis

Outcome measures

The primary objective was to compare the proportion of embryos with chromosomal abnormalities resulting from an unstimulated IVF cycle to those obtained after ovarian stimulation in the same woman. Secondary outcomes were embryo quality in the cleavage stage (in terms of number of cells and fragmentation rate), blastocyst rate (of the biopsied embryos), number of normal blastocysts per donor, type of chromosomal abnormalities, and clinical outcome.

Sample size

Sample size was calculated to detect a difference of 22% in the aneuploidy incidence between both groups (from 33% in the unstimulated cycle to 55% after stimulation) in a two-sided test, with a statistical power of 80% (error $\beta = 0.2$) and a confidence level of 95% (error $\alpha = 0.05$), by estimating an average of six embryos analyzed per stimulated cycle. This difference was expected according to not only the previously described aneuploid embryo incidences in oocyte donors under stimulated cycles (21, 22) but also the accepted normal embryos rate in fertile couples (23).

According to these criteria, 45 subjects were required for a comparison between both cycles in the same woman. A 15% dropout rate among the women who completed the unstimulated cycle and the stimulated cycle was considered. Therefore, women were recruited for the unstimulated cycle until 51 completed it.

Statistical methods

Student's *t* tests and χ^2 were employed for the continuous and categorical quantitative variables, respectively, for comparisons to be made between both groups. A relative risk with its 95% confidence interval (CI) was calculated for all the comparisons between the categorical variables. For the nonparametric analysis, a Mann-Whitney *U* test was used. For the intrasubject comparison of the chromosomally abnormal embryos rate between both cycle types, a paired-samples *t* test was done.

Results

A summary of all the started cycles is shown in Fig. 2. A total of 185 eligible donors were enrolled. Sixty-four were excluded before oocyte retrieval because of premature ovulation ($n = 37$), anovulatory cycle ($n = 17$), or self-cancellation ($n = 10$). Therefore, 121 oocyte retrievals were planned (65.4%). Of these, an oocyte was obtained in 99 (81.8%), of whom 89 were metaphase II (89.9%). Fertilization occurred in 57 of them (64.0%). Finally, 51 of the 57 resulting embryos fulfilled all the criteria to be

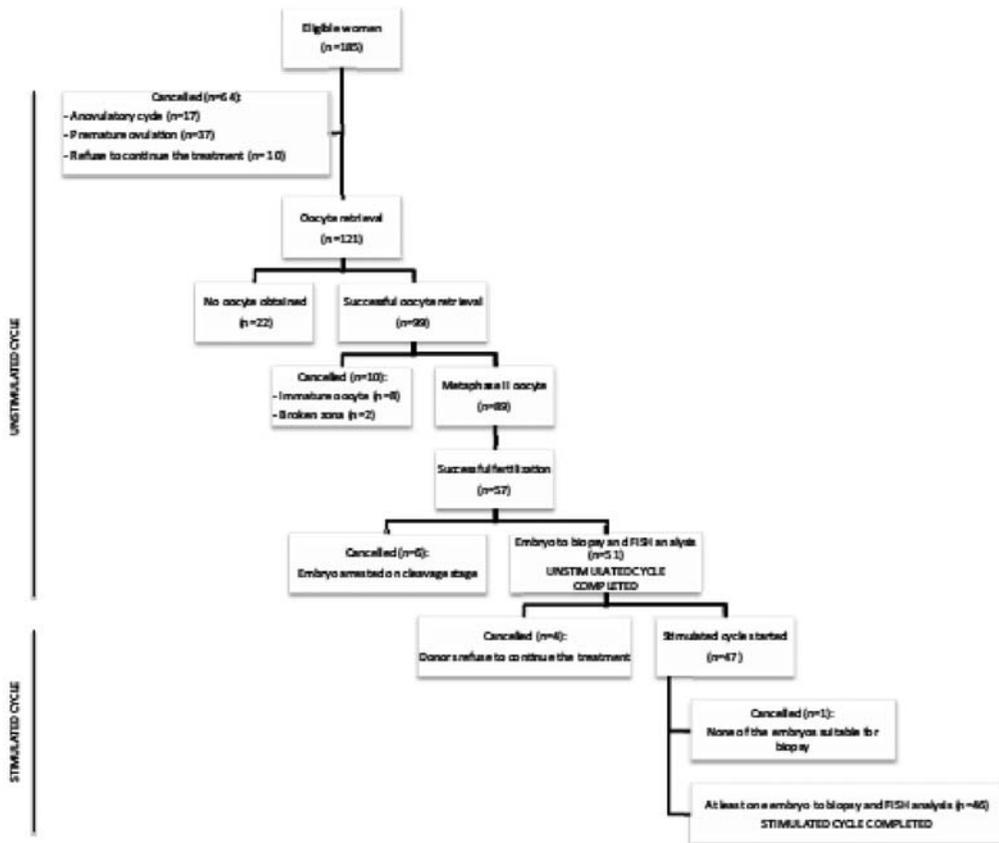


FIG. 2. Flow chart of study population.

analyzed on d 3 of development. Of these 51 donors, 47 continued with the stimulated cycle, whereas four were cancelled because they refused to continue treatment. In one cycle with the 47 stimulated ones, none of the embryos was suitable for biopsy. In summary, 51 donors completed the unstimulated cycle, whereas 46 of them also completed the stimulated cycle. A completed protocol was considered when at least one embryo was suitable for biopsy, and PGS-FISH was performed in both cycles.

The mean age of the oocyte donors who completed the study was 25.4 ± 4.0 yr. Their BMI was 22.5 ± 2.8 kg/m², and their basal FSH levels were 6.1 ± 2.1 IU/liter. The average age of the recipients population was 39.7 ± 3.5 yr, with a BMI of 25.6 ± 4.1 kg/m².

The follicular phase and embryo development parameters of the completed cycles are outlined in Table 1. Although all 51 embryos from the unstimulated cycles were informative after the embryo biopsy, four of the 307 embryos from 46

stimulated cycles were not. Informative embryos were defined as embryos with a conclusive result after the FISH analysis. When the blastomere had two signals for all the analyzed chromosomes, the embryo was classified as normal with a conclusive result. However, an aneuploid embryo is when an abnormal number of signals for at least one analyzed chromosome is observed despite lack of information for another chromosome.

The proportion of embryo chromosomal abnormalities in the whole sample of 51 unstimulated cycles was 35.3% (18 of 51). In the group of 46 women who completed both cycles, this proportion was 34.8% (16 of 46), whereas it was 40.6% (123 of 303) in the stimulated cycle [risk difference = 5.8 (95% CI = -20.6–9.0), relative risk = 1.17 (0.77–1.77); $P = 0.45$]. No differences were observed between both cycles in embryo quality terms (Table 2).

When an intrasubject comparison was made, the abnormalities rate was 34.8% (95% CI = 20.5–49.1) in the

TABLE 1. Follicular phase and embryo development parameters of the 51 unstimulated cycles and the 46 stimulated cycles in which PGS-FISH was successfully performed

Parameter	Result
Unstimulated cycle (n = 51)	
Estradiol serum levels on rCG day (pg/ml)	190.5 ± 76.5
Progesterone serum levels on rCG day (ng/ml)	1.1 ± 4.9
LH serum levels on rCG day (IU/liter)	10.54 ± 8.1
No. of oocytes obtained	99 (81.8% per oocyte retrieval)
No. of oocytes metaphase II obtained	89 (89.9% of the oocytes obtained)
No. of fertilized oocytes	57 (64% of the metaphase II oocytes)
No. of embryos arrested on cleavage stage	6
No. of biopsied embryos	51
No. of informative embryos ^a	51
Stimulated cycle (n = 46)	
Length of stimulation (d)	10.1 ± 2.3
Total gonadotropin dose (IU)	2230 ± 670
Estradiol serum levels on rCG day (pg/ml)	2707 ± 1135
Progesterone serum levels on rCG day (ng/ml)	0.8 ± 0.4
No. of oocytes obtained	820 (17.8 ± 7.7)
No. of oocytes metaphase II	618 (13.4 ± 6.2)
No. of fertilized oocytes	469 (10.2 ± 4.8)
No. of embryos arrested on cleavage stage	162
No. of biopsied embryos	307
No. of informative embryos ^a	303

Plus-minus values are mean ± SD.

^a Informative embryos were defined as embryos with a conclusive result after the FISH analysis. A conclusive result for a normal embryo is two signals for all analyzed chromosomes. A conclusive result for an abnormal embryo is an abnormal number of signals for at least one analyzed chromosome despite the absence of information for another chromosome.

unstimulated cycle and 38.2% (95% CI = 30.5–45.8) in the stimulated cycle [risk difference = 3.4 (95% CI = -17.9–11.2) ($P = 0.64$).

If the embryo from the unstimulated cycle was abnormal, the aneuploidy rate in the stimulated cycle was 45.2%, whereas it was 35.2% if the embryo from the unstimulated cycle was euploid ($P = 0.2$).

The mean number of euploid embryos per woman was 3.9 (95% CI = 3.2–4.6) in the stimulated cycle, with a mean of cryopreserved embryos of 1.8 ± 2.2 .

The distribution of chromosomal abnormalities was similar in both the unstimulated and the stimulated cycles ($P =$

0.87) and showed mainly monosomies (10 of 16 vs. 68 of 123), followed by trisomies (two of 16 vs. 30 of 123) and haploid embryos (three of 16 vs. five of 123), respectively. Moreover, there were no differences between both groups regarding the type of chromosome involved, as shown in Fig. 3.

The d 5 reanalysis by FISH of a sample of 36 embryos diagnosed as abnormal on d 3 produced a confirmation rate of 91.7%. An average of 32.9 ± 21.9 cells were studied per blastocyst. In the unstimulated cycle, we reanalyzed seven of the 18 chromosomally abnormal embryos with a confirmation rate of 100%. In the stimulated cycle, we reanalyzed 29 abnormal embryos and found three cases with false-positive diagnoses.

In the remaining 33 confirmed cases, 10 blastocysts were diagnosed as homogeneously aneuploid (>80% cells with the same abnormality) and 23 as abnormal mosaics (at least two cell lines, each with $\geq 20\%$ of cells).

The means of the embryos transferred were significantly higher in the stimulated cycles (1.7 ± 0.6 vs. 0.7 ± 0.5 ; $P < 0.001$). Accordingly, the implantation rate (number of gestational sacs per embryos transferred) was the only reliable parameter to compare the outcome between both cycles. The implantation rate was 39.3 (11 of 28) vs. 32.5% (26 of 80) in the unstimulated vs. the stimulated cycles ($P = 0.68$). Each group included one biochemical and one ectopic pregnancy. The miscarriage rate was 33.3% (four of 12) vs. 13.3% (four of 30), respectively ($P = 0.297$). Live births per completed cycle were six of 46 (13%) in the unstimulated cycle and 21 of 46 (45.7%) in the stimulated one ($P = 0.001$).

Discussion

The current study shows that moderate ovarian stimulation does not significantly increase the chromosomally abnormal embryos rate obtained after IVF in a population of young women with no background of infertility or ovulation induction treatments. These findings are supported by previous data showing that the incidence of aneuploidies in aborted fetuses from pregnancies conceived with FSH stimulation did not increase when compared with spontaneous conceptions in infertile patients (24, 25). Nevertheless, we cannot rule out the possibility of minor increases in the chromosomal abnormality rate in stimulated vs. unstimulated cycles because our study sample size was calculated to detect a 22% difference between both cycles. A much higher sample of patients would be needed to detect smaller differences.

The impact of ovarian stimulation on embryo quality, and furthermore on the chromosomal constitution of the

TABLE 2. Results of the PGS of 46 donors who fulfilled both the unstimulated and ovarian stimulated cycles

	Unstimulated cycle	Stimulated cycle	Relative risk (95% CI)	P value
No. of biopsied embryos	46	307		
No. of informative embryos	46	303		
Blastomeres on d 3 (mean \pm sd)	7.4 \pm 1.4	7.9 \pm 0.9		0.07
Fragmentation on d 3 (mean \pm sd)	7.4 \pm 6.2	9.1 \pm 4.7		0.13
No. of chromosomally abnormal embryos/informative embryos [n (%)]	16/46 (34.8%) (95% CI = 22.7–49.2)	123/303 (40.6%) (95% CI = 35.2–46.2)	1.17 (0.77–1.77)	0.45
Mean chromosomally abnormal embryos rate per subject ² (%)	34.8 (95% CI = 20.5–49.1)	38.2 (95% CI = 30.5–45.8)		0.64
No. of blastocysts on d 5/biopsied embryo [n (%)]	31/46 (67.4%) (95% CI = 53.0–79.1)	238/307 (77.5%) (95% CI = 72.5–81.8)	1.15 (0.93–1.42)	0.13

Data are presented as mean \pm SD or n (percent). P value <0.05 is considered statistically significant.

² Paired-samples t test.

embryo, has been a matter of concern for many years. Some authors have reported a greater risk of major birth defects in ICSI and IVF cycles, (2, 3), suggesting that the medication used to induce ovulation, among other factors, could explain these findings. This was supported by the study of Baart *et al.* (11), which found a positive relationship between doses of gonadotropins and the chromosomal abnormalities rate. However, these studies were based on IVF-derived embryos from infertile patients after ovarian stimulation treatment, and no information for preimplantation embryos derived from natural conception is available for comparison.

Our study has overcome these difficulties using a novel model, which includes a comparison between the embryos from both the unstimulated and stimulated cycles in the same population, thus avoiding interpatient variability biases. In addition, because our study population was free of several confounding factors, such as maternal age, infertility, or severe male factors, we could analyze the net impact of gonadotropins on embryos.

The complex design of our study first enabled us to evaluate the chromosomal status of the human embryo in the absence of ovarian stimulation. We observed that embryo

aneuploidies were still present even under this condition because approximately one of the three embryos was seen to be chromosomally abnormal. This is in good agreement with a shorter study that found an aneuploidy rate of 36.4% in 11 unstimulated cycles (16). The unstimulated IVF could be considered the closest scenario to the natural cycle, although we cannot rule out the potential impact of other factors, such as laboratory conditions (26), the use of rCG for triggering ovulation, or even the use of ICSI (27). Although we acknowledge these limitations, we included the largest series by exploring the basal human embryo chromosomal status without the use of ovarian stimulation.

It is worth noting the low efficacy of the natural cycle observed in our study because 175 women (10 of 185 refused to continue) had to be recruited to complete 51 unstimulated cycles.

Although natural IVF cycles are considered patient-friendly with low-risk protocols, their efficacy is hampered because of the high cancellation rates (28), thus reinforcing the need for ovarian stimulation to induce the development of several mature oocytes to improve chances of pregnancy in IVF treatments. Some reports have suggested the use of the natural cycle in poor-prognosis patients, mainly older women or low responders to COS (29). Our results suggest that chromosomal abnormalities are also present in the absence of stimulation with gonadotropins. Therefore, the use of a natural cycle in these patients is expected to give a poor outcome, which is in agreement with the higher aneuploidy rate observed in spontaneous pregnancies in older women (30).

The analysis of human gametes has revealed that an embryo aneuploidy is primarily caused by an error-prone meiotic chromosome segregation mechanism in oocytes. If ovarian stimulation can exert any deleterious effect on the embryo, this may be because it induces meiotic errors on the oocyte, but not mitotic errors after fertilization, which commonly lead to mosaicism (31). The two well-known mechanisms for meiotic errors are nondisjunction and pre-

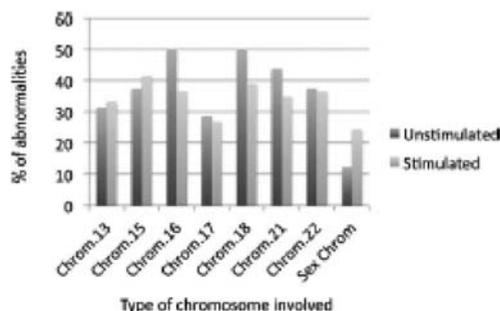


FIG. 3. Type of chromosome involved in the aneuploid embryos group. No statistically significant differences ($P > 0.05$) were observed in any of the analyzed chromosomes between the unstimulated and the stimulated cycle. Chrom., Chromosome.

mature separation of sister chromatids (32), and they usually result in a uniformly aneuploid embryo (monosomic, trisomic, haploid, or polyploidy); hence, they are expressed in both the d 3 PGS analysis and the d 5 reanalysis.

In the current study, a single cell was biopsied per embryo on d 3. Although this could lead to misdiagnosis in cases with mosaicism, we observed an overall cytogenetic confirmation rate of 91.7%, which is in agreement with our previously obtained data (19). This low error rate cannot radically affect the results and conclusions of the present study. Moreover, all the d 5 mosaic embryos observed in our study after reanalysis had all cell lines aneuploid; thus, they would have been discarded after the d 3 diagnosis. In any case, according to the data hereby shown, ovarian stimulation might not affect the incidence of mosaicism. Therefore, it can be assumed that the cases of mosaicism would be equally distributed in both unstimulated and stimulated cycles.

In our study, arrested embryos were not analyzed because only developmentally good embryos were, which follows the well-established criteria in PGS-FISH cycles by considering that only evolutive embryos can implant, and therefore, the aneuploidy risk in offspring would be related only to embryos that could reach the blastocyst stage and implant.

In line with this, 89.5 and 65.5% of embryos were biopsied in the unstimulated cycle and the stimulated cycle, respectively. Our biopsied embryos rate in the stimulated cycles is in agreement with that observed in the study of Baart *et al.* (11) (67.8%), which followed similar criteria to ours. Moreover, our rate of informative results per fertilized embryo was 64.6%, whereas it was 58.7% in the study of Baart *et al.* (11).

One of the limitations of our study is that the technique used to analyze embryos was FISH. This was because it was the most accurate technique for this purpose when the study was designed. Recently, we introduced the array comparative genomic hybridization system into our PGS program to allow the analysis of all the chromosomes. Nevertheless, the confirmation rate we obtained with the FISH procedure was about 95% according to our results of the reanalysis of single blastomeres on d 4 using array comparative genomic hybridization (19). Moreover, it has been reported that for chromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X, and Y, FISH should identify 80% of the most common chromosomal anomalies in spontaneous abortions samples (33). Therefore, by bearing in mind the risk of aneuploidy offspring, all the chromosomes were covered by the FISH technique.

The chromosomal abnormality rate in our population after COS was lower than that previously described in oocyte donors (57.0%) (21, 22). In those studies, the num-

ber of embryos biopsied per cycle was higher (14.6 *vs.* 6.7 in our study) because more aggressive stimulation protocols were used. This difference in results suggests that higher doses of gonadotropins (in comparison with those used in our study) may increase the percentage of aneuploidies. Nevertheless, the basic fact is that the total number of euploid embryos is more relevant than the percentage of abnormalities. The advantage of the stimulated cycle is that a mean number of four euploid embryos was obtained in comparison with the unstimulated cycle, which offers a maximum of one euploid embryo. Although the implantation rate was absolutely comparable between both cycles, the difference in the total number of euploid embryos available for transfer explains the higher cumulative pregnancy rates observed in egg donation stimulated cycles. Finally, the live births rate was significantly higher in the stimulated cycle as more embryos were transferred per cycle, whereas an unexpected yet not statistically significantly higher miscarriage rate was observed in the unstimulated cycle. However, we should not draw conclusions because sample size was not calculated for this purpose.

In conclusion, the results of this study reveal that embryo chromosomal abnormalities are present even under ovarian physiological conditions, which may explain the relatively low fertility of the human species. The use of moderate doses of gonadotropins for ovarian stimulation during an IVF cycle does not significantly increase the abnormalities rate in young normo-ovulatory women. Whether these results can be applied to infertile patients is still unknown.

Acknowledgments

We thank the clinicians, IVF embryologist, and technicians for their cooperation in this study. Special thanks go to the staff involved in our oocyte and sperm donation program and also to all the PGD team of IVI-Valencia, specially to Amparo Mercader, Pilar Buendía, and Arantxa Delgado, the embryologists who performed the embryo biopsy, blastomere fixation, and d-5 embryo fixation.

Address all correspondence and requests for reprints to: Elena Labarta, Plaza de la Policía Local 3, 46015 Valencia, Spain. E-mail: elena.labarta@ivi.es.

Financial support for this study was provided by an unrestricted grant from Merck-Serono, Geneva, Switzerland.

E.L. is the principal investigator of the study. She was involved with designing the study, participated in subject recruitment and care during the medical treatment, did the data analysis and interpretation, and wrote the manuscript. E.B. participated in the study design, patients recruitment, and statistical analysis and assisted with manuscript writing. P.A. participated in donors recruitment and care during the medical treatment. C.R. partic-

parted in the analysis of FISH signals on blastomeres and reanalysis of d-5 embryos and reviewed the final version of the manuscript. L.R. participated in the analysis of FISH signals on blastomeres and reanalysis of d-5 embryos. A.P. designed the study and reviewed multiple versions of the manuscript.

Disclosure Summary: We declare that we have no conflicts of interest.

References

- Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson GD, de Mouzon J 2011 International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2003. *Fertil Steril* 95:2209–2222, 2222.e1–e17
- Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S 2002 The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 346:725–730
- Olson CK, Keppler-Noreuil KM, Romitti PA, Budelier WT, Ryan G, Sparks AE, Van Voorhis BJ 2005 In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects. *Fertil Steril* 84:1308–1315
- Wells D, Delhanty JD 2000 Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 6:1055–1062
- Plachot M, Veiga A, Montagut J, de Grouchy J, Calderon G, Lepretre S, Junca AM, Santalo J, Carles E, Mandelbaum J, et al 1988 Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum Reprod* 3:627–635
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D 2006 Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 21:223–233
- Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC 2009 A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the “good prognosis” patient. *Fertil Steril* 91:1731–1738
- Almeida PA, Bolton VN 1995 The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 3:357–365
- Beyer CE, Osiianlis T, Boekel K, Osborne E, Rombauts L, Catt J, Kralovski V, Aali BS, Gras I 2009 Preimplantation genetic screening outcomes are associated with culture conditions. *Hum Reprod* 24:1212–1220
- Munne S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, Tucker M, Cohen J, Gianaroli L 1997 Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 12:780–784
- Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, Macklon NS, Fauser BC 2007 Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 22:980–988
- Van der Auwera I, D’Hooghe T 2001 Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 16:1237–1243
- Lee ST, Kim TM, Cho MY, Moon SY, Han JY, Lim JM 2005 Development of a hamster superovulation program and adverse effects of gonadotropins on microfilament formation during oocyte development. *Fertil Steril* 83:1264–1274
- Vogel R, Spielmann H 1992 Genotoxic and embryotoxic effects of gonadotropin-hyperstimulated ovulation of murine oocytes, preimplantation embryos, and term fetuses. *Reprod Toxicol* 6:329–333
- Roberts R, Iatropoulou A, Gantar D, Stark J, Becker DL, Franks S, Hardy K 2005 Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 72:107–118
- Verpoest W, Fauser BC, Papanikolaou E, Staessen C, Van Landuyt L, Donoso P, Tournaye H, Liebaers I, Devroey P 2008 Chromosomal aneuploidy in embryos conceived with unstimulated cycle IVF. *Hum Reprod* 23:2369–2371
- Garrido N, Zuzuarregui JL, Meseguer M, Simón C, Remohí J, Pellicer A 2002 Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates. *Hum Reprod* 17:3142–3148
- Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohí J, Pellicer A, Simón C 2003 Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril* 80:1162–1168
- Már P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Pellicer A, Remohí J, Rubio C 2010 Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 25:1812–1817
- Remohí J, Gutiérrez A, Cano F, Ruiz A, Simón C, Pellicer A 1995 Long oestradiol replacement in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 10:1387–1391
- Reis Soares S, Rubio C, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A 2003 High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 80:656–657
- Munnè S, Ary J, Zouves C, Escudero R, Barnes F, Cinioglu C, Ary B, Cohen J 2006 Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online* 12:340–346
- Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Gil-Salom M, Rubio C 2010 Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil Steril* 94:1380–1386
- Martínez MC, Méndez C, Ferro J, Nicolás M, Serra V, Landeras J 2010 Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. *Fertil Steril* 93:289–292
- Conway DA, Patel SS, Liem J, Fan KJ, Jalian R, Williams J 3rd, Pisarska MD 2011 The risk of cytogenetic abnormalities in the late first trimester of pregnancies conceived through assisted reproduction. *Fertil Steril* 95:503–506
- Nelissen EC, Van Montfoort AP, Coonen E, Derhaag JG, Geraedts JP, Smits LJ, Land JA, Evers JL, Dumoulin JC 2012 Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 27:1966–1976
- Davies MJ, Moore VM, Wilson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, Haan EA, Chan A 2012 Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 366:1803–1813
- Pelínck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ 2002 Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Hum Reprod Update* 8:129–139
- Schimberni M, Morgia F, Colabianchi J, Giallonardo A, Piscitelli C, Giannini P, Montigiani M, Sbracia M 2009 Natural-cycle in vitro fertilization in poor responder patients: a survey of 500 consecutive cycles. *Fertil Steril* 92:1297–1301
- Thum MY, Abdalla HI, Taylor D 2008 Relationship between women’s age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 90:315–321
- Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Ben-Yosef D 2008 Elucidating the origin of chromosomal aberrations in IVF embryos by preimplantation genetic analysis. *Mol Cell Endocrinol* 282:112–119
- Pellestor F, André B, Arnal F, Humesau C, Demaille J 2002 Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17:2134–2145
- Lathi RB, Westphal LM, Milki AA 2008 Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 89:353–357