



Efecto de la vitrificación en la incidencia de
aneuploidías en los resultados clínicos del
programa de Diagnóstico Genético
Preimplantacional

Pilar Buendía Segura

Lda. en Ciencias Biológicas

Dirigida por:

Dra. Carmen Rubio Lluesa
Dra. Ana Cristina Cobo Cabal
Dr. Ernesto Bosch Aparicio



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA (QZ)

Facultat de Ciències Biològiques

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA

Programa de doctorado: Neurociencias Básicas y Aplicadas

EFFECTO DE LA VITRIFICACIÓN EN LA INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS EN LOS
RESULTADOS CLÍNICOS DEL PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO
PREIMPLANTACIONAL

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

D^a Pilar Buendía Segura

Valencia 2015

Dirigida por:

Dra. Carmen Rubio Lluesa

Dra. Ana Cristina Cobo Cabal

Dr. Ernesto Bosch Aparicio

Tutor: Francisco Pérez-Sánchez

Dra. Dña. Carmen Rubio Lluesa, Doctora en Biología por la Universitat de València y Directora de la Unidad de Diagnóstico Genético Preimplantacional de Igenómix.

Dra. Dña. Ana Cristina Cobo Cabal, Doctora en Biología por la Universitat de València y Directora del Laboratorio de Criopreservación del Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia.

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

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado:

EFFECTO DE LA VITRIFICACIÓN EN LA INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS EN LOS RESULTADOS CLÍNICOS DEL PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

Ha sido realizado íntegramente por Dña. Pilar Buendía Segura bajo nuestra dirección 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, se expide la presente certificación, en Valencia a 20 de octubre de 2015.

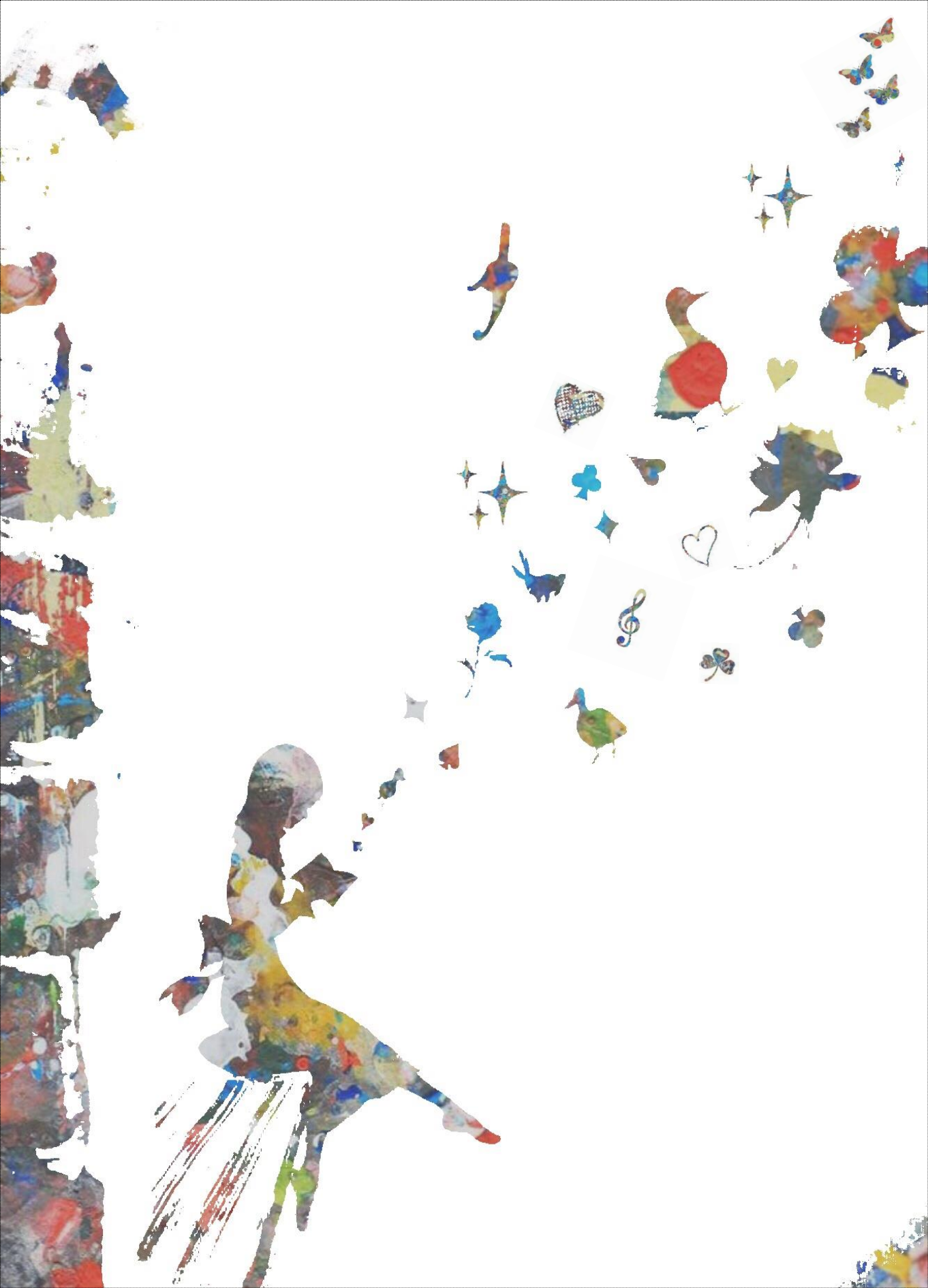
Fdo. Carmen Rubio

Fdo. Ana Cristina Cobo

Fdo. Ernesto Bosch

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad, IVI Valencia, y en las instalaciones de Igenomix







*La mente que se abre a una nueva idea jamás
volverá a su tamaño original*

Albert Einstein

A Guillem

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.- El diagnóstico genético preimplantacional	3
1.1.1.- Antecedentes	3
1.1.2.- Indicaciones del PGS	4
1.1.3.- Controversias y limitaciones del PGS	10
1.2.- Baja respuesta ovárica	14
1.2.1.- Definición y causas	15
1.2.2.- Pautas de tratamiento	17
1.2.3.- Limitaciones de la baja respuesta en un ciclo de PGS	20
1.3.- La criopreservación en el laboratorio de fecundación <i>in vitro</i>	21
1.3.1.- Técnicas de criopreservación	22
1.3.2.- Estrategias de vitrificación: Ovocitos, embriones y blastocistos	25
1.3.3.- Vitrificación de ovocitos en pacientes con baja respuesta	30
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. OBJETIVOS	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1.- Diseño del estudio	45
4.1.1.- Pacientes	45
4.1.2.- Indicaciones	45
4.1.3.- Estrategias	45
4.2.- Base de datos y análisis estadístico	46

4.3.- Cronología de un ciclo de PGS con biopsia embrionaria en D3 de desarrollo	48
4.4.- Estimulación ovárica, fecundación in vitro y cultivo embrionario	49
4.5.- Vitrificación y desvitrificación de ovocitos y embriones	51
4.5.1.- Materiales	51
4.5.2.- Soluciones	51
4.5.3.- Protocolos	52
4.6.- Biopsia embrionaria	54
4.6.1.- Materiales y equipamiento	54
4.6.2.- Medios y soluciones	55
4.6.3.- Protocolo biopsia embrionaria en D3	55
4.7.- Análisis cromosómico mediante arrays de CGH	56
4.7.1.- Materiales y equipamiento	56
4.7.2.- Medios y soluciones	57
4.7.3.- Protocolo	57
05 RESULTADOS	63
5.1.- Resultados comparados de ciclos de PGS con sólo ovocitos frescos y ciclos con ovocitos sólo de origen vitrificado	67
5.1.1.- Resultados descriptivos de las pacientes y de la estimulación	67
5.1.2.- Datos de desarrollo embrionario de ciclos de PGS	68
5.1.3.- Resultados del análisis cromosómico	69
5.1.4.- Descripción de las anomalías cromosómicas individuales	71
5.1.5.- Resultados clínicos de ciclos de PGS	74

5.1.6.- Evaluación y estudio de la probabilidad de obtener al menos un blastocisto euploide y gestación evolutiva en función del origen de los ovocitos	75
5.2.- Resultados comparados de ciclos de PGS de ovocitos de origen mixto	76
5.2.1- Resultados descriptivos de las pacientes y de la estimulación	76
5.2.2.- Datos de desarrollo embrionario de ciclos de PGS	77
5.2.3.- Resultados del análisis cromosómico	78
5.2.4.- Descripción de las anomalías cromosómicas individuales	80
5.2.5.- Resultados clínicos de ciclos de PGS	82
5.3.- Estimación del número mínimo de ciclos de vitrificación necesarios en las pacientes con baja respuesta para encontrar el primer blastocisto euploide	83
6 DISCUSIÓN	87
6.1- Efecto de la vitrificación en la tasa de supervivencia	90
6.2- Efecto de la vitrificación en la tasa de fecundación	91
6.3- Efecto de la vitrificación en el desarrollo embrionario	91
6.4.-Efecto de la vitrificación en la incidencia de aneuploidías	92
6.5.- Impacto clínico de la vitrificación	96
6.6.- Relación coste-beneficio	98
6.7.- Número de estimulaciones	99
7 CONCLUSIONES	103
08 BIBLIOGRAFÍA	107
AGRADECIMIENTOS	126

01

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético preimplantacional

1.1

1.1.1.- Antecedentes

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) permite conocer el contenido genético y cromosómico de los embriones antes de ser transferidos al útero materno, sin afectar negativamente a su desarrollo o capacidad de implantación (Hardy *et al.*, 1990). Ha resultado de gran utilidad en parejas con elevado riesgo de transmisión de enfermedades monogénicas a la descendencia y para descartar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, evitando la aplicación de interrupciones voluntarias del embarazo. A finales de los '90, esta tecnología empezó a aplicarse también como una herramienta adicional para la selección de embriones euploides en varios grupos de pacientes, consideradas como de "mal pronóstico" dentro de los centros de reproducción asistida. En estos casos se ha denominado *cribado genético preimplantacional* (PGS, del inglés *Preimplantational Genetic Screening*). El PGS puede realizarse en diferentes estadios: tras biopsia de los corpúsculos polares, biopsia embrionaria de una célula en día 3 de desarrollo o biopsia en el estadio de blastocisto con la obtención de varias células del trofoectodermo en día 5 o 6 de desarrollo. Tras la biopsia se aplican técnicas de biología molecular o de citogenética en función del tipo de alteración que interesa evaluar. En los últimos 20 años, la tecnología utilizada para el estudio cromosómico ha cambiado a medida que se desarrollaban nuevas técnicas moleculares; mientras que en 1995 la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se aplicaba principalmente en blastómeras y permitía el análisis de un número limitado de cromosomas, desde 2008 se comenzaron a aplicar los arrays de hibridación genómica comparada (CGH, del inglés *Comparative Genomic Hybridization*), generalizándose su uso en los tres últimos años, y han permitido el análisis de los 24 cromosomas, no sólo en célula única sino también en biopsia de trofoectodermo. Otras plataformas de análisis como las de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) y qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) se han aplicado con éxito también en PGS en los últimos años (Handyside, 2013).

Las aneuploidías son alteraciones cromosómicas comunes en los embriones humanos (Harper *et al.*, 1995; Munne y Cohen, 1998) Las trisomías y las monosomías representan al menos un 10% de las gestaciones humanas, y en mujeres cercanas al final de su vida reproductiva puede superar el 50% (Nagaoka *et al.*, 2012). De hecho, la tasa de aneuploidías en los ovocitos y en los embriones es más elevada en mujeres de edad avanzada (Hassold *et al.*, 1980), probablemente por defectos en la recombinación meiótica debidos a la edad (Lamb *et al.*, 1996). Estos defectos ligados

a la edad resultan en una mayor incidencia de aneuploidías en la descendencia, en un incremento de abortos espontáneos y por tanto en una reducción de las tasas de implantación. La presencia de aneuploidías también puede influir en otras parejas infértiles. Por ejemplo, se ha descrito como una de las causas más frecuente de abortos en parejas con aborto recurrente (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2012). En parejas con fallo repetido de implantación el diagnóstico sigue siendo un desafío clínico ya que sus causas pueden ser múltiples, contribuyendo tanto el factor embrionario como endometrial, se ha propuesto la presencia de aneuploidías como una de las principales causas (Margalioth *et al.*, 2006). En parejas infértiles con un factor masculino asociado, se ha descrito una mayor incidencia de abortos con alteraciones cromosómicas de gestaciones conseguidas tras inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Kim *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha descrito una mayor incidencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides de varones infértiles debido a errores durante la meiosis (Rodrigo *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2001), lo que podría explicar estos resultados. Así, estudios citogenético-moleculares de restos fetales abortivos muestran que el 40,6% de las gestaciones espontáneas presentan alteraciones cromosómicas. Esta incidencia se incrementa al 62,7% en gestaciones conseguidas tras tratamientos de reproducción asistida en pacientes infértiles con el uso de ovocitos propios, y alcanza el 75,0% cuando existe además un factor masculino asociado (Campos-Galindo *et al.*, 2015).

1.1.2.- Indicaciones del PGS

El PGS se ha indicado principalmente en mujeres de edad avanzada (≥ 38 años), en casos de fallo repetido de implantación tras fecundación *in vitro* (FIV) (≥ 3 fallos previos), en parejas con aborto recurrente de causa desconocida (≥ 2 abortos previos), en casos de infertilidad masculina severa con bajo recuento espermático, con anomalías meióticas o con incremento de anomalías cromosómicas en los espermatozoides, y en parejas con gestaciones previas con cromosopatía.

Las dos primeras indicaciones han sido motivo de gran controversia tras la publicación de varios estudios prospectivos randomizados, sobre todo en el grupo de edad materna avanzada (Mastenbroek *et al.*, 2011). Por otra parte, estos estudios han sido ampliamente cuestionados debido a los criterios de inclusión y a la metodología empleada, sobre todo a la técnica de biopsia embrionaria y al análisis cromosómico realizado (Cohen *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2009; Mir *et al.*, 2010; Simpson, 2008; Munne *et al.*, 2010; Beyer *et al.*, 2009). Sin embargo, cada vez están apareciendo más estudios prospectivos randomizados que parecen indicar que utilizando la tecnología

adecuada el PGS puede ser de utilidad para diferentes indicaciones (Rubio *et al.* 2013), aCGH (Yang *et al.*, 2012) o qPCR (Forman *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013).

- Edad materna avanzada

Las pacientes de edad avanzada presentan una alta incidencia de aneuploidías ovocitarias que implica un riesgo mayor de aneuploidías en la descendencia, en concreto para los cromosomas 13, 18 y 21 (Hook *et al.*, 1988), y de abortos espontáneos (Creasy *et al.*, 1976; Fritz *et al.*, 2001). Algunos autores han propuesto la selección de embriones euploides para mejorar las tasas de implantación, reducir la tasa de aborto y evitar el riesgo de descendencia afecta por cromosopatías (Gianaroli *et al.*, 1999; Kahraman *et al.*, 2000; Munne *et al.*, 2003). A pesar de que la mayoría de los estudios prospectivos randomizados publicados en edad materna avanzada utilizando la técnica de FISH en el análisis de los embriones no encontraron mejora en la tasa de gestación evolutiva o recién nacido vivo tras PGS (Staessen *et al.*, 2004; Mastenbroek *et al.*, 2007; Hardarson *et al.*, 2008; Debrock *et al.*, 2010), otros encontraron mejora con PGS sólo en la tasa de implantación o de embarazo a término (Staessen *et al.*, 2004; Schoolcraft *et al.*, 2009) y en la tasa de gestación (Werlin *et al.*, 2003). En nuestra experiencia retrospectiva en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) con análisis de un número limitado de cromosomas observamos que el grupo de pacientes que obtenía mayor beneficio del análisis cromosómico como herramienta de selección embrionaria eran las mujeres mayores de 40 años y aquellas con más de 5 ovocitos MII (Milan *et al.*, 2010). Por ello en IVI Valencia diseñamos un estudio prospectivo randomizado en mujeres entre 41 y 44 años en las que en un grupo se realizó cultivo prolongado y transferencia en estado de blastocisto y en el otro grupo se realizó biopsia embrionaria en día 3 de desarrollo (D3) y se transfirieron embriones cromosómicamente normales (para una batería de 9 cromosomas analizados mediante FISH) en el mismo estadio que en el grupo anterior. Los resultados mostraron un claro beneficio en los ciclos en los que se realizó análisis cromosómico embrionario, siendo la tasa de recién nacido vivo de 32,3% vs. 15,5% ($P < 0,01$, PGS vs. control) (Rubio *et al.*, 2013).

El uso de los arrays de CGH (aCGH) en PGS para el cribado de aneuploidías de los 24 cromosomas ha permitido mejorar los resultados clínicos respecto al análisis mediante FISH, tanto en pacientes infértiles menores de 40 años como en pacientes a partir de 40 años, obteniendo una mejora de un 20% en tasas de gestación e implantación con el uso de aCGH.

Los datos retrospectivos en ciclos de PGS con aCGH realizados en IVI en pacientes de

edad materna avanzada (≥ 40 años) muestran una incidencia de embriones aneuploides del 85,3%, repercutiendo negativamente en el número de ciclos con al menos un embrión euploide para transferir (40,3%). Sin embargo, cuando existe transferencia, la posibilidad de gestación e implantación es similar a la observada en pacientes menores de 40 años, siendo la tasa de gestación por transfer del 48,0% y la tasa de implantación del 42,0% en este grupo de pacientes (Rodrigo *et al.*, 2014). A pesar de observar un efecto mínimo de la edad de la mujer sobre la implantación tras la transferencia de embriones euploides, otros autores han descrito un efecto negativo de la edad sobre la tasa de niño en casa. Un estudio retrospectivo “caso-control” incluyendo ciclos de PGS con aCGH para edad materna avanzada, aborto recurrente y fallo repetido de implantación reportaron menores tasas de gestación evolutiva en los ciclos de pacientes mayores de 34 años comparado con los ciclos de pacientes ≤ 34 años. Sin embargo, incluso en ciclos de pacientes con más de 37 años, la implantación, la tasa de gestación clínica y la tasa de gestación evolutiva por transferencia fueron superiores tras PGS comparado con sus controles (Keltz *et al.*, 2013). Otros autores han observado similares tasas de implantación y de gestación evolutivas por transfer tras PGS en pacientes de hasta 42 años, observando una disminución drástica de los resultados clínicos a partir de esta edad (Harton *et al.*, 2013).

La tasa de embriones aneuploides incrementa con la edad de la mujer, siendo del 79,0% en mujeres de 40 años, y superando el 90% en mujeres con más de 44 años. Del mismo modo, la incidencia de embriones con más de un cromosoma alterado incrementa también con la edad, siendo de 32,8% en mujeres de 40 años y alcanzando valores superiores al 60,0% en mujeres mayores de 44 años (Rodrigo *et al.*, 2014). Esta relación entre la edad materna y la complejidad de aneuploidías ha sido descrita recientemente por Franasiak y colaboradores (Franasiak *et al.*, 2014). En este estudio se observa que un 36,0% de los embriones muestra más de una aneuploidía y que la incidencia de aneuploidías complejas aumenta con la edad de la mujer.

En la actualidad se está realizando en IVI un estudio prospectivo randomizado en mujeres de edad materna avanzada entre 38 y 41 años, en el que en un grupo realizamos cultivo prolongado y transferencia en estadio de blastocisto con sólo selección morfológica de los embriones, y en otro grupo realizamos biopsia embrionaria en D3 y transferencia en blastocisto de los embriones cromosómicamente normales analizados mediante aCGH. Los resultados preliminares muestran una tasa de gestación evolutiva por ciclo (42,7% vs 25,6%, $P < 0,05$) y una tasa de implantación evolutiva (58,6% vs. 18,4%, $P < 0,01$) superiores en el grupo de PGS (Rubio *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2014). Estas diferencias son debidas principalmente a la disminución en la

tasa de aborto observada en el grupo de PGS (3,3% vs. 43,6%, $P < 0,01$).

- Fallo de implantación

En pacientes que se someten a un ciclo de FIV, se define fallo repetido de implantación en aquellas con tres o más intentos sin éxito, o tras la transferencia de 10 o más embriones transferidos de buena calidad sin conseguir gestación. Las causas del fallo de implantación pueden ser múltiples y están poco definidas, y tanto factores endometriales como factores embrionarios podrían estar implicados. Entre ellas podríamos destacar: defectos en el diálogo embrión-endometrio, efecto negativo de los protocolos de estimulación, malformaciones uterinas, defectos inmunológicos, anomalías en los genes implicados en la implantación y problemas relacionados con el embrión. En relación al último aspecto, se ha sugerido que las anomalías cromosómicas embrionarias podrían ser responsables del fallo de implantación en algunas de estas parejas (Gianaroli *et al.*, 1999; Voullaire *et al.*, 2002; Pehlivan *et al.*, 2003b).

Los tres estudios prospectivos randomizados publicados hasta la fecha en fallo repetido de implantación utilizando la técnica de FISH para el análisis de los embriones muestran resultados controvertidos. El primer estudio no ofrece evidencias a favor del PGS para mejorar el pronóstico reproductivo en estos pacientes (Werlin *et al.*, 2003). El segundo estudio incluso obtiene mayor tasa de aborto y menor tasa de gestación evolutiva en el grupo de PGS (Blockeel *et al.*, 2008). Sin embargo, el tercer estudio, realizado en nuestro centro en mujeres menores de 40 años con 3 o más fallos previos de FIV y en las que se habían descartado otros factores no embrionarios que pudieran afectar a la implantación (sin hidrosálpinx, ni anomalías morfológicas uterinas, con estudio de trombofilias negativo, cariotipos normales...), observamos mejores tasas de recién nacido vivo en el grupo de PGS comparado con la transferencia de blastocistos sin análisis cromosómico (47,9% vs. 27,9%, $P < 0,05$) (Rubio *et al.*, 2013).

Aunque no existen estudios prospectivos randomizados en pacientes con fallo repetido de implantación realizando PGS con análisis de los 24 cromosomas, los resultados retrospectivos obtenidos en mujeres menores de 40 años muestran un 67,7% de embriones aneuploides. El porcentaje de ciclos con transferencia embrionaria fue de 79,2%, logrando una tasa de gestación por transferencia del 57,0%, una tasa de implantación del 50,9% y una tasa de niño en casa del 43,1% (Rodrigo *et al.*, 2014). Keltz y colaboradores también observaron que el cribado de aneuploidías de 24 cromosomas permitía reducir el número de embriones a transferir, reduciendo a su vez la tasa de gestaciones múltiples y de abortos (Keltz *et al.*, 2013).

- Aborto de repetición

En cuanto a la utilidad del PGS en los pacientes con aborto de repetición, solo se ha publicado un estudio prospectivo randomizado (Werlin *et al.*, 2003) utilizando la técnica de FISH para el análisis cromosómico. El tamaño muestral del mismo es muy pequeño, con sólo 19 pacientes incluidas. Este estudio comparó la tasa de gestación entre un grupo de aborto de repetición, definido como pacientes con dos o más abortos espontáneos, y un grupo control. Las conclusiones que se extrajeron de este estudio fueron, en primer lugar, la elevada incidencia de aneuploidías en este grupo y, en segundo lugar, la mejora en la tasa de embarazo del grupo de PGS frente al grupo control (63,6% vs. 37,5%).

En nuestra experiencia hemos identificado subgrupos de pacientes con aborto de repetición en las que el beneficio de aplicar la técnica de PGS es más evidente, como en parejas que hayan tenido entre 2 y 5 abortos previos cuando se identifican anomalías citogenéticas en los abortos previos (Rubio *et al.*, 2009), o cuando presentan una elevada incidencia de alteraciones cromosómicas en los espermatozoides (Rubio *et al.*, 2001; Bernardini *et al.*, 2004; Al-Hassan *et al.*, 2005 ; Collodel *et al.*, 2009).

Nuestros resultados retrospectivos en pacientes menores de 40 años con abortos repetidos muestran una incidencia de embriones anormales del 68,2%. El 77,3% de los ciclos presentan al menos un embrión euploide para transferir, resultando en un 57,3% de tasa de gestación por transfer, con un 47,9% de tasa de implantación y un 38,4% de tasa de niño en casa (Rodrigo *et al.*, 2014). Lo más interesante en este grupo de pacientes es que la transferencia de embriones euploides resulta en una disminución de tasas de aborto a valores tan bajos como los de la población general (13,3%). En un estudio multicéntrico recopilando 287 ciclos de PGS en parejas con abortos recurrentes de causa desconocida describieron un 60,0% de embriones aneuploides, con una tasa de aborto tras PGS del 6,9%. Esta tasa de aborto resultó ser mucho más baja que el 33,5% esperado en la población de aborto de repetición sin PGS y que el 23,7% de la tasa de aborto esperada en una población control infértil (Hodes-Wertz *et al.*, 2012). Estos resultados muestran un claro beneficio del cribado de aneuploidías de 24 cromosomas en parejas con esta etiología.

- Factor masculino

Diferentes autores han descrito un aumento de anomalías cromosómicas en espermatozoides y embriones en casos de infertilidad masculina severa (Rodrigo *et al.*, 2010; Silber *et al.*, 2003). Se ha propuesto realizar *screening* cromosómico embrionario en casos severos como pueden ser las azoospermias no obstructivas (Gianaroli *et al.*,

2000; Magli *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2011), la oligozoospermia severa con concentración de espermatozoides <5 mill/mL (Rubio *et al.*, 2001) y en determinados casos de teratozoospermia severa (Mateu *et al.*, 2006).

Los mejores resultados clínicos tras cribado de aneuploidías de 24 cromosomas se observan en este grupo de pacientes con factor masculino. Nuestros resultados retrospectivos muestran una tasa de embriones anormales de 65,4%. El 83,6% de los ciclos tienen al menos un embrión euploide para transferir, resultando en una tasa de gestación por transfer del 62,9%, una tasa de implantación del 54,2% y una tasa de niño en casa del 50,9% (Rodrigo *et al.*, 2014).

Actualmente estamos realizando un estudio prospectivo randomizado en parejas con factor masculino, con concentración seminal ≤ 2 millones de espermatozoides/mL y edad de la mujer menor de 38 años. En el grupo control estamos realizando cultivo prolongado y transferencia de embriones en estadio de blastocisto sin análisis cromosómico, y en el grupo de estudio estamos realizando PGS mediante arrays de 24 cromosomas en día 3 y transferencia en estadio de blastocisto de los embriones euploides. Los resultados preliminares muestran una clara mejora de resultados clínicos en el grupo de PGS incluso transfiriendo un número menor de embriones ($1,5 \pm 0,7$ vs. $1,9 \pm 0,6$, $P < 0,01$ PGS vs. control), con una tasa de gestación evolutiva por ciclo de 63,6% vs. 41,5% ($P < 0,05$, PGS vs. control) y una tasa de implantación evolutiva de 55,2% vs. 22,7% ($P < 0,01$, PGS vs. control) (Rubio *et al.*, 2014).

- Gestación previa con cromosomopatía

En parejas que han tenido una gestación previa con cromosomopatía, se ha descrito un riesgo incrementado de gestaciones aneuploides recurrentes particularmente en mujeres menores de 37 años (De Souza *et al.*, 2009). Asimismo, diversos estudios en los que se ha realizado PGS mediante FISH de 9 cromosomas han observado una elevada incidencia de embriones anormales en este grupo de pacientes, comprendida entre el 48,1% y el 71,2% (Munne *et al.*, 2004; Al-Asmar *et al.*, 2012).

Nuestros resultados retrospectivos mediante aCGH muestran una tasa de embriones anormales del 71,5%, lo que está en concordancia con los resultados previos obtenidos mediante FISH de 9 cromosomas. La tasa de ciclos con transfer en este grupo de pacientes es del 78,8%, resultando en un 46,0% de tasa de gestación, un 40,5% de tasa de implantación y un 30,3% de niño en casa (Rodrigo *et al.*, 2014).

1.1.3.- Controversias y limitaciones del PGS

El diagnóstico genético preimplantacional, sus indicaciones y la metodología empleada son temas de gran interés en el campo de la medicina reproductiva. En los últimos años se ha incrementado la aplicación de esta tecnología y el número de pacientes que se pueden beneficiar de ella. Sin embargo, la biopsia embrionaria es una técnica invasiva que puede afectar a la viabilidad del embrión, por lo que hay una creciente preocupación en desarrollar una metodología de trabajo que permita una elevada eficiencia y certeza en el diagnóstico con el mínimo impacto posible en la viabilidad y la tasa de implantación embrionaria.

La controversia surgida en referencia a los beneficios clínicos tras realizar PGS se centraba inicialmente en la existencia de mosaicismo desde estadios embrionarios tempranos y la limitación que representaba el análisis de una única célula como representación de la dotación cromosómica de todo el embrión. A lo largo de estos años, la incidencia de mosaicismo y su repercusión en un posible error de diagnóstico ha sido muy discutida. Munné y colaboradores encontraron que el 39,6% de embriones bloqueados y el 25,2% de embriones fragmentados y/o con desarrollo lento presentaban mosaicismo, pero este porcentaje bajaba a 14,1% en embriones con buena evolución (Munne *et al.*, 2002). Sin embargo, otros trabajos han reportado gran concordancia entre los resultados obtenidos en una única blastómera en D3 y el blastocisto completo y también entre biopsia de varias células de trofoectodermo y el análisis de blastocito completo. Nuestro grupo reporta en 2012 una mayor eficiencia tras rehibridación con sondas adicionales mediante análisis por FISH, que se reflejó en el diagnóstico final de los embriones, con una tasa de no informatividad sólo del 0,6% (Mir *et al.*, 2013). El reanálisis en blastocisto completo de embriones diagnosticados como anormales en D3 con sondas adicionales mostró una concordancia mayor que cuando no se utilizaban pruebas adicionales (95,0 vs. 82,7%).

Para que un programa de PGD/PGS funcione, los beneficios de la selección de embriones normales, cromosómica o genéticamente, deben ser mayores que el posible perjuicio que se le pueda producir al embrión por la sobremanipulación y el estrés a los que puedan ser sometidos durante el proceso de biopsia embrionaria.

Son pocos los estudios que tienen en cuenta los cambios en los procedimientos en el laboratorio de FIV sobre un programa de PGS, como por ejemplo el cambio de medio (Beyer *et al.*, 2009). El objetivo final es conseguir un embarazo a término con el resultado de un bebé sano, minimizando los posibles efectos adversos como se han

sugerido que podrían ser las modificaciones epigenéticas relacionadas con las técnicas de reproducción asistida.

Inicialmente la técnica de análisis genético más utilizada para el PGS fue el FISH para un número limitado de cromosomas, siendo más frecuente el análisis de 9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) que permitía la detección de aproximadamente el 80 y el 85% de las aneuploidías presentes en abortos espontáneos. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten el análisis de todos los cromosomas, siendo los arrays de CGH la técnica más utilizada para analizar la totalidad de los cromosomas.

- Limitaciones del PGS mediante FISH:

- Eficiencia de la hibridación.

En primer lugar, ha de tenerse en cuenta que la eficiencia de hibridación de las sondas utilizadas para FISH no es del 100%. Esto implica que algunos de los embriones analizados sean calificados como no informativos para algunos de los cromosomas analizados y, por lo tanto, no puedan ser seleccionados para la transferencia. En el programa de DGP de IVI Valencia, la tasa de informatividad es del 97%, no pudiéndose interpretar las señales e hibridación para uno o más cromosomas en el 3% de los embriones. Por otro lado, la eficiencia de hibridación viene determinada no sólo por las características intrínsecas de las sondas utilizadas, sino también por las características morfológicas del núcleo y la calidad de la extensión (Manor *et al.*, 1996; Manor *et al.*, 1998) obteniendo resultados similares con una eficiencia de hibridación del 87% para los autosomas y del 97% para los cromosomas sexuales.

- Número de cromosomas analizados.

Otra limitación hace referencia al número máximo de cromosomas que es posible analizar en una única célula y, en este sentido, se plantearon otras posibilidades, como la hibridación genómica comparada o los arrays de CGH, permitiendo el análisis simultáneo del complemento cromosómico de 1 célula en su totalidad, es decir, todos los cromosomas del cariotipo.

- Uso de los arrays de CGH como propuesta de mejora de los resultados clínicos:

La técnica de arrays de CGH permite el análisis simultáneo de los 23 pares de cromosomas humanos en una única célula, siendo capaz de detectar desequilibrios cromosómicos menores de 5 Mb a lo largo de todo el genoma humano. El análisis se puede realizar en un tiempo inferior a 24 horas, lo que permite la transferencia de los embriones en el mismo ciclo en el que se realiza la biopsia. Para aplicar la técnica de

arrays de CGH en DGP es necesaria la amplificación genómica completa (WGA, del inglés *Whole Genome Amplification*) a partir de una célula (corpúsculo o blastómera) o muy pocas células (biopsia de trofoectodermo), con el fin de obtener suficiente cantidad de DNA para realizar el análisis. El método de WGA ideal debe ofrecer una buena cobertura genómica y proporcionar una fiel representación del original en cantidad suficiente. Este DNA amplificado se marca con fluoresceína verde (Cy3) y se hibrida sobre la plataforma del array simultáneamente con un DNA control euploide marcado con rojo (Cy5). La plataforma del array está formada por miles de puntos que contienen diferentes secuencias de DNA normal distribuidas a lo largo de todo el genoma. Aunque existen diferentes tipos de plataformas, las más utilizadas en clínica son los arrays de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) cuyos puntos están compuestos por fragmentos extraídos de clones BACs.

Las principales ventajas de la técnica de arrays son:

- Se pueden analizar de forma simultánea los 24 cromosomas a partir de una única célula. Además, el hecho de que no analice sólo una región por cromosoma (como ocurría con la técnica de FISH) sino varios puntos, permite analizar tanto el número de cromosomas como la integridad de los mismos (alteraciones parciales) en el mismo análisis.
- Se trata de un sistema rápido de cribado/diagnóstico, dado que pueden obtenerse resultados en aproximadamente 12 horas a partir de la hora de recepción de las muestras en el laboratorio. Este procedimiento permite, por lo tanto, trabajar con células obtenidas tanto en día 3 de desarrollo embrionario y transferencia en día 5, como con células obtenidas en día 5 temprano y transferencia en día 6.
- A diferencia de la técnica de FISH, se trata de una técnica muy robusta, obteniéndose resultados muy sólidos y reproducibles en diferentes laboratorios.
- Al estar diseñado para detectar número de cromosomas (plataforma de baja resolución), minimiza la obtención información de la que se desconoce relevancia clínica.

Limitaciones de los arrays de CGH

- **Eficiencia de amplificación.** Viene determinada por las características de la célula biopsiada y por la destreza en el procesado de la célula para colocarla intacta en el interior del tubo de PCR, siendo considerado como buenos valores de eficiencia de amplificación superiores al 95%. Pueden producirse fallos de amplificación si la célula biopsiada no presenta núcleo o se encuentra degenerada; si no existe célula en el tubo de PCR, por lo que se debe observar claramente la célula en el medio

tras el liberarla, descartando que se haya pegado al capilar. También pueden producirse una disminución en la eficiencia de amplificación si se deposita demasiado medio al liberar la célula, de manera que no se guarden las proporciones para la PCR.

- **Detección de alteraciones de ploidía.** Según la plataforma de arrays utilizada, como ocurre en el caso de los arrays mediante BACs, no es posible detectar alteraciones en la ploidía (embriones triploides, tetraploides, etc.), cuyas gestaciones dan lugar principalmente a abortos.
- **Contaminación.** La técnica de arrays de CGH no permite identificar la presencia de contaminación, y si ésta se produce daría lugar a un error de diagnóstico. Por ello, es de vital importancia mantener las máximas condiciones de esterilidad durante todo el proceso, tanto al depositar la célula en el interior del tubo como en la amplificación.
- **Diagnóstico de embriones con perfil caótico.** El diagnóstico de embriones anormales con un patrón caótico podría estar sobrestimado si se produce por la pérdida de fragmentos durante la manipulación celular, por lo que es importante comprobar que la célula permanece íntegra en el medio tras colocarla en el tubo de PCR; o por contaminación de la célula con fragmentos de otras células.

Nuevas tecnologías. El continuo avance en las tecnologías de secuenciación, nos ofrecen un futuro dónde se podrá analizar todo el genoma embrionario con plataformas de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) aplicada al diagnóstico preimplantacional. Esta tecnología ha sido validada para la detección de anomalías segmentales y aneuploidías en blastómeras y biopsia de trofoectodermo (Yin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Fiorentino *et al.*, 2014). En este sentido, las nuevas investigaciones en NGS van dirigidas hacia el análisis del DNA mitocondrial como marcador de implantación embrionaria (Diez-Juan *et al.*, 2015; Fragouli *et al.*, 2015), la detección de microdeleciones, la búsqueda de marcadores genéticos relacionados con la viabilidad embrionaria, y el estudio simultáneo de aneuploidías y enfermedades monogénicas sobre la misma muestra de DNA.

Baja respuesta ovárica

1.2

Se han realizado grandes avances en los últimos años en el campo de las técnicas de reproducción asistida en términos de conocimiento clínico y desarrollo tecnológico, especialmente en los laboratorios de fecundación *in vitro*. Uno de los escalones fundamentales para alcanzar el éxito está relacionado con el número de óvulos obtenidos tras una estimulación hormonal con gonadotropinas. La obtención de información detallada con respecto al potencial ovárico de una paciente debe ser considerada como vital antes de iniciar la estimulación. La correcta individualización de los protocolos de los tratamientos de FIV debería basarse en la correcta predicción de la respuesta ovárica en especial en los casos extremos, es decir, en pobres e hiperrespondedoras (La Marka y Sunkara, 2014).

En pacientes definidas como pobres respondedoras el limitado número de ovocitos obtenidos supone el principal problema para optimizar las tasas de recién nacido vivo. El resultado de recuperar menos óvulos es obtener menos embriones para seleccionar y transferir y, por ello, estas pacientes tienen tasas más bajas de gestación por transfer y menor tasa acumulada de embarazo por ciclo iniciado en comparación con pacientes con respuesta adecuada a la estimulación.

Cuando la disminución de la reserva ovárica se da en pacientes jóvenes, los resultados son también pobres, similares a los de las pacientes de mayor edad (El-Toukhy *et al.*, 2002). Además, las pacientes en cuyo primer ciclo de FIV se obtienen pocos ovocitos tienen más probabilidades de convertirse en menopáusicas a una edad más temprana (de Boer *et al.*, 2002). La baja respuesta a la estimulación ovárica es objeto de controversia debido a las siguientes consideraciones:

- Hay muchas discrepancias en la definición de baja respuesta, ya que se trata de una entidad muy heterogénea.
- Aunque existe varios test predictivos, la baja respuesta a menudo sólo se manifiesta durante la propia estimulación ovárica.
- Existen numerosas pautas de tratamiento, pero no existen estudios a gran escala prospectivos y randomizados para valorar la eficacia de las diferentes estrategias.

1.2.1.- Definición y causas

El conjunto de pacientes con baja respuesta ovárica se enmarcan en el conjunto de pacientes que presentan una respuesta ovárica escasa en el marco de hiperestimulación ovárica controlada para técnicas de reproducción asistida y, aunque no existe una manera universalmente aceptada para clasificar a este tipo de pacientes, habitualmente suele basarse en tres criterios clínicos:

1. Número de folículos reclutados: entre 3 y 5 folículos sumando los dos ovarios, contrastando con las normo respondedoras que tienen más de 5.
2. Número de ovocitos recuperados tras una punción ovárica para un ciclo de FIV menor de 5.
3. Niveles de estradiol en el momento de la hCG entre 300 y 500pgr/mL.

El principal problema de la baja respuesta radica en su propia definición, ya que son muchas y variadas las que se han propuesto (Polyzos y Devroey, 2011). Este subgrupo de población infértil supone uno de los principales desafíos para el especialista, constituyendo en muchas ocasiones un motivo de frustración (Garcia-Velasco et al., 2005; Schoolcraft *et al.*, 2008; Kyrou *et al.*, 2009). Se trata de un grupo de pacientes bastante heterogéneo que constituye de un 9 a un 25% de los ciclos estimulados para técnicas de reproducción asistida (Ubaldi *et al.*, 2005). Aunque el concepto de respuesta ovárica disminuida (POR, *poor ovarian response*) se introdujo hace unos 30 años (Garcia *et al.*, 1983), no se definió con más claridad hasta el año 2011. El primer intento realista de la comunidad científica para estandarizar la definición de POR de una forma sencilla y reproducible tuvo lugar en Bolonia en el 2011 en la *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) donde se llegó a consensuar y se aceptó que, como mínimo, se debían cumplir al menos dos de las tres características descritas (Ferraretti *et al.*, 2011):

1. Edad materna avanzada, ≥ 40 años o algún otro factor de riesgo para POR.
2. Baja respuesta en ciclo previo: ≤ 3 ovocitos con un protocolo convencional de estimulación.
3. Resultado anormal en un test de reserva ovárica: RFA $< 5-7$, AMH $< 0,5-1,1$ ng/mL.

RFA: recuento folículos antrales; AMH: hormona antimülleriana.

Dos episodios de baja respuesta a la estimulación con dosis máxima son suficientes para definir a una paciente como baja respondedora en ausencia de test de reserva ovárica anormal o edad materna avanzada.

Sin embargo, independientemente de esta iniciativa prometedora, el cumplimiento de la definición según los criterios de Bolonia no tiene valor predictivo en cuanto al pronóstico de la gestación, pues es bien sabido que mujeres bajas respondedoras pueden quedar embarazadas y tener recién nacidos vivos, en particular, jóvenes con baja respuesta ovárica tienen un pronóstico diferente que las mujeres mayores. Los criterios Bolonia no pretenden pues distinguir cantidad y calidad ovocitaria en los tratamientos de reproducción asistida, se basan en cantidad de ovocitos, para poder homogeneizar la población objeto de estudio y poder desarrollar ensayos prospectivos, a pesar de que no tengan similar pronóstico para obtener gestación, pues un concepto es reserva ovárica y otro pronóstico de gestación. Sin embargo, se considera necesario para validar estos criterios (Ferraretti *et al.*, 2011).

Reserva y respuesta se superponen pero no siempre se refieren a la misma población de pacientes, y establecer las diferencias es importante de cara a prever el pronóstico de la paciente. Entre ellas cabe destacar tres subgrupos:

- a. Bajas respondedoras inesperadas: Pacientes jóvenes con niveles de hormona foliculoestimulante (FSH) basal normales.
- b. Pacientes con fallo ovárico precoz: Pacientes menores de 40 años y con niveles e FSH basales alterados.
- c. Pacientes de edad avanzada: Pacientes mayores de 39-40 años.

A la hora de diagnosticar o predecir una baja respuesta, hay que tener en cuenta una serie de criterios analíticos, ecográficos y de otra índole:

- El criterio ecográfico implica la visualización de un número inferior a 6 folículos antrales en la ecografía basal (Surrey y Schoolcraft, 2000).
- El criterio analítico corresponde a un nivel elevado de estradiol (E2) o FSH el tercer día del ciclo.

Asimismo, estas definiciones deberían incluir el grado de estimulación ovárica utilizado (Kailasam *et al.*, 2004). La dificultad es mayor debido a que las bajas respondedoras no son un grupo homogéneo, y la baja respuesta puede deberse a diferentes causas de cada paciente (Loutradis *et al.*, 2003).

Se ha propuesto diversas teorías como causa de la baja respuesta. Entre todas ellas destacamos las siguientes:

- Disminución de la reserva ovárica (Pellicer *et al.*, 1998).
- Angiogénesis ovárica anormal que conllevaría una distribución deficiente al ovario de las gonadotropinas circulantes (Pellicer *et al.*, 1994).
- Disminución de la bioactividad de las gonadotropinas circulantes (de Vet *et al.*, 2002).
- Presencia en el líquido folicular de inhibidores de la unión de la FSH al receptor (Lee *et al.*, 1993).
- Disminución del número de receptores para la FSH en las células de la granulosa (Zelevnik *et al.*, 1981).
- Presencia de autoanticuerpos contra las células de la granulosa (Pellicer *et al.*, 1998).
- Defectos en la señal de traducción tras la unión FSH-receptor (Hernandez *et al.*, 1992).

1.2.2.- Pautas de tratamiento

El tratamiento ideal sería aquel que pudiera producir un número similar de embriones al obtenido en mujeres que responden adecuadamente a la estimulación ovárica, que permita seleccionar el de mejor calidad para su transferencia. Las estrategias pueden estar orientadas en buscar los protocolos de estimulación más eficientes o ya en el laboratorio de FIV hacia la acumulación de ovocitos o embriones procedentes de varias estimulaciones.

- Protocolos de estimulación.

Han sido muchos los esfuerzos dirigidos a aumentar la respuesta ovárica en estos casos, utilizando enfoques diferentes y generalmente infructuosos. En la actualidad existen muchos protocolos de estimulación dirigidos a esta subpoblación, pero ninguno de ellos ha conseguido mejorar los resultados y no hay suficiente evidencia científica en la actualidad para recomendar un protocolo en particular. La decisión y la elección del mismo es competencia del clínico. Es por tanto necesaria una estrategia para obtener el mismo número de ovocitos que en pacientes normo respondedoras.

Se han propuesto diferentes protocolos de estimulación para mejorar los resultados (García-Velasco *et al.*, 2000), como:

- Variar la dosis o el día de inicio de la estimulación.
- Desensibilización hipofisaria utilizando el protocolo largo con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

- Protocolo *flare*.
- Stop-protocol.
- Co-tratamientos con estrógenos, hormona de crecimiento o anticonceptivos hormonales orales.
- Citrato de clomifeno.

Otras alternativas sugeridas han sido:

- **Ciclo natural.** Puede ser considerada una modalidad de tratamiento adecuada en estos casos, no sólo porque no es inferior en términos de tasas de gestación o implantación comparadas con las obtenidas tras estimulación ovárica, sino porque puede constituir una opción terapéutica más coste-efectiva y cómoda (Polyzos *et al.*, 2014). La tasa de recién nacido vivo acumulada por paciente, sin embargo, no supera el 8,0%. Otra desventaja es su alta tasa de cancelación.
- **Ciclo natural modificado.** Ciclo en el que se añade en fase folicular media una dosis de 150UI diarias de FSH o hMG (hormona gonadotropina menopáusica humana) al mismo tiempo que el antagonista para evitar la tasa de cancelación por elevación prematura de LH endógena.
- **Ovodonación.** El cansancio resultante de los fallos repetidos de tratamiento en este grupo de pacientes convierte en excelente el resultado obtenido en un programa de donación de ovocitos y resulta una opción atractiva para ellos (Remohi *et al.*, 1993).
 - Estrategias en el laboratorio de FIV.

El número de ovocitos *per se* no es un indicador de calidad ovocitaria, pero si está disminuido sí es un factor limitante para la selección de embriones *in vitro* y la posibilidad de transferir embriones viables. Está demostrado que la disminución de la reserva ovárica afecta fundamentalmente a la producción de ovocitos, más que a la calidad de los mismos, característica relacionada con la edad materna. Por otro lado, en estas pacientes existe una alta tasa de abandono del tratamiento. Teniendo en cuenta estos dos aspectos, en los últimos años se han llevado a cabo una serie de estrategias en el laboratorio a fin de aumentar el rendimiento del ciclo y disminuir en lo posible la tasa de cancelación (Verberg *et al.*, 2008).

El tratamiento ideal sería aquel que pudiese aportar un número similar de embriones para transferir que el obtenido por las pacientes con respuesta adecuada al tratamiento. La estrategia supone generar un stock acumulando ovocitos metafase II vitrificados como resultado de varias estimulaciones e inseminarlos todos en el mismo

momento, lo que aumenta la posibilidad de éxito otorgando a las pacientes un estatus de normo respondedora, acotando el número de embriones disponibles para transferir en ciclos consecutivos en cinco, con lo que se alcanzaría el 52,0% de tasa acumulada de recién nacido vivo (Cobo *et al.*, 2012).

La vitrificación ha permitido la criopreservación exitosa del gameto femenino (Kuwayama *et al.*, 2005) con tasas de éxito comparables a las de los ovocitos en fresco (Cobo *et al.*, 2008). Este planteamiento se corroboró en el estudio publicado por Cobo *et al.*, en el que se comparó la tasa de éxito en pacientes bajo respondedoras realizando ciclos frescos consecutivos *versus* pacientes que realizaron ciclos sucesivos de estimulación con el fin de vitrificar los ovocitos MII aspirados con el propósito de lograr una mayor cohorte, para realizar la inseminación mediante ICSI en un sólo ciclo (Cobo *et al.*, 2012). En este estudio, se consiguieron tasas similares de fecundación, desarrollo embrionario hasta día tres, porcentaje de embriones de buena calidad así como tasas de implantación. Aunque no se encontraron diferencias significativas, la tasa de recién nacido vivo por paciente en el grupo de acumulación de ovocitos dobló la conseguida en el grupo de pacientes que realizó los ciclos en fresco. Otro hallazgo importante es que la tasa de cancelación de la transferencia embrionaria fue significativamente menor en el grupo que vitrificó ovocitos (9,1% vs. 34,0%).

Otra ventaja de esta estrategia es que al disponer de una cohorte embrionaria mayor, la disponibilidad de embriones adicionales para vitrificar para futuras criotransferencias (28,9% vs. 8,7%) también fue mayor, incrementando así la tasa de éxito acumulada (36,4% vs. 23,7%).

La acumulación de ovocitos mediante la vitrificación en situaciones de respuesta disminuida a la estimulación, está asociada a una menor tasa de abandono y de transferencias canceladas, mejores tasas de recién nacido vivo por transferencia realizada, más ciclos con embriones vitrificados y mayor tasa acumulada de niño en casa, lo que supone una alternativa exitosa de tratamiento en estos casos.

Sin embargo se suele limitar el número de ciclos a tres, utilizando el último de ellos para realizar la inseminación de los ovocitos, sumando a los frescos de ese ciclo los vitrificados en los previos. Otra alternativa sería la acumulación de embriones vitrificados en día 2 o día 3 de desarrollo, con resultados clínicos también prometedores (Rodrigo *et al.*, 2014).

Además, disminuía la tasa de abandono del tratamiento secundaria a los malos resultados obtenidos por la imposibilidad de los pacientes de sobrellevar la situación (Cobo *et al.*, 2012).

1.2.3.- Limitaciones de la baja respuesta en un ciclo de PGS

Las pacientes bajo respondedoras tienen por tanto un menor número de ovocitos y embriones, hecho que reduce significativamente sus posibilidades de éxito en un ciclo de PGS.

Los resultados de un ciclo de PGS también van a estar influidos por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Para ello es necesario que, como resultado de la estimulación ovárica, se obtenga un número mínimo de ovocitos. Vandervorst aconseja cancelar aquellos ciclos en los que se espere obtener al menos 6 ovocitos, ya que las expectativas de transferencia y embarazo se reducen considerablemente (Vandervorst *et al.*, 1998). Esto se debe a que durante todo el proceso, en cada paso, se va reduciendo el número de embriones debido a:

- La tasa de fecundación, que en las pacientes de PGS de IVI es del 80%.
- La tasa de división, con 77% de los cigotos fecundados con un buen desarrollo embrionario que permite la biopsia.
- El análisis cromosómico, donde el porcentaje de embriones anormales puede exceder el 50%.

La acumulación de ovocitos y/o embriones vitrificados previa al ciclo de PGS es una posible estrategia que podría incrementar la posibilidad de una gestación evolutiva.

Es bien conocido que el número de embriones generado en un ciclo de reproducción asistida es directamente proporcional al número de ovocitos recuperados. Los resultados de un trabajo publicado en 2012 demuestran una correlación negativa entre la edad de la mujer y la tasa de euploidía embrionaria (Ata *et al.*, 2012), de forma similar a los resultados de antiguas publicaciones (Marquez *et al.*, 2000; Munne *et al.*, 1995). En este estudio se presenta la elevada incidencia de aneuploidías con la edad evaluada mediante aCGH. Se trata del mayor estudio realizado hasta el momento que analiza estas relaciones evaluando la dotación cromosómica completa. La tasa de euploidía parece no estar relacionada con el número de embriones analizables generados por ciclo. Aunque la proporción de embriones euploides permaneció sin cambios con el número de embriones disponibles, la proporción de las mujeres que tenían al menos un embrión euploide aumentaba cuando se generaron más

embriones. Podría decirse que el número de embriones disponibles es reflejo de la reserva ovárica. En un ciclo de estimulación convencional la tasa de aneuploidías no está relacionada con el número de embriones generados, un número razonable de ovocitos MII aspirados podría ser 15, tal como se sugiere en otros trabajos (Garrido *et al.*, 2011; Sunkara *et al.*, 2011). Sin embargo este estudio no argumenta a favor o en contra de los protocolos convencionales de estimulación ovárica *versus* estimulaciones leves o ciclos naturales ya que podrían haber repercusiones en la receptividad endometrial, y está pues fuera del alcance de este estudio enlazar la estimulación, la euploidía, los regímenes hormonales y las tasas de implantación (Baart *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2011).

Son interesantes los resultados derivados del análisis de ciclos no estimulados para FIV que 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. Los resultados derivados del análisis de ciclos no estimulados de 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. 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. Así, 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 (Labarta *et al.*, 2012; Labarta *et al.*, 2014).

La criopreservación en el laboratorio de fecundación in vitro

1.3

Los avances conseguidos en reproducción asistida han traído consigo un aumento en la proporción de embriones crioconservados. Esto se debe a que las mejoras en las condiciones del laboratorio se han reflejado en una mejor calidad embrionaria, permitiendo al embriólogo optimizar sus criterios de selección y reducir cada vez más el número de embriones transferidos. Así, la transferencia de uno o dos embriones potencia los ciclos con criopreservación y, por tanto, el número de transferencias por

ovocito recuperado. De esta manera, a través de un buen programa de criopreservación, se puede conseguir un incremento en las tasas de gestación por ciclo estimulado y una disminución en las tasas de gestación múltiple.

En los últimos años, las tasas de gestación con embriones criopreservados son cada vez más cercanas a las obtenidas con embriones frescos, haciendo de este programa una vía útil para rentabilizar los ciclos de estimulación ovárica. La introducción de la transferencia de embriones criopreservados incrementa el éxito del tratamiento en los ciclos que han fallado antes con la transferencia en fresco. Por otro lado, la mejora sustancial en la viabilidad de los ovocitos tras la aplicación de los protocolos de criopreservación está permitiendo la introducción en la dinámica del laboratorio de embriología de la posibilidad de criopreservar ovocitos en vez de embriones con el consiguiente beneficio en muchos aspectos de la embriología clínica, ya que mientras que por un lado se puede disminuir la excedencia de embriones *sobrantes* de los ciclos de fecundación *in vitro* en los bancos de embriones, también está permitiendo la opción de posponer la maternidad a muchas mujeres en caso de enfermedad grave o por otro tipo de circunstancia social.

A su vez, el éxito del programa de criopreservación pasa no sólo por la selección adecuada del material biológico que se ha de preservar (los embriones u ovocitos de calidad subóptima no soportan igual de bien los procesos de criopreservación que aquellos especímenes con buena viabilidad), sino de la aplicación de unos procesos que permitan la máxima viabilidad en los procesos de congelación y descongelación. Precisamente el conocimiento de los fundamentos físico-químicos que ocurren durante la congelación de soluciones acuosas y la respuesta de las células vivas a la congelación van a ayudar a poner más atención a los puntos clave del proceso y a prevenir los posibles efectos adversos derivados del proceso.

1.3.1.- Técnicas de criopreservación

Hay básicamente dos tipos de criopreservación de los especímenes generados en los laboratorios de FIV, por un lado se pueden utilizar protocolos de congelación lenta y por otros protocolos más rápidos basados en la vitrificación. Hasta hace muy poco los protocolos de criopreservación utilizados por excelencia eran los protocolos de congelación lenta pero cada vez más se están imponiendo por los resultados los protocolos de vitrificación con resultados espectaculares. Los procedimientos de congelación son relativamente simples y de fácil ejecución con los medios y equipos

disponibles comercialmente y, aunque los medios también pueden prepararse en el laboratorio, la normativa europea lo desaconseja.

Congelación lenta

En cuanto a la congelación lenta suelen ser procedimientos de larga duración (de 90 minutos a 5 horas) y que requieren congeladores programables que controlen las tasas de enfriamiento. En síntesis, y como resultado de la precipitación del agua como cristal, se produce la separación del agua y las sustancias disueltas, formándose cristales de hielo intracelulares, incrementándose la concentración de solutos extracelularmente.

Para su ejecución se utilizan dos sustancias básicas, por un lado se utiliza 1,2-propanodiol (PROH) como crioprotector permeable y por otro la sacarosa como crioprotector no permeable. Este procedimiento consta básicamente de las siguientes fases: equilibrio con el crioprotector, congelación, almacenamiento y descongelación. La congelación lenta es una técnica de criopreservación en la que existe un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la velocidad de formación de núcleos de hielo. El objetivo principal de este tipo de crioconservación es el de controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que descienda la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares. Por lo tanto, el éxito de un protocolo de congelación lenta se basa en alcanzar el equilibrio entre la velocidad a la que el agua abandona la célula y la velocidad con que esta agua se convierte en hielo.

Vitrificación

La vitrificación se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales, es decir, que debido al rápido descenso de temperatura, la viscosidad de la muestra aumenta hasta un punto en que las moléculas se inmovilizan. De esta forma, se encuentran en un estado sólido aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso (estado vítreo) (Fahy, 1986). Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas o elevadas concentraciones de crioprotectores, sin necesidad de establecer el equilibrio osmótico entre los ambientes intra y extracelular a lo largo del periodo de enfriamiento de las células. La vitrificación presenta numerosas ventajas como la total eliminación de la formación de hielo o la disminución del daño causado por el enfriamiento, puesto que atraviesa el rango de temperatura

de +15°C a 0,5°C a velocidades de enfriamiento muy rápidas (efecto *chilling*) (Liebermann *et al.*, 2003). Otra gran ventaja de esta técnica es que no requiere de equipos de congelación caros o sofisticados y puede ser realizada de manera muy sencilla. Sin embargo, esta técnica comporta un gran inconveniente, y es que la concentración de crioprotectores (CPAs) que se requiere es muy alta, y como es bien sabido, estas sustancias, particularmente a altas concentraciones, son tóxicas para los embriones (Fuller y Paynter, 2004). Sin embargo, una mezcla adecuada de CPAs puede mitigar estos efectos adversos. En este sentido, la combinación más usada es una mezcla de etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) y sacarosa (Vajta y Nagy, 2006). Otra estrategia, consiste en disminuir considerablemente el volumen que contiene las células que se van a vitrificar con lo que se incrementa drásticamente la velocidad de congelación, lo que a su vez permite la reducción de la concentración de CPA y con ello los efectos tóxicos. Se han diseñado diversas técnicas que emplean volúmenes pequeños (1µl) de la solución de vitrificación y en las que se utilizan diversos dispositivos de carga. Todos estos dispositivos han sido utilizados en diferentes especies de mamífero y en humanos, con éxito variable.

Los procesos de congelación lenta aunque se siguen utilizando están siendo reemplazados por otros métodos de crioconservación basados en la vitrificación. Estos métodos están teniendo cada vez más adeptos entre los especialistas de embriología clínica por las ventajas que suponen y los altos resultados que se obtienen. Así métodos de crioconservación como los que utilizan el Cryotop®, o Cryo Tip® o estrategias similares están contribuyendo de forma notable a la eficiencia de los ciclos de estimulación ovárica, es decir, están contribuyendo al aumento de las posibilidades de gestación por ciclo iniciado. En cuanto a la técnica de vitrificación, la de ovocitos con el método Cryotop® es uno de los sistemas de vitrificación más recientemente diseñados (Kuwayama *et al.*, 2005). El Cryotop® consiste en una fina lengüeta de polipropileno de 0,4mm de ancho x 20mm de largo x 0,1mm de grosor unida a un mango plástico, dispone además de un protector que se acopla a la lengüeta para proteger las muestras durante su almacenamiento. Con este dispositivo, el volumen final es de 0,1µl, 10 veces inferior al que utilizan los otros sistemas de mínimo volumen y con el que se consiguen velocidades de congelación de -23000°C/min. Además, la concentración total de CPA se reduce al 30%. Otra ventaja del Cryotop®, quizá la más notoria, es que permite velocidades de descongelación superiores a las conseguidas con otras técnicas, con lo cual la formación de hielo es virtualmente imposible. Esto elimina completamente el daño por congelación, excluyendo definitivamente el riesgo de fractura de la zona pelúcida. Esta tecnología ha sido aplicada con éxito en humanos,

consiguiendo un 91% de supervivencia, 81% de tasa de división y un 50% de desarrollo a blastocisto (Kuwayama *et al.*, 2005). En IVI Valencia, se utilizó en primer lugar esta metodología en pacientes de ovodonación y se compararon los resultados obtenidos con ovocitos vitrificados y frescos. Se consiguió una excelente tasa de supervivencia del 97,0%. La tasa de fecundación 76,3%, división 77,6 vs. 84,6%, calidad embrionaria 80,8 vs. 80,5%, desarrollo a blastocisto 48,7 vs. 47,4%, fueron similares en ovocitos vitrificados y frescos respectivamente. Las tasas de gestación e implantación 65,2 y 38,2%, respectivamente, obtenidas con ovocitos vitrificados son similares a las obtenidas en nuestro programa de ovodonación con ovocitos frescos. Estas observaciones indican que el proceso de vitrificación con el método Cryotop® no altera la capacidad de desarrollo de los embriones obtenidos con ovocitos vitrificados, ya que la fecundación, división, calidad embrionaria así como los resultados clínicos son similares a los obtenidos con ovocitos frescos. Además, los resultados clínicos obtenidos son superiores a los conseguidos con cualquier otra técnica de criopreservación disponible. Actualmente el Cryotop® es el método de criopreservación de ovocitos más eficiente, consiguiendo los mismos resultados que se obtienen con ovocitos frescos y representa una opción válida para la creación de bancos para su almacenamiento prolongado.

1.3.2.- Estrategias de vitrificación: Ovocitos, embriones y blastocistos

La vitrificación exitosa del gameto femenino ha significado un verdadero hito en reproducción asistida, siendo muchas las mujeres que actualmente se están beneficiando de esta estrategia. La vitrificación de ovocitos ha traído consigo un importante avance para los programas de donación de ovocitos ya que ha permitido la creación de bancos, en los que ovocitos de donante se almacenan con la posibilidad de guardar un tiempo de cuarentena previo a la donación, haciendo el proceso más seguro y, sobretodo, más fácil y rápido para las receptoras. Asimismo, la posibilidad de criopreservar los óvulos en ciclos de RA realizados con ovocitos propios, también ha aportado una increíble flexibilidad a los tratamientos abriendo múltiples opciones terapéuticas. Por otra parte, la preservación de la fertilidad es una rama emergente, que rápidamente ha ocupado un lugar principal dentro del arsenal terapéutico en reproducción asistida. La preservación de la fertilidad está relacionada con la salvaguarda de gametos ya sea masculinos o femeninos, y tejido reproductivo (ovarios, testículos), debido al riesgo de pérdida de la capacidad reproductiva proporcionando una oportunidad para concebir y tener descendencia propia. La vitrificación de ovocitos ha contribuido notablemente a que esta opción sea hoy en

día una realidad para pacientes con cáncer que se vayan a someter a cirugía, empezar quimioterapia o radioterapia; u otras condiciones médicas que conduzcan a menopausia prematura, mujeres saludables con deseo de posponer la maternidad, pero que se ven sometidas a una merma en su fertilidad por efecto de la edad.

Contribución de la vitrificación de ovocitos a la práctica clínica en reproducción asistida

La gran variedad de protocolos y técnicas que podemos encontrar en la literatura, hace un poco difícil el análisis de la utilidad clínica de esta técnica desde sus inicios. Además, el número de pacientes o variables dependientes de la técnica (por ejemplo edad, calidad ovocitaria, tipo de crioprotector/concentración) y los diferentes dispositivos de vitrificación, juegan un papel clave en los resultados finales. Una revisión publicada en 2012 sobre la aplicación clínica de la criopreservación de ovocitos incluyendo tanto vitrificación como congelación lenta, concluyó que existen evidencias consistentes que indican que los ovocitos retienen su potencial desarrollo, con tasas de supervivencias cercanas al 90% (Edgar y Gook, 2012). Sin embargo, en esta revisión, los autores indican que la congelación lenta ofrece bajas tasas de supervivencia con compromiso en el desarrollo embrionario. Estas conclusiones están en la línea de los resultados de un metaanálisis que incluyó ensayos prospectivos aleatorizados en los que comparaban los resultados de la congelación lenta de ovocitos *MII versus* vitrificación, o entre ovocitos frescos *versus* vitrificados, concluyendo que los resultados están a favor del grupo de vitrificados (Cobo y Diaz, 2011). Sin embargo, se detectó heterogeneidad cuando se analizó la supervivencia, muy probablemente debido a que fueron incluidos tanto sistemas abiertos como cerrados de vitrificación. Otra revisión evaluó la eficacia clínica de la vitrificación revelando que la metodología más ampliamente utilizada es el sistema abierto (Cobo *et al.*, 2009).

Los bancos de ovocitos disponibles para los programas de ovodonación son una realidad hoy en día, gracias a la vitrificación. El primer caso de recién nacido vivo tras la transferencia de embriones generados de ovocitos vitrificados fue publicado en 1999 por Kuleshova (Kuleshova *et al.*, 1999). Posteriormente, los estudios publicados involucraron poblaciones de estudio mixtas, conformadas por pacientes de ovocitos propios y receptoras, con tasas de supervivencia del 85 al 90% y una tasa de embarazo del 30% por transferencia. En 2008, aparecieron algunas publicaciones relacionadas con el éxito de la donación de ovocitos vitrificados de banco con tasas de supervivencia del 85 al 95% y del 60 al 75% las tasas de embarazo (Chang *et al.*, 2008; Keskinetepe *et*

al., 2009). En ese mismo año, nuestro grupo demostró desarrollo embrionario similar al comparar entre ovocitos vitrificados usando el método publicado por Kuwayama (Kuwayama *et al.*, 2005) *versus* ovocitos frescos (Cobo *et al.*, 2008). En 2009, Nagy publicó su experiencia con el banco de ovocitos en un estudio que incluyó 10 donantes y 20 receptores, y obtuvo un 90% de tasa de supervivencia y un 75% de tasa de embarazo por transferencia (Nagy *et al.*, 2009). En 2011, una publicación conjunta de dos centros mostró resultados consistentes para el uso clínico rutinario de ovocitos vitrificados en sus respectivos programas de donación tras dos años de aplicación de esta estrategia (Cobo *et al.*, 2011). Estos resultados coinciden con los obtenidos en un programa de ovodonación donde se donaron ovocitos frescos y vitrificados de una misma cohorte a dos receptoras distintas, mostrando parámetros de desarrollo embrionario y resultados similares en ambos grupos (Trokoudes *et al.*, 2011). En otro estudio, la tasa de blastocisto tras la donación de ovocitos vitrificados *versus* frescos (41,3% vs. 45,3%), así como la tasa de gestación (61,8% frente a 60,0%), fueron similares (García *et al.*, 2011). Recientemente, un estudio observacional prospectivo de 14 donantes y 20 receptores reportó una tasa de supervivencia del 90% y una tasa acumulada de gestación evolutiva del 43,5% considerando las transferencias en fresco más las criotransferencias de embriones sobrantes (Stoop *et al.*, 2012). Quizá lo más interesante de este trabajo, y a diferencia de la gran mayoría de trabajos publicados hasta la fecha, es que en este estudio se empleó un sistema cerrado de vitrificación.

Es de especial interés el ensayo clínico, triple ciego, prospectivo, aleatorizado que incluye el mayor tamaño de muestra publicado hasta la fecha, encaminado a la validación de la vitrificación de ovocitos como herramienta fundamental en el funcionamiento del banco de estos gametos destinado a los programas de ovodonación (Cobo *et al.*, 2010). En este estudio se incluyeron 600 donantes/receptoras (300 por rama), donándose 3039 ovocitos vitrificados de banco y 3185 ovocitos frescos. En este estudio demostraron la no inferioridad de los ovocitos vitrificados con respecto a la tasa de gestación evolutiva (Odds ratio=0,9; IC 95%: 0,7-1,3). La tasa de supervivencia global fue de 92,5% y la tasa de gestación evolutiva en el caso de las pacientes que recibieron ovocitos vitrificados de 43,7% frente al 41,7% obtenido con ovocitos frescos. Este estudio confirma definitivamente observaciones anteriores acerca de la no alteración del potencial de los ovocitos vitrificados para desarrollarse en embriones competentes capaces de generar gestaciones evolutivas en una proporción similar a los ovocitos frescos.

Debido al gran potencial de los ovocitos vitrificados, y de manera similar a lo que ocurre con las donaciones en fresco, frecuentemente, tras la transferencia embrionaria, se dispone de embriones viables adicionales, aptos para ser vitrificados para futuras transferencias. En este caso se requiere de una doble vitrificación, primero en estadio de ovocito MII y posteriormente en estadio embrionario ya sea temprano en día 3 o en estadio de blastocisto. En una publicación reciente, nuestro grupo ha demostrado que la doble vitrificación no tiene ningún efecto en la tasa de parto o de nacido vivo (Cobo *et al.*, 2013). Este estudio incluyó 796 embriones vitrificados generados a partir de ovocitos vitrificados (N=471 ciclos) y 4394 embriones vitrificados generados a partir de ovocitos frescos (N= 2629 ciclos). La tasa global de supervivencia fue 97,2% (IC95%: 95,9-98,6) vs. 95,7% (IC95%: 94,9-96,4), para doblemente vitrificados *versus* vitrificados una sola vez respectivamente, estadísticamente no significativa. La tasa de parto por ciclo de desvitrificación fue de 33,8% y 30,6%, no significativa estadísticamente. Tal y como enseña la Odds ratio de la tasa de parto, la doble vitrificación no tuvo efecto sobre los embriones independientemente de si éstos se encontraban en día 3 de desarrollo o en estadio de blastocisto (OR = 0,9; IC95%: 0,7-1,2). Este hallazgo tiene gran repercusión en la tasa acumulada para un solo ciclo de ovodonación. Así, la tasa de gestación evolutiva acumulada por ciclo se puede incrementar a un 84,8% tras una segunda criotransferencia, a un 92,8% y 94,8% tras tres y cuatro criotransferencias respectivamente.

En nuestra institución, el banco de ovocitos, es actualmente una parte integral de nuestra rutina clínica, con más de 30000 ovocitos vitrificados donados, aportando un impacto tremendamente positivo en la logística del programa, equiparando los resultados con los conseguidos con ovocitos frescos, lo que ha redundado en un alto grado de satisfacción en las pacientes. Con la asignación de ovocitos criopreservados, no es necesario que las pacientes entren en lista de espera, y por supuesto tampoco es necesaria la sincronización donante-receptora.

La vitrificación de ovocitos se ha aplicado con éxito en países con una legislación muy restrictiva en la que se limita el número de ovocitos a inseminar y por ende se dispone de un número extra de ovocitos el día de la punción, como era el caso de Italia hasta hace sólo un año. Rienzi y colaboradores han publicado su experiencia con la vitrificación de ovocitos en este tipo de situación (Rienzi *et al.*, 2010). Estos autores concluyen que el procedimiento de vitrificación de ovocitos seguida por ICSI no es inferior al procedimiento de inseminación fresco, en lo que respecta a las tasas de

fecundación y desarrollo embrionario. Por otra parte, la tasa de gestación clínica es comparable a la obtenida con ovocitos frescos, incluso con un número restringido de ovocitos disponibles para la inseminación.

Contribución de la vitrificación de ovocitos a la Preservación de la Fertilidad

Existe un número cada vez más grande de mujeres que deciden posponer la maternidad y que por tanto son candidatas a vitrificar ovocitos. Se puede decir que ésta es una indicación por razones no médicas, aunque este término no se ajusta a la realidad, ya que si lo analizamos detenidamente, el declive en la fertilidad debido a la edad, puede a largo plazo convertirse en una indicación médica. Esta indicación también se conoce como “social”, aunque este término se ha considerado en muchos círculos como un término peyorativo, ya que en opinión de muchos, no hace justicia a las razones que motivan cada vez más a muchas mujeres a tomar la decisión de postergar la maternidad. Sin lugar a dudas, el impacto social y las connotaciones éticas de esta alternativa, merecen ser analizados profundamente. Existen en la actualidad algunas publicaciones que analizan este aspecto. Por otra parte, existen otras condiciones clínicas aparte del cáncer como la endometriosis, síndrome de Turner (Oktay *et al.*, 2010) o por causa iatrogénica como la necesidad de una anexectomía (García-Velasco *et al.*, 2013).

Vitrificación de embriones y blastocistos

La amplia experiencia de IVI Valencia en la aplicación del método de Cryotop® en la vitrificación de ovocitos (Cobo *et al.*, 2008; Cobo *et al.*, 2008; Cobo *et al.*, 2010; Cobo *et al.*, 2011) permitió abordar el estudio observacional para describir los resultados obtenidos después de la vitrificación con el método de Cryotop® aplicado a embriones en desarrollo temprano y blastocistos en el programa de FIV. Además se analizó el impacto del grado de desarrollo y la calidad embrionaria, así como el origen de los embriones (procedentes de ovocitos de ciclos de donación u ovocitos propios de los pacientes) y la preparación del endometrio para la transferencia de embriones en el resultado final. Se analizaron los datos computarizados de todos los pacientes cuyos embriones vitrificados se desvitrificaron de enero de 2007 a diciembre de 2010. Debido a la naturaleza retrospectiva del estudio, no se solicitó la aprobación de la Junta de Revisión Institucional. Un total de 3150 ciclos de desvitrificación fueron objeto de análisis, incluidos los de los pacientes infértiles cuyos embriones se obtuvieron a partir de sus propios ovocitos (1685 ciclos) y los pacientes beneficiarios de ovocitos de donantes (1465 ciclos). La criopreservación de embriones se había realizado en día 2,

día 3, día 5 o 6 de desarrollo (147, 1725, 675, y 603 ciclos de desvitrificación, respectivamente). La política de criopreservación de embriones se basó en la calidad morfológica de los embriones sobrantes después de la transferencia embrionaria en fresco, o en algunos casos todos los embriones de buena calidad fueron criopreservados debido al riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, a la alteración de patrón del endometrio, o ante elevados niveles de progesterona. Los embriones se clasificaron morfológicamente de acuerdo a los criterios de ASEBIR, con ligeras modificaciones. La tasa de supervivencia en embriones de día 2 y día 3 de desarrollo era ligeramente inferior a la observada en la etapa de blastocisto, aunque no se detectó ningún impacto en las tasas de nacidos vivos. La ausencia de variabilidad en la evaluación morfológica antes y después de la vitrificación es otro indicador de la seguridad del método de criopreservación que empleamos. La alta tasa de reexpansión observada en blastocistos y su apariencia morfológica después de la vitrificación también es evidencia de la falta de los daños causados durante la vitrificación. La alta eficiencia de esta tecnología también se ha demostrado en la vitrificación de blastocistos tras la biopsia de trofoectodermo (Schoolcraft *et al.*, 2010). Otros autores han publicado similares resultados utilizando el sistema Cryotop® (Hiraoka *et al.*, 2004; Stehlik *et al.*, 2005; Kuwayama *et al.*, 2005; Liebermann y Tucker, 2006).

En conclusión, la vitrificación mediante el sistema Cryotop® aporta elevadas garantías de éxito en todas las etapas del desarrollo porque tiene altas tasas de supervivencia y unas tasas por ciclo de desvitrificación similares a las conseguidas con embriones frescos.

1.3.3.- Vitrificación de ovocitos en pacientes con baja respuesta

Los beneficios de la vitrificación de ovocitos también se han demostrado en dos poblaciones infértiles como las pacientes con riesgo de sufrir el síndrome de hiperestimulación (Herrero *et al.*, 2011) y la baja respuesta (Cobo *et al.*, 2012). En este último estudio se acumularon ovocitos vitrificados de pacientes bajo respondedoras (N= 242 pacientes, 594 ciclos de estimulación ovárica y 1192 ovocitos), obtenidos tras varios ciclos de estimulación ovárica controlada y los añadieron al ciclo de ovocitos frescos (N=689 obtenidos tras 210 ciclos) para microinyectarlos todos simultáneamente. El objetivo de esta estrategia era el de construir una cohorte grande con un mayor número de ovocitos a inseminar para asemejar la situación de la baja respondedora a la de una normo respondedora: media de 2,5 ciclos de estimulación en los que se vitrificaron ovocitos en cada ciclo, con el fin de crear una cohorte mayor y así incrementar el número de ovocitos microinyectados, con una media 7,02 ovocitos microinyectados por ciclo de ICSI. De esta forma, la selección embrionaria puede

hacerse en condiciones más equiparables. Con esta estrategia se obtuvo una tasa acumulada de recién nacido vivo estadísticamente superior a la obtenida con la estrategia convencional que era inseminar los ovocitos y la transferir embriones en ciclos en fresco, es decir, cada vez que se estimulaba a la paciente (42,9% vs. 27,4% de recién nacido vivo). Una de las principales desventajas de la baja respondedora es su baja probabilidad de llegar a la transferencia embrionaria. En este estudio la tasa de cancelación de la transferencia fue significativamente menor en el grupo de pacientes que acumularon ovocitos (9,1% vs. 34,0%). Por otra parte, la tasa acumulada de recién nacido vivo fue mayor para las pacientes que vitrificaron ovocitos (36,4% vs 23,7%). Estos resultados, ponen de manifiesto que la acumulación de ovocitos es una estrategia útil en la baja respondedora, logrando equiparar los resultados a los de la normo respondedora.

Corroboran estos datos los resultados publicados sobre la tasa acumulada tras criotransferencias de embriones derivados de ovocitos vitrificados en su programa de fecundación *in vitro* (Ubaldi *et al.*, 2010). En este estudio se analizaron resultados de 104 primeros ciclos de desvitrificación y 11 segundos ciclos en 184 ciclos de fecundación *in vitro*. La tasa de gestación evolutiva de los ciclos en fresco fue de 37,4% ascendiendo a una tasa acumulada de 53,3% tras las criotransferencias. Adicionalmente, uno de los hallazgos más destacables de este estudio es la relación inversa que se estableció entre la edad de la paciente (>40 años) y los resultados clínicos (Ubaldi *et al.*, 2010). Este estudio demuestra que se pueden conseguir altas tasas acumuladas con ayuda de la vitrificación de ovocitos en una población típicamente infértil y que la edad materna es un factor determinante.

Las pacientes de edad avanzada no sólo generan un alto porcentaje de embriones aneuploides, sino también un menor número de embriones como consecuencia directa de la mala respuesta y reserva ovárica y calidad de los ovocitos (Broekmans *et al.*, 2007), de ahí su baja probabilidad de llegar a la transferencia.

La baja respondedora de edad avanzada sometida a análisis de PGS también se ha beneficiado de esta estrategia (Milan *et al.*, 2010; Chatziparasidou *et al.*, 2013). Aunque el resultado final se esperaría similar, tanto en la acumulación de ovocitos de varios ciclos de estimulación y siendo todos los embriones resultantes incluidos en un único análisis de PGS como cuando se someten a varios ciclos de PGS de estimulaciones únicas, no obstante, la experiencia de nuestro centro es que los pacientes son más propensos a acumular ovocitos vitrificados u embriones en varios ciclos de estimulación ovárica que a repetir varios ciclos de PGS, siendo por lo tanto una buena alternativa para mejorar los resultados clínicos en pacientes bajo

respondedoras. Otro estudio multicéntrico en el que ha participado nuestro centro junto a otros dos centros italianos también demuestra que la vitrificación de ovocitos puede ser aplicada con éxito en pacientes infértiles (Rienzi *et al.*, 2012). Éste fue un estudio prospectivo longitudinal de cohortes incluyendo cerca de 3000 ovocitos vitrificados en el que se evaluó la eficacia y reproducibilidad de la vitrificación de ovocitos. En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes centros, con relación a la supervivencia, fecundación y desarrollo embrionario, lo que refleja la reproducibilidad del método; siendo las cifras globales 84,7% para supervivencia, 75,2% para fecundación y 48,1% para embriones óptimos. La tasa de parto fue de 26,3% por ciclo y 29,4% por transferencia. La tasa de recién nacido vivo fue de 15,8% por embrión transferido. Como factores determinantes del éxito se encontraron las variables: edad de la paciente, número de ovocitos vitrificados y estadio de desarrollo del embrión transferido; alcanzando cifras estadísticamente significativas cuando las pacientes tenían menos de 38 años de edad, vitrificaron 8 o más ovocitos y se les realizó una transferencia de blastocisto (Rienzi *et al.*, 2012). Se consideran por tanto que estos hallazgos serán de gran utilidad a la hora de aconsejar a las pacientes que deseen preservar su fertilidad mediante esta técnica.

De esta experiencia, se pueden extraer conclusiones que pueden ser de gran utilidad a la hora de indicar la vitrificación de ovocitos en diferentes grupos de pacientes.

La correlación entre la supervivencia y la edad, no es más que un reflejo de la calidad ovocitaria, que como es bien sabido declina considerablemente con la edad. De ahí que no sorprende el comportamiento de los ovocitos de pacientes mayores con respecto a la vitrificación.

Por otra parte los ovocitos que sobreviven, fecundan y evolucionan conservan su potencial para implantar y dar lugar a gestación de una manera similar a la que se observa con ovocitos frescos, como así lo indica la tasa de implantación. Una lectura similar, sería que la proporción de ovocitos que se pierden durante la vitrificación (los que no sobreviven), supone un primer filtro para los ovocitos de peor calidad, incapaces de sobrellevar el procedimiento con éxito, sobreviviendo solo los de mejor calidad. Siguiendo con este análisis, solo los mejores serán fecundados correctamente y podrán dividirse adecuadamente dando lugar a embriones capaces de implantar. En el caso de los ovocitos frescos, es muy probable que la mayoría de ellos, incluso los de peor calidad sean capaces de fecundarse y dividirse, pero sin embargo no todos ellos serán capaces de implantar y dar lugar a gestaciones viables, hecho que se ve

compensado en el grupo de los vitrificados ya que en éste, solo evolucionan los de mejor pronóstico.

También sugiere que lo más aconsejable es informar a las pacientes de que debemos garantizar un número razonable de ovocitos vitrificados con el fin de incrementar las posibilidades de éxito, por lo que probablemente se requiera más de un ciclo de estimulación.

02

JUSTIFICACIÓN

Hipótesis:

Los resultados de un ciclo de PGS pueden verse influenciados por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Para ello es necesario que como resultado de la estimulación ovárica se obtenga un número mínimo de ovocitos.

La acumulación de ovocitos vitrificados previa al ciclo de PGS se ha propuesto como una posible estrategia que podría incrementar el número de embriones disponible para su análisis en un único ciclo de diagnóstico y aumentar la probabilidad de obtener al menos un embrión euploide para transferencia y de conseguir una gestación evolutiva.

Este estudio retrospectivo pretende evaluar la eficacia del programa de PGS en sus diferentes estrategias y en pacientes bajo respondedoras después de varios ciclos de estimulación ovárica y acumulación de ovocitos previos al análisis genético, en combinación o no de embriones obtenidos de ovocitos frescos de un ciclo de ICSI.

Para ello partimos de la hipótesis de que la vitrificación no va a tener un efecto deletéreo en los ovocitos, y que su viabilidad va a ser similar a la de los ovocitos frescos.

03

OBJETIVOS

Objetivo principal

3.1

Evaluar el efecto de la estrategia de vitrificación de ovocitos y su combinación con ciclos de ovocitos frescos en la optimización de los resultados de un programa de PGS.

Objetivos secundarios

3.2

-
1. Evaluar la supervivencia de los ovocitos vitrificados en ciclos con todos los ovocitos vitrificados y en ciclos mixtos con ovocitos frescos y vitrificados.
 2. Evaluar el efecto de la vitrificación en la tasa de fecundación y desarrollo embrionario.
 3. Evaluar el efecto de la vitrificación en la incidencia y diferentes tipos de aneuploidías.
 4. Evaluar el rendimiento en términos de blastocistos euploides obtenidos procedentes de ovocito frescos y de ovocitos vitrificados.
 5. Evaluar el impacto clínico de estas estrategias en los resultados de mujeres con baja respuesta y comparar los resultados obtenidos acumulando un número de ovocitos similar al de mujeres con norma respuesta.
 6. Estimar el número de estimulaciones máximo recomendable, teniendo en cuenta la probabilidad de obtener un embrión normal y de obtener gestación evolutiva.

04

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de tesis doctoral pretende evaluar mediante un estudio retrospectivo la eficacia del programa de PGS en sus diferentes estrategias y en pacientes bajo respondedoras después de varios ciclos de estimulación ovárica y acumulación de ovocitos previos al análisis genético, en combinación o no de embriones obtenidos de ovocitos frescos de un ciclo de ICSI.

Diseño del estudio

4.1

4.1.1.- Pacientes. En este estudio retrospectivo se incluyeron 513 ciclos de pacientes del programa de DGP para *screening* de aneuploidías en el periodo de tiempo comprendido del 1-1-2011 al 31-12-2014, con biopsia embrionaria en D3 y diagnóstico mediante arrays de CGH.

Las pacientes fueron informadas de las posibilidades y limitaciones del diagnóstico genético preimplantacional para el estudio de aneuploidías y se les entregó el consentimiento informado correspondiente.

4.1.2.- Indicaciones. Las indicaciones clínicas para PGS por *screening* de aneuploidías fueron:

- Edad materna avanzada
- Aborto de repetición
- Fallo de implantación
- Factor masculino
- FISH anormal de espermatozoides
- Cromosomopatía previa
- Anomalía numérica
- *Screening* de aneuploidías por causas mixtas

4.1.3.- Estrategias. En este estudio se incluirían diferentes tipos de ciclos:

- ciclos de PGS donde todos los embriones proceden de ovocitos frescos.
- ciclos de PGS con uno o varios ciclos de vitrificación de ovocitos donde todos los embriones proceden de ovocitos desvitrificados.
- ciclos mixtos de ovocitos frescos y desvitrificados.

Se entiende por ciclo de PGS al conjunto de todos los procedimientos destinados a obtener embriones que van a ser analizados en un solo ensayo o análisis, pudiendo proceder de una o varias estimulaciones y/o vitrificación de ovocitos.

Base de datos y análisis estadístico

4.2

El Comité de Proyectos de Investigación Clínica y el Comité Ético del Instituto Valenciano de Infertilidad aprobó este estudio retrospectivo con número de código de proyecto asignado 1501-VLC-001-PB.

Los datos procedentes del SIVIS, base de datos y programa de gestión clínica del IVI, fueron exportados a Excel 2013, donde se realizaron las acciones pertinentes para revisar la calidad de los mismos, corregir posibles errores, y posteriormente, en SPSS 17.0 proceder al análisis estadístico. Estos datos fueron anonimizados, de forma que se ocultó la información que pudiese usarse para identificar pacientes concretos en los listados. La exportación desde SIVIS incluyó los casos clínicos comprendidos en el periodo del 1-1-2011 al 31-12-2014.

Se construyó una base de datos que comprendía todas las variables analizadas por paciente incluida en el estudio.

a) Estadística descriptiva: se calcularon las medias, proporciones, y sus correspondientes intervalos de confianza de las variables que describan la población de pacientes de cada grupo incluido en el estudio, con la intención de evaluar la distribución de los datos (análisis exploratorio de datos), localizar valores erróneos y corregirlos o eliminarlos, hasta tener la seguridad de la calidad de los mismos.

b) Se compararon las medias y las proporciones de las variables descriptivas de ciclos y pacientes, mediante test ANOVA y Chi cuadrado, para variables cuantitativas y categóricas respectivamente para cada categoría de estudio. Se asume distribución normal de las mismas, dado el tamaño muestral empleado en este estudio retrospectivo, por lo que no fue necesario realizar pruebas de normalidad, a menos que se detecte alguna categoría con un número muy bajo (<30) de casos.

c) Se comparó el efecto de las diferentes estrategias de gestión de los ciclos de PGS, sobre la rentabilidad media medida en embriones euploides por MII iniciales y microinyectados.

d) Se comparó el efecto de la diferente estrategia de gestión de los ciclos de PGS, sobre la tasa de supervivencia, fecundación y variables relacionadas con el desarrollo embrionario, para variables cuantitativas y categóricas.

e) Se evaluó y estimó la probabilidad de obtener al menos un blastocisto euploide y gestación evolutiva en función del origen de los ovocitos, mediante T-test y regresión logística si fuera necesario.

f) Se estimó el número de ciclos de estimulación necesario hasta lograr el primer embrión euploide en función de la estrategia utilizada.

Se definió como gestación positiva el incremento en la concentración de β -HCG en suero 14 días después de la transferencia. El embarazo fue considerado gestación clínica cuando se observó como mínimo un saco intrauterino mediante ecografía transvaginal tras tres semanas de la transferencia.

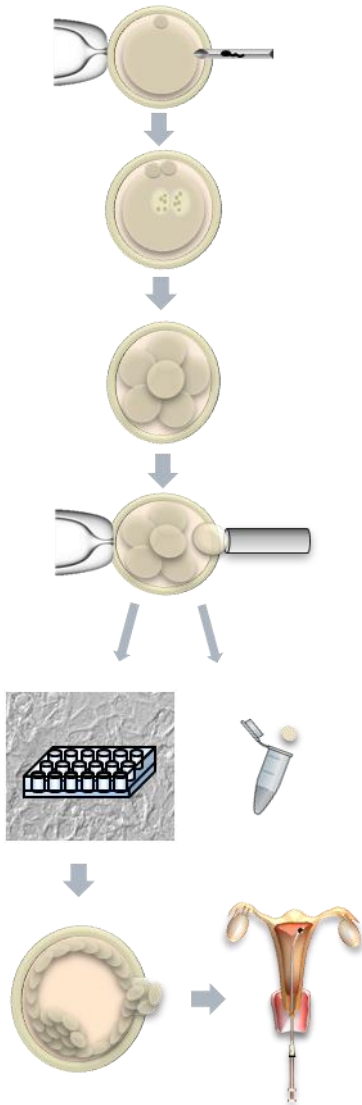
La tasa de implantación se calculó como la ratio entre el número de sacos gestacionales determinados ecográficamente dividido entre el número total de embriones transferidos.

Se definió como gestación evolutiva cuando los casos de gestación clínica positiva fueron confirmados mediante ecografía al superar el primer trimestre, en la semana 12 de gestación.

El aborto clínico se definió como la pérdida del embarazo cuando éste había sido confirmado ecográficamente.

Cronología de un ciclo de PGS con biopsia embrionaria en D3 de desarrollo

4.3



- Día 0: aspiración folicular y/o desvitrificación de ovocitos y fecundación
- Día 1: valoración de la fecundación a las 16-19 horas
- Día 2: valoración del desarrollo embrionario a las 44-47 horas
- Día 3: biopsia embrionaria e inicio del diagnóstico mediante aCGH
- Día 4: valoración del desarrollo embrionario (opcional)
- Día 5: selección de los embriones normales o no afectados y con buena evolución para la transferencia y/o criopreservación

Estimulación ovárica, fecundación *in vitro* y cultivo embrionario

4.4

Para realizar a un ciclo de PGS, en primer lugar, la pareja debe someterse a un tratamiento de FIV, en el que se realiza una estimulación ovárica y se recuperan los ovocitos mediante punción transvaginal guiada por ecografía.

La estimulación ovárica de las pacientes se realizó mediante FSH (hormona foliculoestimulante) o hMG (hormona gonadotrópica menopáusica humana) siguiendo los protocolos establecidos en nuestro centro. La supresión hipofisaria en pacientes que seguían una estimulación de pauta larga se realizó con agonistas de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) o con antagonistas de la GnRH cuando seguían una pauta corta. La monitorización del crecimiento folicular se realizó mediante controles seriados de ecografía transvaginal y niveles séricos de estradiol (E2). Las dosis de gonadotropinas se ajustaron según las necesidades de cada mujer.

La desencadenación de la ovulación mediante la administración de hCG (hormona gonadotropina coriónica, 6500 UI, Ovitrelle®, Merk-Serono, Madrid, España) o con un análogo de la GnRH (Decapeptyl®, Decapeptyl®, Ipsen Pharma, Barcelona, España) se realizó cuando al menos un folículo alcanzó 18-18,5mm de diámetro medio, programando la punción folicular 36 horas más tarde. El último día de estimulación, se llevaron a cabo determinaciones hormonales séricas de E2 y progesterona (P4).

En los casos de ciclos diferidos se realizó una preparación endometrial con valerianato de estradiol, y tanto la línea como el grosor endometrial se midieron de manera rutinaria antes de la transferencia embrionaria. A todas las pacientes se les suministró progesterona micronizada vía vaginal (Progeffik®; Effik, Madrid, España) como soporte de la fase lútea hasta el día de la prueba de embarazo y hasta los 3 meses siguientes cuando resultó positivo.

Para la fecundación *in vitro*, la punción folicular se realizó por vía transvaginal guiada por ecografía (Muñoz *et al.*, 2005). Los complejos cúmulo-corona-ovocito se identificaron por inspección directa del líquido folicular bajo visión estereoscópica (bajo una lupa binocular). Una vez recuperados los ovocitos mediante punción folicular fueron mantenidos en cultivo durante 4 horas en un incubador convencional a 37°C y 5,4% CO₂. La denudación de los ovocitos se realizó mecánica y enzimáticamente con hialuronidasa (Sydney IVF Hyaluronidase, Cook® Medical, Queensland, Australia), procediéndose después a realizar el ICSI de los ovocitos MII 4 horas post-punción.

Los ovocitos fueron inseminados mediante ICSI ya que facilita los pasos posteriores de biopsia embrionaria y garantiza una tasa de fecundación elevada al asegurarnos que el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida y, sobre todo, para evitar la posible contaminación de material genético masculino procedente de los espermatozoides que rodean y se quedan pegados a la zona pelúcida durante una inseminación convencional.

Transcurridas 16-18 horas de la microinyección se evaluó la correcta fecundación de los ovocitos. Los cigotos obtenidos fueron cultivados hasta día 3 de desarrollo embrionario en gotas de Cleavage (Sydney IVF Cleavage Medium, Cook® Medical, Queensland, Australia) recubiertas de aceite mineral (LifeGlobal®, Guilford, USA) previamente gaseadas y atemperadas.

La biopsia embrionaria se realizó en día 3 de desarrollo embrionario.

Se procedió a la biopsia de una única blastómera en todos los embriones que tuvieran un correcto desarrollo desde día 2 y que tuvieran al menos 5 o 6 células y menos de un 25% de fragmentación (Mir *et al.*, 2013).

Tras la biopsia los embriones fueron cocultivados en pocillos tapizados con células epiteliales de endometrio previamente crecidos. Para la técnica del cocultivo se necesitan placas de pocillos individuales previamente sembradas con células epitelio-glandulares de una biopsia de endometrio en fase secretora, de forma que estas células formen una monocapa continua. Por tanto, los embriones fueron cocultivados después de la biopsia embrionaria individualmente, es decir, un embrión por pocillo, sobre la monocapa crecida con células del epitelio glandular de endometrio, en fase secretora a, a 37°C, en una atmósfera de un 5,4% de CO₂, tal y como se describe en Mercader *et al.*, 2006 (Mercader *et al.*, 2006). Se empleó como soporte placas de cultivo celular de 24 pocillos (Falcon®, NY, USA). Cada pocillo tapizado contenía 600µL de medio CCM™ (Coculture Medium, Vitrolife, Göteborg, Suecia) previamente gaseado y atemperado a 37°C. Es importante que la monocapa sea homogénea en toda la superficie del pocillo.

La transferencia embrionaria de embriones euploides se realizó en día 5 de desarrollo embionario.

A continuación se describen con más detalle los protocolos más específicos y relevantes del presente estudio.

Vitrificación y desvitrificación de ovocitos y embriones

4.5

4.5.1.- Materiales

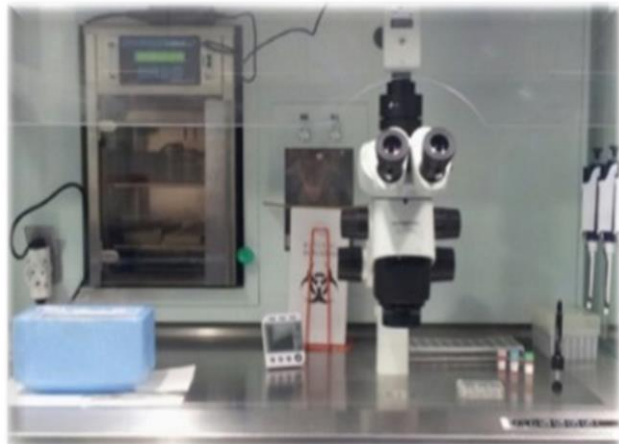
- Vaso Dewar (Thermo-Flask®, Sigma-Aldrich, Inc., San Luis, Miruri, EE.UU.)
- Pipeta de desnudación (Cook® Flexipet® Adjustable Handle)
- Capilares flexibles (Cook® Flexipet® Pipette)
- Placas Falcon 1008 (Falcon®, Becton Dickinson Labware, Flanklyn Lakes, Nueva Jersey, EE.UU)
- Reloj temporizador (timer)
- Pinzas
- Contenedor de poliestireno expandido para nitrógeno líquido para trabajar en la cabina de flujo laminar
- Recipiente de acero inoxidable esterilizable en autoclave y acoplable al contenedor de poliestiteno expandido
- Placa de seis pocillos, preferiblemente, de fondo cónico (Repro Plate®; KITAZATO® BioPharma, Tokio, Japón)
- Cryotop® (KITAZATO® BioPharma, Tokio, Japón)

4.5.2.- Soluciones

Se utilizaron medios de fabricación comercial (KITAZATO® BioPharma, Tokio, Japón).

Soluciones de vitrificación

- Solución de lavado, Basic Solution (BS): medio tampón Hepes TCM-199 (M199) suplementado con Hidroxipropil Celulosa (HPC). (Sólo para ovocitos).
- Solución de equilibrio, Equilibration Solution (ES): contiene 7,5% de etilenglicol (EG) y 7,5% de mimetilsulfóxido (DMSO) disuelto en BS
- Solución de vitrificación, Vitrification Solution (VS): contiene 15% de etilenglicol, 15% de DMSO y 0,5M trealosa disuelto en BS



Soluciones de desvitrificación

- Solución de descongelación, Basic Solution (BS): 0,1M trealosa disuelta en WS
- Solución de dilución, Dilution Solution (DS): 0,5M trealosa disuelta en WS
- Solución de lavado, Washing Solution (WS): medio tampón Hepes TCM-199 (M199) suplementado con HPC

4.5.3.- Protocolos

Vitrificación

El proceso de vitrificación se realizó con la campana de flujo laminar a temperatura ambiente (25-27°C). Antes de comenzar fue importante atemperar 1 hora previa a su uso los viales que contienen las soluciones de vitrificación (BS, ES y VS) y llenar completamente de nitrógeno líquido el recipiente de acero inoxidable acoplado al contenedor de poliestireno.

El primer paso del protocolo, *el equilibrio*, es diferente en ovocitos y en embriones:

Ovocitos

- 1- Se pipeteó 20 μ L de BS en el primer pocillo de la placa Repro Plate® y 300 μ L de VS en los pocillos 2 y 3.
- 2- Se colocaron los ovocitos, hasta 16, con el mínimo volumen de medio en el fondo del pocillo con BS. Es importante fijarse en el ancho del espacio perivitelino con respecto al espesor de la zona pelúcida.
- 3- Se añadieron 20 μ L de ES lentamente alrededor de la gota de BS. Esperar 3 min.
- 4- Se añadieron otros 20 μ L de ES y se esperaron otros 3 min más.
- 5- Se añadieron 240 μ L de ES y se esperaron 6-9 min. Se requería que los ovocitos recuperaran su volumen completamente.



Embriones y blastocistos

- 1- Se pipetó 300 μ L de ES en el primer pocillo de la placa Repro Plate® y 300 μ L de VS en los pocillos 2 y 3.
- 2- Se colocó el embrión con el mínimo volumen de medio en la parte superior central del pocillo con ES.
- 3- El tiempo de equilibrio fue de 10-12 min para embriones y de 12-15 min para blastocistos.

Los siguientes pasos son los mismos para ovocitos como para embriones:

1- Tras el equilibrio se aspiraron los ovocitos/embriones y se depositaron en la superficie del primer pocillo con VS. Se aspiraron los restos de ES que les rodeaba, y se eliminó fuera del pocillo. Se dispusieron los ovocitos/embriones en la parte inferior del pocillo y se prosiguió con la eliminación de los restos de ES de su alrededor, cambiándolos también de posición. Todo este proceso se debe hacer en 30 segundos.

2- Se aspiraron los ovocitos/embriones y se llevaron al siguiente pocillo de VS, previo lavado del capilar con medio limpio de este pocillo. Durante 30 segundos, se cambiaron varias veces de sitio repitiendo constantemente el proceso de lavado para eliminar bien la solución circundante.

3- Se aspiraron los ovocitos/embriones en la punta del capilar y se cargaron en la lengüeta del Cryotop® con el mínimo volumen posible bajo lupa binocular, aspirando el exceso de VS. No deben cargarse más de 4 ovocitos por Cryotop®. Los blastocistos normales se vitrificaron en Cryotop® individuales, para poder tenerlos identificados en todo momento.

4- Se sumergió el Cryotop® directa e inmediatamente en nitrógeno líquido. Sin sacar del nitrógeno, se adaptó el protector de plástico del Cryotop® y se almacenaron en el banco.



Desvitrificación

El proceso de desvitrificación se realiza también a temperatura ambiente. Por lo que se atemperaron los medios de dilución y las soluciones de lavado previamente a la descongelación. La solución de descongelación (TS) se debe utilizar a 37°C. Se debe llenar completamente de nitrógeno líquido el recipiente de acero inoxidable acoplado al contenedor de poliestireno. Previamente se ha de recuperar los Cryotop® de la paciente a desvitrificar del banco de almacenamiento y mantenerlos sumergidos en nitrógeno líquido hasta el momento de su desvitrificación evitando cambios de temperatura.

En la desvitrificación todas las etapas del protocolo son iguales para ovocitos, embriones y blastocistos:

1- Se pipeteó 300 μ L de DS en el primer pocillo de la placa Replo Plate y 300 μ L de WS en el segundo y tercer pocillo.

2- Se sacó el Cryotop® del nitrógeno líquido con un movimiento recto, directo y muy rápido para sumergirlo directamente en la placa Petri con TS. La solución de descongelación debía estar a 37°C para asegurar que la velocidad de desvitrificación fuera la deseada. Es por ello que se prefiere utilizar un dispositivo “calienta placas” disponible en el mercado para tal fin.

3- Se visualizaron los ovocitos/embriones bajo la lupa binocular e inmediatamente se inició la cuenta atrás de 1 min. No se tocaron los embriones durante los primeros 40 seg. Transcurrido este tiempo, se deslizó el Cryotop® suavemente en sentido horizontal en el fondo de la placa. Si los ovocitos/embriones continuaban todavía adheridos a la lengüeta se dispensó medio sobre ellos con el capilar. Si esto no fue suficiente se trató de desprenderlos tocando el Cryotop® lateralmente con la punta del capilar de la pipeta de desnudación.

4- Tras 1 min sumergidos en TS, se aspiraron los ovocitos/embriones y transferirlos al pocillo con DS. Asegurándose de verter sobre ellos el volumen correspondiente a más o menos 1 cm del capilar. Se esperó 3 min.

5- Transcurrido ese tiempo, se aspiraron los ovocitos/embriones a una distancia de unos 1 cm de la punta del capilar.

6- Se llevó el capilar al primer pocillo con WS y se liberó primero la columna de 1 cm de DS y a continuación los ovocitos/embriones. Se observó claramente la diferencia de densidad de ambos medio. Se esperó 5 min.

7- Se aspiraron los ovocitos/embriones con una columna de 1 cm de WS y se transfirieron al segundo pocillo de lavado. Esperar 1 min.

8- Se llevaron los ovocitos/embriones a una placa de medio de cultivo adecuado para dicho estadio y mantener a 37°C. Se evaluó la supervivencia.

Biopsia embrionaria

4.6

4.6.1.- Materiales y equipamiento

- Microscopio invertido NIKON/OLYMPUS, equipado con objetivo de 40X Hoffman para la biopsia embrionaria y objetivo de 10X de contraste de fases
- Platina calefactora TOKAI-HIT (MATF-U 5530)
- 2 micromanipuladores hidráulicos NARISHIGE (MO-188)
- 2 micromanipuladores motorizados NARISHIGE (MM-188)
- 1 microinyector Eppendorf® Cell Tram Vario
- 1 microinyector Eppendorf® Cell Tram Oil

- Lupa binocular
- Pipeta Holding: con 100 μm de diámetro externo y 20 μm de diámetro interno, ángulo 30° (Cook® Medical, Limerick, Irlanda) y pipeta de Aspiración con 30-35 μm diámetro interno y ángulo 30° (Humagen™, Charlottesville, USA)

4.6.2.- Medios y soluciones

- G-PGD™ Biopsy Medium, medio de biopsia sin calcio (Ca^{2+}) ni magnesio (Mg^{2+}), se utiliza suplementado al 5% con seroalbúmina humana (HSA-solution™, Vitrolife, Göteborg, Suecia) atemperado a 37°C y nunca gaseado (Vitrolife, Göteborg, Suecia).
- Aceite mineral: Life®Global, Guilford, USA.
- Medios de cultivo Cleavage® (Sydney IVF Cleavage Medium, Cook® Medical, Queensland, Australia) y CCM™ (Coculture Medium, Vitrolife, Göteborg, Suecia).

4.6.3.- Protocolo biopsia embrionaria en D3

La biopsia embrionaria se realizó en día 3 de desarrollo embrionario en embriones con 5 o más blastómeras y menos de un 25% de grado de fragmentación.

Se prepararon las placas de biopsia embrionaria con 2 microgotas centrales de 35 μL de medio de biopsia G-PGD™ atemperado 20 minutos antes a 37°C, donde se dispusieron los embriones previamente lavados en 2 microgotas situadas al lado. Además se añadieron otras dos microgotas más alejadas para purgar y equilibrar la pipeta de aspiración entre la biopsia de un embrión a otro. Se recubrió con aceite mineral atemperado a 37°C (Life®Global, Guilford, USA).

Así, los embriones se dispusieron en gotas del medio libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y la zona pelúcida fue perforada utilizando un sistema de láser acoplado al microscopio (Octax Laser Shot™, Fertilase®, Herbron, Alemania).

Blastómeras con núcleos visibles, núcleos interfásicos, fueron biopsiadas por aspiración utilizando una pipeta biselada con un diámetro interno de 30 a 35 μm y un diámetro externo de 40 a 45 μm (Humagen™, Charlottesville, USA).

Se biopsió y analizó una célula por embrión.

Después de realizar el orificio en la zona pelúcida mediante pulsos de láser los pasos a seguir fueron los siguientes:

- 1.- Se aproximó la pipeta de aspiración al orificio y se aspiró suavemente una blastómera con núcleo único y visible (objetivo Hoffman 40X).

2.- Se retiró la pipeta de aspiración y se dejó la blastómera suelta en el medio, próxima al embrión.

3.- Se liberó el embrión de la pipeta holding con mucho cuidado para evitar que ésta aspirara la blastómera biopsiada.

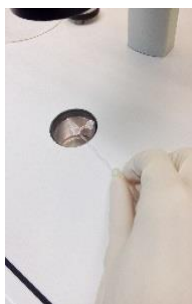
4.- Se retiraron las micropipetas y se lavó, purgó y equilibró la pipeta de aspiración en una microgota de medio de biopsia antes de proceder a la biopsia del siguiente embrión.

5.- Concluida la biopsia, se retiraron los embriones de la placa de biopsia y se lavaron los embriones repetidas veces en una placa con medio de cultivo para eliminar los restos de medio de biopsia sin Ca^{2+} y Mg^{2+} .

6.- Las blastómeras permanecieron en la placa de biopsia hasta su procesamiento posterior para el análisis.



Los embriones fueron manipulados individualmente para mantener perfectamente identificado cada embrión en cada momento y para minimizar el tiempo expuesto en el medio de biopsia, e



inmediatamente lavados varias veces en gotas de medio de cultivo (CCM™; Vitrolife, Göteborg, Sweden) para eliminar los restos de medio libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} después de la biopsia embrionaria.



A continuación las blastómeras extraídas permanecieron en sus microgotas de la placa de biopsia y, en un laboratorio contiguo al laboratorio de FIV especialmente adecuado, se introdujeron individualmente, en tubos eppendorf® de 0,2mL de PCR con 2 μL de PBS perfectamente identificados para su posterior procesamiento mediante aCGH.

Para el tubing cada blastómera se lavó en sucesivas microgotas de PBS de forma individual antes de ser introducidas en los tubos perfectamente identificados.

Análisis cromosómico mediante arrays de CGH

4.7

4.7.1.- Materiales y equipamiento

- Campana de flujo laminar con luz UV
- Campana de extracción de gases

- Centrífuga para tubos eppendorf® de PCR de 0,2mL y para tubos de 1,5mL
- Centrífuga para placas y portas 5430 (Eppendorf®, Hamburgo, Alemania)
- Centrífuga para placas miVac DNA concentrator (GeneVac. , Ipswich, UK)
- Sacnner de arrays de doble canal (TECAN, Männedorf, Suiza)
- Sistema de incubación Hybex® (SciGene, Sunnyvale, USA)
- Termociclador T3000 (Biometra®, Göttingen, Alemania)
- Baño térmico
- Agitador magnético y “peces” de 2,5 cm
- Termobloque
- Vórtex
- Cámaras de hibridación
- Cubetas de lavado de vidrio de 250mL y cestillo de 25 portaobjetos
- Tubos de PCR de 0,2mL
- Placas de 96 pocillos
- Tubos de 1,5mL Safe Lock (Eppendorf®)
- Cubreobjetos de cristal de 22x22mm

4.7.2.- Medios y soluciones

- Control positivo de amplificación (DNA genómico)
- Kit Sureplex™ de amplificación (BlueGnome)
- Kit de marcaje, Kit Labelling System™ (BlueGnome)
- DS Hybridisation buffer (BlueGnome)
- 2xSSC/50% formamida
- Plataforma de array 24sure (BlueGnome)
- Soluciones de lavado:
 - 20xSSC/ H₂O destilada, pH: 7
 - 2xSSC/ 0,05% Tween20/H₂O destilada
 - 1xSSC/H₂O destilada
 - 0,1xSSC/H₂O destilada

4.7.3.- Protocolo

Tras la recepción de los tubos eppendorf® de 0,2 mL con las blastómeras, en el Laboratorio de Genética se comenzó con una etapa de amplificación.

El proceso se realizó en condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar previamente limpiada con alcohol y con luz UV durante 10-15 minutos.

Se detallan a continuación las diferentes etapas del protocolo de arrays de CGH para el estudio de 23 pares de cromosomas utilizando la plataforma 24sure (BlueGnome, Cambridge, UK).

Amplificación genómica completa

- Tras introducir las blastómeras a amplificar en el tubo de PCR (tubing), se añadió 3µL de *Cell Extraction Buffer* a cada tubo y 5µL del mix compuesto por 4,8µL de *Dilution Buffer* y 0,2µL de *Extraction Enzyme* (Kit Sureplex™), se introdujeron los tubos en el termociclador con el ciclo de temperaturas de amplificación establecido por la casa comercial.
- Seguidamente se centrifugaron los tubos y se añadió a cada uno 5µL del mix compuesto por 4,8µL de *Pre-amplification Buffer* y 0,2µL de *Pre-amplification Enzyme* (Kit Sureplex™). Se introdujeron los tubos en el termociclador con el ciclo de temperaturas de pre-amplificación establecido por la casa comercial.
- Tras centrifugar los tubos y se añadió a cada uno 60µL del mix compuesto por 34,2µL de H₂O (Nuclease-free water), 25µL de *Amplification Buffer* y 0,8µL de *Amplification Enzyme* (Kit Sureplex™). Se introdujeron los tubos en el termociclador con el ciclo de temperaturas de amplificación establecido por la casa comercial. Todos los reactivos provenían del Kit de amplificación Sureplex™ (BlueGnome, Cambridge, UK).
- Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia/ausencia de amplicones.

Marcaje

- En una placa de 96 pocillos se dispensaron 5 µL de *Primer Solution*. A continuación, se añadieron 8 µL de DNA amplificado de cada blastómera destinando 2 pocillos al control masculino SureRef male reference (BlueGnome, Cambridge, UK) y 2 pocillos al control femenino SureRef female reference (BlueGnome, Cambridge, UK). Se introdujeron los tubos en el termociclador y se desnaturalizó el DNA a 94°C durante 5 minutos.
- Posteriormente, se extrajeron los tubos del termociclador y se pasaron inmediatamente a una gradilla refrigerada a 4°C durante 5 minutos. A continuación, se prepararon dos tubos eppendorf® de 1,5mL, uno para el mix con el fluorocromo Cy3 y otro para el mix con Cy5. En ambos tubos se añadieron 5µL de *Reaction Buffer* por muestra/control, 5µL de dCTP *mix* por muestra/control y 1µL de enzima de marcaje *Klenow* (Kit Labelling System™) por cada pocillo muestra/control. A uno de los tubos se le añadió 1µL del fluoróforo Cy3 dCTP por muestra/control y al otro 1µL

del fluoróforo Cy5 dCTP por muestra/control. Se dispensaron 12µL del mix con Cy3 a las filas impares de la placa de 96 pocillos y 12µL del mix con Cy5 a las filas pares de la placa de 96 pocillos. Esta placa se llevó al termociclador y durante 2 horas a 37°C se marcó el DNA amplificado. (Kit Labelling System™, Illumina®, Cambridge, UK).

- Se transfirieron 8µL del producto amplificado de cada blastómera a una placa de 96 pocillos. Se añadieron 16µL del mix compuesto por 5µL de *Reaction Buffer*, 5µL de *Primer solution*, 5µL de *dCTP mix* y 1µL de fluoróforo Cy3 o Cy5 dCTP (Kit Labelling system™) a cada una de las muestras.

Precipitación

- Finalizado el marcaje se extrajo la placa del termociclador. Se dispensaron 25µL de *COT Human DNA*. Se combinó cada pocillo de Cy3 con los 25 µL marcado con Cy5 que le correspondían. Se combinaron los 25µL del contenido de la primera fila de la placa marcada con Cy3 con la segunda fila de la placa marcada con Cy5, la tercera con la cuarta y así sucesivamente. Se llevó a cabo la precipitación del DNA mediante centrifugación en vacío a 75°C durante 1h (centrífuga para placas miVac DNA concentrator (GeneVac, Ipswich, UK), (Kit de precipitación, BlueGnome, Cambridge, UK).

Hibridación

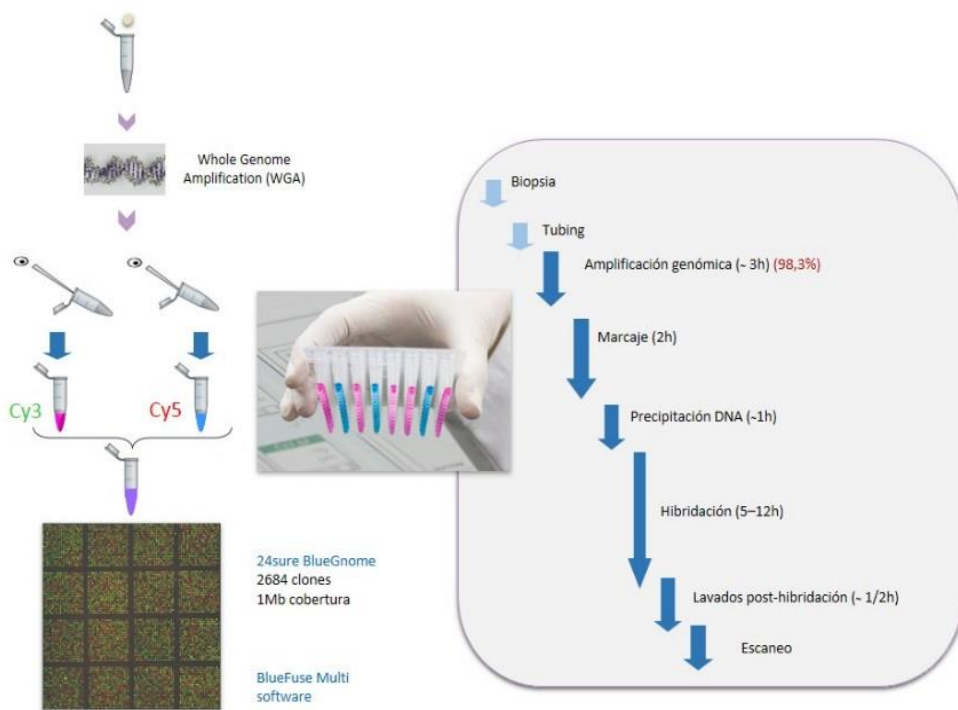
- Por último se transfirió la placa de 96 al bloque de 75°C, se añadieron 21 µL de tampón de hibridación atemperado a 75°C, se desnaturalizó el DNA precipitado en un termobloque Hybex® (SciGene, Sunnyvale, CA, USA) a 75°C durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Tras dejar enfriar, y en campana de extracción de gases, se añadieron 18 µL de cada muestra a un cubreobjetos de 22x22 mm, y se montaron sobre el área de hibridación del array.
- Se colocaron los array en una cámara de hibridación que contenía una solución de SSC y formamida (Roche, IN, USA) y se hibridaron incubando en baño térmico a 47°C durante 8-16 horas.

Detección

- En campana de extracción de gases, se extrajeron los arrays de la cámara de hibridación y se sumergieron en la solución 2xSSC/0,05% Tween20 agitando ligeramente para eliminar el cubreobjetos por deslizamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Sin dejar secar, se lavaron 10 minutos en 2xSSC/0,05% Tween20 y 10 minutos en 1xSSC agitando a 850 rpm. Posteriormente, se lavaron 5 minutos en la solución 0,1xSSC a temperatura y 1 minuto en 0,1xSSC a temperatura.
- Finalmente, se secaron los arrays centrifugándolos 3 minutos a 170g, y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su lectura.



Esquema del protocolo de arrays de CGH para el estudio de aneuploidías de 24 cromosomas sobre blastómeras.

Lectura e interpretación de resultados

La lectura del array de CGH se realizó con un scanner (Powerscanner, TECAN, Männedorf, Switzerland) equipado con láser de dos canales, un canal verde (532nm) para la excitación y la lectura de la señal Cy3 y un canal rojo (653nm) para la excitación y lectura de la señal Cy5. Las imágenes TIFF generadas por el scanner se analizaron con un programa informático de análisis de datos específicos para arrays de CGH (BlueFuse Illumina®, Cambridge, UK), que normaliza las intensidades de fluorescencia de los canales Cy3 y Cy5, y genera un gráfico del que se infiere visualmente la ganancia (trisomía) o pérdida (monosomía) para cada uno de los 24 cromosomas. La ganancia o pérdida del material genético se representa por puntos que se desvían hacia la parte superior o inferior del gráfico, respectivamente. Mediante esta técnica se pueden evaluar ganancias o pérdidas de cromosomas individuales (aneuploidías), pero no se pueden evaluar alteraciones que afecten al cómputo total de los cromosomas (triploidía, tetraploidía, etc.). Además permite detectar alteraciones cromosómicas segmentales, considerándose con relevancia clínica cuando tienen un tamaño superior a 20 Mb.

05

RESULTADOS

Se presentan los resultados comentados del presente trabajo de tesis doctoral por apartados:

Resultados comparados de ciclos de PGS con sólo ovocitos frescos y ciclos con ovocitos sólo de origen vitrificado

5.1

5.1.1.- Resultados descriptivos de las pacientes y de la estimulación

Este análisis incluyó 368 ciclos de PGS en los que el origen de los ovocitos de todos los embriones analizados fue fresco y 45 ciclos de PGS donde el origen de todos los embriones analizados derivaba de ovocitos vitrificados procedentes de uno o más ciclos de estimulación. La descripción de las características de cada grupo de estudio se presenta en la [tabla 1](#). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las siguientes variables analizadas:

- La media de edad de las pacientes fue significativamente inferior en el grupo de pacientes con ovocitos frescos comparada con el grupo de pacientes con ovocitos desvitrificados, 38,9 [IC95%: 38,6-39,3] vs. 40,9 [IC95%: 40,1-41,7], respectivamente; $P < 0,01$).
- La media de días de estimulación de las pacientes fue significativamente inferior en el grupo con ovocitos frescos comparada con el grupo de ovocitos desvitrificados: 10,7 [IC95%: 10,5-10,6] vs. 11,3 [IC95%: 10,7-11,9], respectivamente; $P < 0,01$.
- La media de los niveles de E2 en el día de la inducción de la ovulación de las pacientes fue significativamente superior en el grupo de ovocitos frescos comparada con la de las estimulaciones del grupo de pacientes con ovocitos desvitrificados (1952,9 [IC95%: 1854,8-2050,8] vs. 1157,5 [IC95%: 894,1-1330,9], respectivamente; $P < 0,01$), así como la de los niveles de P4 (0,7 [IC95%: 0,7-0,8] frescos vs. 0,5 [IC95%: 0,4-0,6] vitrificados; $P < 0,01$).
- El número medio de ovocitos MII obtenidos por ciclo de punción, es decir, por ciclo de estimulación fue significativamente superior en el grupo de ovocitos frescos comparado con el grupo de ovocitos desvitrificados (9,4 [IC95%: 8,9-9,9] vs. 4,4 [IC95%: 3,6-5,2]; $P < 0,01$).

La tasa de supervivencia de los ovocitos desvitrificados fue del 88,2% [IC95%: 85,2-91,2]. Resulta interesante destacar que, a pesar de no partir del mismo número de MII por ciclo de punción, no existen diferencias significativas (NS) en cuanto al número de MII destinado por ciclo de PGS, independientemente del origen de los ovocitos (9,4 [IC95%: 8,9-9,9] frescos vs. 10,0 [IC95%: 8,7-11,5] vitrificados), ni en cuanto al número de MII inyectado por ciclo de PGS (9,4 [IC95%: 8,9-9,9] frescos vs. 8,8 [IC95%: 7,3-10,3]

RESULTADOS

vitrificados). Esto atiende a que en los casos de baja respuesta se llevan a cabo varios ciclos de estimulación y acumulación de ovocitos para un único ciclo de diagnóstico.

Tabla 1.- Datos descriptivos y de estimulación de pacientes con ciclos de PGS con ovocitos frescos comparados con los ciclos con ovocitos vitrificados

	CICLOS OVOCITOS FRESCOS	CICLOS OVOCITOS DESVITRIFICADOS	P-valor
Nº de ciclos de PGS	368	45	-
Media Edad [IC95%]	38,9 [38,6-39,3]	40,9 [40,1-41,7]	P<0,01
Media IMC (Kg/m ²) [IC95%]	23,6 [23,2-24,0]	23,9 [22,4-24,7]	NS
Nº de estimulaciones totales	368	100	-
Media de estimulaciones/ciclo PGS [IC95%]	1	2,2 [1,4-2,5]	NS
Media días de estimulación [IC95%]	10,7 [10,5-10,6]	11,3 [10,7-11,9]	P<0,01
Media E2* [IC95%]	1952,9 [1854,8-2050,8]	1157,5 [894,1-1330,9]	P<0,01
Media P4** [IC95%]	0,7 [0,7-0,8]	0,5 [0,4-0,6]	P<0,01
Nº inicial de ovocitos MII	3439	449	-
Media MII/estimulación [IC95%]	9,4 [8,9-9,9]	4,4 [3,6-5,2]	P<0,01
Media MII/ciclo PGS [IC95%]	9,4 [8,9-9,9]	10,0 [8,7-11,5]	NS
Tasa de supervivencia [IC95%]	-	88,2% [85,2-91,2]	-
Media MII inyectados/ciclo PGS [IC95%]	9,4 [8,9-9,9]	8,8 [7,3-10,3]	NS

IMC: índice de masa corporal

*Media E2 en pg/mL el día de la inducción de la ovulación; **Media P4 en ng/mL

5.1.2.- Datos de desarrollo embrionario de ciclos de PGS

Una vez corregida la merma de ovocitos que no sobreviven a la desvitrificación, se observaron tasas de fecundación similares independientemente del origen del ovocito, fresco o vitrificado, siendo del 72 al 74% (tabla 2).

Observamos un mayor bloqueo embrionario hasta D3 en el grupo de ovocitos vitrificados, dando lugar a un porcentaje significativamente menor de embriones biopsiados en D3 con respecto al total de ovocitos correctamente fecundados en cada grupo, 75,6% [IC 95%: 74,3-77,3] frescos vs. 69,1% [IC 95%: 63,8-73,9] desvitrificados (P<0,05), lo que no se vio reflejado en diferencias significativas en la media de embriones biopsiados por ciclo de PGS (5,1 [IC95%: 4,9-5,4] frescos vs. 4,5 [IC95%: 4,9-5,4] desvitrificados) debido a que este efecto, junto con el menor número de ovocitos MII, se vio compensado por el hecho de haber realizado una media de 2,2 estimulaciones en el grupo de ovocitos vitrificados, frente a una única estimulación en el grupo de ovocitos frescos.

Por otro lado, en el grupo de ovocitos vitrificados también se observó una menor tasa de llegada a blastocisto en D5 (67,5% [IC 95%: 65,4-69,6] frescos vs. 58,1% [IC 95%: 51,3-64,9] vitrificados; P<0,01), que podría estar justificado por las diferencias significativas en la edad de las mujeres incluidas.

Tabla 2.- Datos de desarrollo embrionario de ciclos de PGS con ovocitos frescos comparados con los ciclos con ovocitos vitrificados

	CICLOS OVOCITOS FRESCOS	CICLOS OVOCITOS DESVITRIFICADOS	P-valor
Media 2PN*/ciclo PGS [IC95%]	6,8 [6,4-7,1]	6,5 [5,3,-7,7]	NS
Tasa de fecundación [IC95%]	72,3% [70,1-73,8]	74,2% [69,9-78,6]	NS
Nº de embriones biopsiados en D3	1879	203	-
% embriones biopsiados en D3/2PN [IC95%]	75,6% [74,3-77,3]	69,1% [63,8-73,9]	P<0,05
Media embriones biopsiados/ciclo PGS [IC95%]	5,1 [4,9-5,4]	4,5 [6,6-5,4]	NS
Nº de blastocistos en D5	1268	118	-
Tasa de blastocistos en D5/ biopsiados [IC95%]	67,5% [65,4-69,6]	58,1% [51,3- 64,9]	P<0,01

*2PN = ovocitos MII correctamente fecundados con 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares

5.1.3.- Resultados del análisis cromosómico

Un total de 2079 embriones fueron analizados en D3 de desarrollo embrionario. La tasa de informatividad fue del 98,5% y el porcentaje de embriones aneuploides fue 79,5% en ovocitos frescos y 84,5% en el grupo de ovocitos desvitrificados, sin

RESULTADOS

observarse diferencias significativas entre ambos grupos. Tampoco se observaron diferencias significativas en los diferentes tipos de anomalías cromosómicas analizadas, tal como se muestra en la **tabla 3**. Todos estos datos sugieren que la técnica de vitrificación por el método de Cryotop® es una técnica segura que no incrementa las aneuploidías en los embriones.

Tabla 3.- Resultados del análisis cromosómico en ciclos con ovocitos frescos comparados con los ciclos con ovocitos vitrificados

	CICLOS OVOCITOS FRESCOS	CICLOS OVOCITOS DESVITRIFICADOS	P-valor
Nº de embriones analizados	1876	203	-
% de fallos de amplificación [IC95%]	1,4% [0,8-1,3]	1,5% [0,2-3,2]	NS
% de embriones informativos [IC95%]	98,6% [98,1-99,4]	98,5% [96,9- 100,2]	NS
% embriones euploides/ informativos [IC95%]	20,5% [18,7-22,4]	15,5% [10,5-20,5]	NS
% embriones aneuploides/ informativos [IC95%]	79,5% [77,6-81,3]	84,5% [79,5-89,5]	NS
% aneuploidías segmentales*/ informativos [IC95%]	6,4% [5,3-7,5]	9,0% [5,0-13,0]	NS
% anomalías complejas**/ informativos [IC95%]	17,2% [15,2-19,0]	22,0% [16,3-27,7]	NS
% embriones caóticos***/ informativos [IC95%]	16,4% [14,7-18,1]	13,5% [8,8- 18,4]	NS
Nº de blastocistos normales	343	28	-
Rendimiento			
% blastocistos euploides/ MII inyectado [IC95%]	10,0% [9,0-11,0]	7,1% [4,6-9,6]	NS
% blastocistos euploides/ MII iniciales [IC95%]	10,0% [9,0-11,0]	6,2% [4,0-8,4]	P<0,01

*Anomalías segmentales: duplicación/delección de un fragmento cromosómico de tamaño >10 Mb

**Anomalías complejas: embriones con aneuploidías ≥ 3 cromosomas

***Embriones caóticos: aneuploidías para la mayoría de los 23 pares cromosómicos

En cuanto al rendimiento, no se observaron diferencias estadísticas en el número de blastocistos euploides por ovocito MII microinyectado (10,0% frescos vs. 7,1%

desvitrificados), cálculo en el que en el grupo de ovocitos desvitrificados no se contabilizaron los ovocitos que no sobrevivieron a la vitrificación (tabla 4). Sin embargo, sí que se observaron diferencias significativas en el número de blastocistos euploides por número de ovocitos MII iniciales totales del que partimos (10,0% [IC95%: 9,0-11,0] frescos vs. 6,2% [IC95%: 4,0-8,4] desvitrificados; $P < 0,01$). Estas diferencias se podrían explicar por la diferencia de la media de edad de los dos grupos, 38,9 [IC95%: 38,6-39,3] vs. 40,9 [IC95%: 40,1-41,7], con mayor edad en el grupo de ovocitos vitrificados, donde también se observó una tendencia no significativa hacia un mayor porcentaje de embriones aneuploides.

5.1.4.- Descripción de las anomalías cromosómicas individuales

Analizamos en detalle el porcentaje de aneuploidías del tipo monosomía, trisomía y su total para cada uno de los cromosomas analizados en el diagnóstico mediante array de CGH tanto en los embriones procedentes de ciclos de ovocitos frescos como en los embriones procedentes de ciclos de ovocitos desvitrificados.

La incidencia global de monosomías y trisomías en el grupo de ovocitos frescos fue de un 56,6% y de un 43,4% respectivamente referidos al total de aneuploidías encontradas, del mismo modo en el grupo de ovocitos vitrificados dichos porcentajes fueron también similares, 58,4% para las monosomías y 41,6% para las trisomías.

La figura 1 muestra la distribución del porcentaje de monosomías y trisomías para cada cromosoma en los embriones procedentes de ovocitos frescos, del mismo modo se representó en la figura 2 para los embriones cuyo origen de los ovocitos era vitrificado.

Para cada cromosoma, la representación en columna apilada de monosomías y trisomías es muy útil ya que permite mostrar y comparar visualmente cada una por separado así como el total de aneuploidías para cada uno de ellos.

RESULTADOS

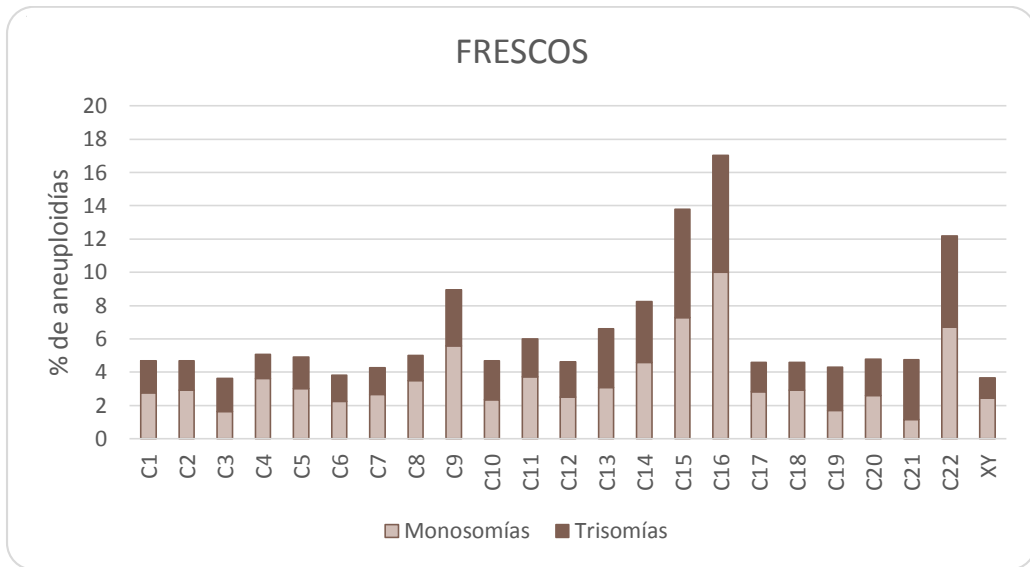


Figura 1.- Diagrama de barras apiladas del porcentaje de monosomías y trisomías para cada cromosoma en embriones procedentes de ovocitos de origen fresco

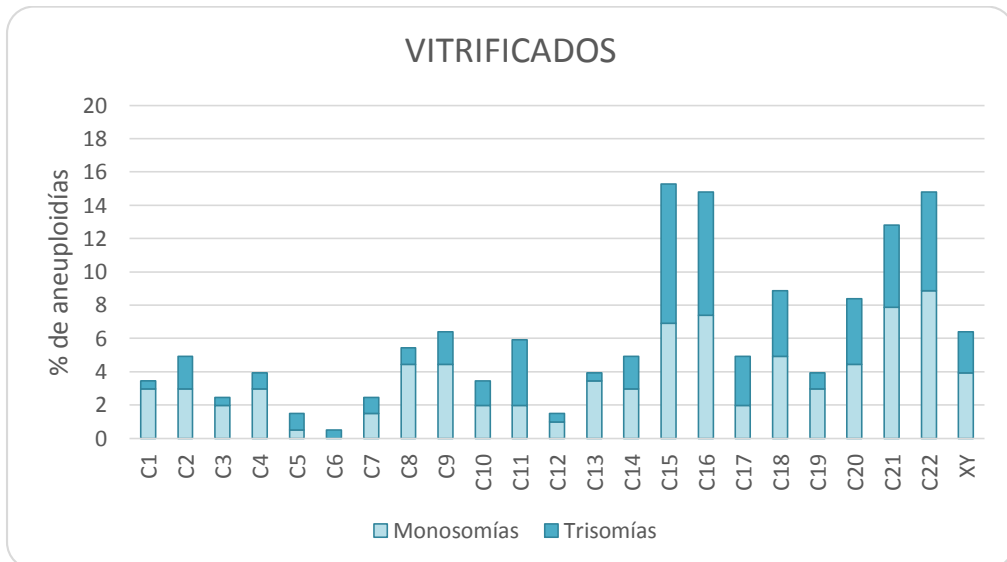


Figura 2.- Diagrama de barras apiladas del porcentaje de monosomías y trisomías para cada cromosoma en embriones procedentes de ovocitos de origen vitrificado

En la figura 3 representamos de forma comparativa las aneuploidías totales en ambos grupos de pacientes según el origen de los ovocitos. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de anomalías obtenidas para la mayoría de los cromosomas analizados salvo en los cromosomas 5, 6, 12, 18, 20 y 21. Siendo menor la incidencia de aneuploidías en embriones procedentes de ovocitos vitrificado para los cromosomas 5, 6 y 12. Sin embargo es mayor el porcentaje de embriones anormales para los cromosomas 18, 20 y 21 en el grupo de los vitrificados respecto de los frescos. Tal vez la mayor incidencia de anomalías para el cromosoma 21 tiene que ver con el hecho de ser de mayor edad este grupo de pacientes.

Estos resultados confirman de nuevo que la técnica de vitrificación de ovocitos por el método de Cryotop® no aumenta la tasa de aneuploidías o, en todo caso, los ovocitos potencialmente aneuploides desde su obtención no sobreviven en el mismo grado al proceso de desvitrificación, produciéndose una selección de los ovocitos con mejor pronóstico.

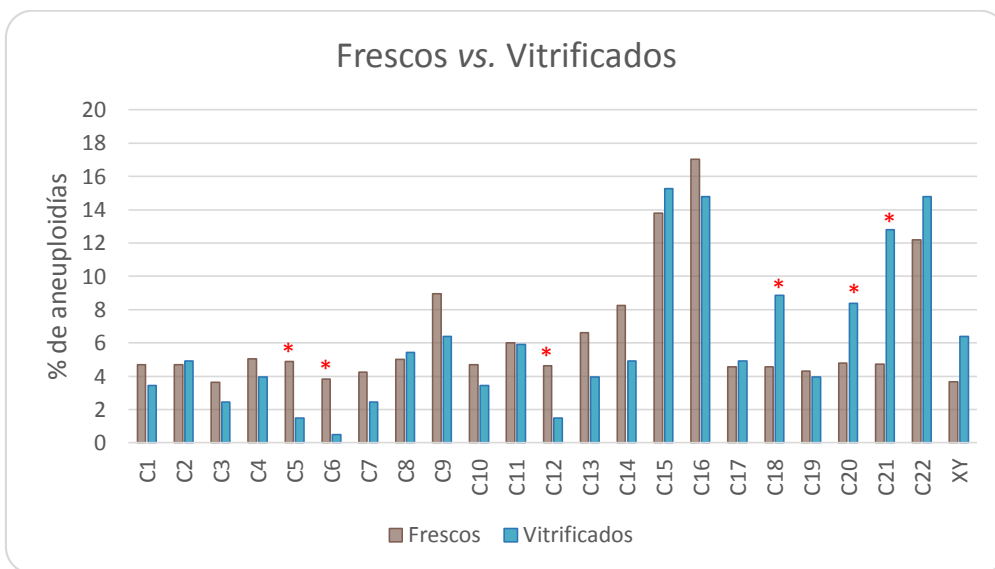


Figura 3.- Diagrama de barras del porcentaje aneuploidías para cada cromosoma en embriones procedentes de ovocitos frescos vs. desvitrificados. * Significatividad $p < 0,05$

RESULTADOS

5.1.5.- Resultados clínicos de ciclos de PGS

En cuanto a los resultados clínicos de los ciclos de PGS en ambos grupos de pacientes encontramos una tasa de gestación clínica por ciclo de PGS (27,7% en frescos vs. 24,4% en desvitrificados), una tasa de gestación clínica por transferencia (50,5% en fresco vs. 57,9% en desvitrificados) sin diferencias significativas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas en las tasa de implantación (45,1% en el grupo de ovocitos frescos vs. 46,2% en el grupo de ovocitos desvitrificados), ni en las tasas de gestación clínica evolutiva por ciclo de PGS (25,8% frescos vs. 22,2% desvitrificados) ni en las tasas de gestación clínica evolutiva por transferencia (47,0% frescos vs. 52,6% desvitrificados). La tabla 4 muestra los resultados clínicos en ambos grupos tras un único ciclo de PGS, tanto si los ovocitos son de origen fresco como si son desvitrificados, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Tabla 4.- Resultados clínicos de ciclos de PGS con ovocitos frescos comparados con los ciclos con ovocitos vitrificados

	CICLOS OVOCITOS FRESCOS	CICLOS OVOCITOS DESVITRIFICADOS	<i>P-valor</i>
% de ciclos con transferencia [IC95%]	54,4% [49,3-59,5]	42,2% [27,8- 56,3]	NS
Tasa de gestación clínica/ciclo PGS [IC95%]	27,7% [23,1-32,3]	24,4% [11,9-37,0]	NS
Tasa de gestación clínica/transferencia [IC95%]	50,5% [43,8-57,4]	57,9% [35,7-80,1]	NS
Tasa de implantación [IC95%]	45,1% [39,2-51,0]	46,2% [27,0-65,4]	NS
Media tasas de implantación/paciente [IC95%]	44,4% [25,3-63,5]	53,5% [38,9-68,1]	NS
Tasa gestación clínica evolutiva/ciclo PGS [IC95%]	25,8% [21,6-30,3]	22,2% [10,0-34,4]	NS
Tasa de gestación clínica evolutiva/ transferencia [IC95%]	47,5% [40,6-54,4]	52,6% [30,2-75,1]	NS
Tasa de implantación evolutiva [IC95%]	42,6% [36,5-48,1]	42,3% [23,1-61,3]	NS

5.1.6.- Evaluación y estudio de la probabilidad de obtener al menos un blastocisto euploide y gestación evolutiva en función del origen de los ovocitos

En primer lugar, se realizó un análisis en crudo de las variables cuantitativas relacionadas con las poblaciones de estudio que pudieran afectar a los resultados.

Se aplicó un T-test para la comparación para variables cuantitativas entre ciclos con al menos un blastocisto normal vs. ningún blastocisto euploide. Se encontraron diferencias significativas para el número de ovocitos MII disponibles, ovocitos MII microinyectados, fecundación, edad de la paciente y número de ciclos estimulados por ciclo de PGS.

A continuación se realizó una regresión logística para estudiar la relación de las variables que resultaron significativas con la probabilidad de obtener al menos un blastocisto normal (tabla 5). Una vez se tienen en cuenta y se corrige el análisis por dichas variables, encontramos que la probabilidad de obtener al menos un blastocisto euploide era independiente de si el ovocito era de origen fresco o vitrificado, $P=0,96$; OR: 1,025 [IC 95%: 0,37-2,82].

Tabla 5.- Análisis de regresión logística mostrando el ajuste de OR para la probabilidad de tener al menos un blastocisto normal en relación al origen del ovocito (fresco/vitrificado)

	Adj OR	IC 95%
Edad	0,761	0,698-0,831
Nº MII iniciales	1,035	0,936-1,144
Nº MII microinyectados	0,978	0,835-1,146
Tasa de fecundación	1,218	1,057-1,404
Nº de ciclos de estimulación/ciclo de PGS	0,898	0,520-1,549
Origen ovocito fresco/vitrificado	1,025	0,37-2,82

Realizamos también un T-Test para la comparación entre las variables cuantitativas y la probabilidad de gestación evolutiva. Ninguna de ellas fue significativa, por lo que no fue necesaria la regresión logística.

Resultados comparados de ciclos de PGS de ovocitos de origen mixto

5.2

En este apartado se analizaron los resultados de los ciclos de PGS en pacientes cuyos embriones destinados al diagnóstico genético tenían un origen ovocitario mixto, es decir, al ciclo de punción en fresco donde se realizaba el diagnóstico genético se le añadían los ovocitos acumulados en uno o más ciclos de vitrificación de ovocitos.

5.2.1- Resultados descriptivos de las pacientes y de la estimulación

Este análisis incluyó 100 ciclos de PGS en los que el origen de los ovocitos de los embriones analizados fue mixto. La descripción de las características de este grupo de estudio se presenta en la tabla 6.

Tabla 6.- Datos descriptivos y de estimulación de pacientes con ciclos de PGS de ovocitos de origen mixto

	CICLOS MIXTOS			
	Global	Frescos	Desvitrificados	P-valor
Nº de ciclos PGS	100	-	-	-
Media Edad [IC95%]	40,7 [40,2-41,3]	-	-	-
Media IMC (Kg/m ²) [IC95%]	24,0 [23,0-25,0]	-	-	-
Nº de estimulaciones totales (media ciclo PGS)	260 (2,6)	100 (1,0)	160 (1,6)	-
Media días de estimulación [IC95%]	10,9 [10,4-11,4]	11,2 [10,7-11,8]	10,7 [10,3-11,1]	NS
Media E2* [IC95%]	1129,1 [988,0-1270,2]	1253,3 [1078,1-1428,5]	1051,3 [933,9-1168,1]	NS
Media P4** [IC95%]	0,6 [0,5-0,7]	0,6 [0,5-0,7]	0,6 [0,5-0,7]	NS
Nº inicial ovocitos MII	1092	549	543	-
Media MII iniciales/ciclo PGS [IC95%]	10,9 [10,0-11,8]	5,5 [4,6-6,4]	5,4 [4,9-5,9]	NS
Tasa de supervivencia [IC95%]	-	-	81,0% [77,7-84,3]	-
Nº ovocitos MII inyectados	990	549	441	-
Media MII inyectado/ciclo PGS [IC95%]	9,9 [9,0-10,8]	5,5 [4,6-6,4]	4,4 [3,9-4,5]	P<0,01

NOTA: Comparaciones estadísticas entre los subgrupos de ovocitos frescos y vitrificados

*Media E2 en pg/mL el día de la inducción de la ovulación; **Media P4 en ng/mL

La edad media de esta población de estudio fue 40,7 años [IC95%: 40,2-41,3]. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de E2 el día de la administración de la inducción de la ovulación ni en los niveles de P4 entre las estimulaciones de ambos subgrupos según el origen de los ovocitos en la misma paciente (1253,3 [IC95%: 1078,1-1428,5] vs. 1051,3 [IC95%: 933,9-1168,1] y 0,6 [IC95%: 0,5-0,7] vs. 0,6 [IC95%: 0,5-0,7], respectivamente).

Para estos ciclos mixtos las pacientes se realizaron una media de 1,6 ciclos de estimulación para vitrificar y acumular ovocitos MII para añadir al último ciclo en fresco. Siendo la media de MII iniciales por ciclo de PGS similares en ambos subgrupos (5,5 [IC95%: 4,6-6,4] en el ciclo en fresco y 5,4 [IC95%: 4,9-5,9] ovocitos MII vitrificados).

La tasa de supervivencia de los ovocitos desvitrificados fue del 81,0% [IC95%: 77,7-84,3].

Debido al porcentaje de supervivencia de los ovocitos desvitrificados, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de MII destinados al ciclo de PGS según su origen (5,5 [IC95%:4,6-6,4] frescos vs. 4,4 [IC95%: 3,9-4,5] desvitrificados; $P < 0,01$).

5.2.2.- Datos de desarrollo embrionario de ciclos de PGS

A pesar de disponer de partida de un menor número medio de ovocitos acumulados disponibles respecto de los obtenidos en el ciclo en fresco donde se realizó el diagnóstico, es decir, menor número medio de ovocitos desvitrificados que sobreviven por ciclo de PGS respecto de los frescos, se observaron tasas de fecundación similares sin diferencias estadísticas en cada subgrupo independientemente del origen del ovocito, fresco o vitrificado, siendo del 69,0% al 71,9%, con una tasa de fecundación media por ciclo de PGS del 71,0% (tabla 7).

Se dio además un mayor bloqueo embrionario en D3 en el subgrupo de ovocitos vitrificados, hecho que se reflejó en una tasa significativamente menor de embriones biopsiados para este subgrupo (77,1% frescos vs. 65,9% desvitrificados; $P < 0,01$). La tasa global media de embriones biopsiados en estas pacientes con ciclos de PGS mixtos fue del 71,4%.

Resulta muy interesante sin embargo no encontrar diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de embriones biopsiados que llegan al estadio de

blastocisto en D5 entre cada subgrupo, teniendo una tasa global de llegada a blastocisto del 58,5%.

Tabla 7.- Datos de desarrollo embrionario de ciclos de PGS con ovocitos de origen mixto

	CICLOS MIXTOS			
	Global	Frescos	Desvitrificados	P-valor
Tasa de fecundación [IC95%]	71,0% [68,0-73,7]	69,0% [65,0-72,8]	71,9% [67,5-75,9]	NS
Nº de embriones biopsiados en D3	501	292	209	-
% embriones biopsiados D3/2PN* [IC95%]	71,4% [67,9-74,6]	77,1% [72,5-81,0]	65,9% [60,6-70,9]	P<0,01
Nº de blastocistos	293	170	123	-
Tasa de blastocistos D5/biopsiados [IC95%]	58,5% [54,1-62,7]	58,2% [52,5-63,7]	58,9% [52,1-65,3]	NS

*2PN = ovocitos MII correctamente fecundados con 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares

5.2.3.- Resultados del análisis cromosómico

Un total de 501 embriones fueron analizados en D3 de desarrollo embrionario, 292 embriones procedentes de ovocitos frescos y 209 procedentes de ovocitos vitrificados. La tasa de informatividad fue del 99,0%, sin diferencias estadísticas entre ambos subgrupos. La tasa de aneuploidía global por ciclo de PGS fue del 81,7%, sin embargo, si analizamos los resultados en función del origen encontramos un porcentaje mayor de embriones aneuploides en el subgrupo de ovocitos frescos (84,7%) que en el de ovocitos desvitrificados (77,3%), resultando en diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

No se observaron diferencias significativas en los diferentes tipos de anomalías cromosómicas analizadas (segmentales, complejas y caóticas), tal como se muestra en la tabla 8.

En cuanto al rendimiento, con la estrategia de los ciclos mixtos de ovocitos se alcanza un rendimiento global de blastocisto euploide por ovocito MII microinyectado del 7,9% y del 7,1% de blastocisto euploide por MII inicial. En ambos, no se encontraron diferencias significativas en los subgrupos según el origen ovocitario. Estos datos son

altamente destacables ya que al analizar cohortes embrionarias frescas y desvitrificadas de una misma paciente corroboran la idea de que la técnica de vitrificación por el método Cryotop® es una técnica segura que no incrementa las aneuploidías en los embriones.

Tabla 8.- Resultados arrays de ciclos de PGS de ovocitos de origen mixto

	CICLOS MIXTOS			
	Global	Frescos	Desvitrificados	P-valor
Nº de embriones analizados	501	292	209	-
% de fallos de amplificación [IC95%]	1,0% [0,1-1,9]	1,0% [-0,1-2,1]	1,0% [-0,4-2,4]	NS
% embriones informativos [IC95%]	99,0% [97,6-99,6]	99,0% [96,9-99,8]	99,0% [96,4-100,0]	NS
% embriones euploides/ informativos [IC95%]	18,4% [15,2-22,0]	15,2% [11,5-19,9]	22,7% [17,5-28,9]	P<0,05
% embriones aneuploides/ informativos [IC95%]	81,7% [78,0-84,8]	84,7% [80,2-88,5]	77,3% [71,1-82,5]	P<0,05
% aneuploidías segmentales*/ informativos [IC95%]	2,8% [1,7-4,7]	2,1% [0,9-4,6]	3,9% [1,9-7,6]	NS
% anomalías complejas**/ informativos [IC95%]	19,8% [16,5-23,5]	19,4% [15,2-24,3]	20,3% [15,4-26,3]	NS
% embriones caóticos***/ informativos [IC95%]	16,5% [13,5-20,1]	18,7% [14,6-23,6]	13,5% [9,5-18,9]	NS
Nº blastocistos euploides	78	41	37	-
Rendimiento				
% blastocistos euploides/MII inyectados [IC95%]	7,9% [6,4-9,7]	7,5% [5,5-10,0]	8,4% [6,1-11,4]	NS
% blastocistos euploides/ MII iniciales [IC95%]	7,1% [5,8-8,8]	7,5% [5,5-10,0]	6,8% [5,0-9,3]	NS

*Anomalías segmentales: duplicación/delección de un fragmento cromosómico de tamaño >10 Mb

**Anomalías complejas: embriones con aneuploidías ≥3 cromosomas

***Embriones caóticos: aneuploidías para la mayoría de los 23 pares cromosómicos

5.2.4.- Descripción de las anomalías cromosómicas individuales

La incidencia global de monosomías y trisomías en el subgrupo de ovocitos frescos fue de un 55,5% y de un 44,5% respectivamente referidos al total de aneuploidías encontradas, del mismo modo en el subgrupo de ovocitos vitrificados dichos porcentajes fueron también similares, 57,8% para las monosomías y 42,2% para las trisomías.

La figura 4 muestra la distribución del porcentaje de monosomías y trisomías para cada cromosoma en los embriones procedentes de ovocitos frescos de ciclos mixtos de PGS, del mismo modo se representó en la figura 5 para los embriones cuyo origen de los ovocitos era vitrificado.

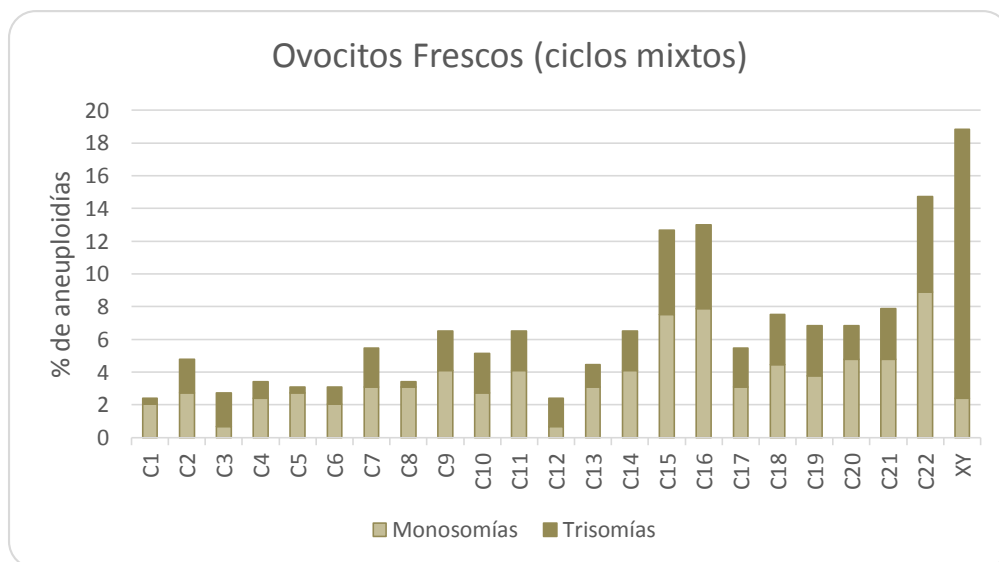


Figura 4.- Diagrama de barras apiladas del porcentaje de monosomías y trisomías para cada cromosoma en embriones procedentes de ovocitos frescos de ciclos mixtos de PGS

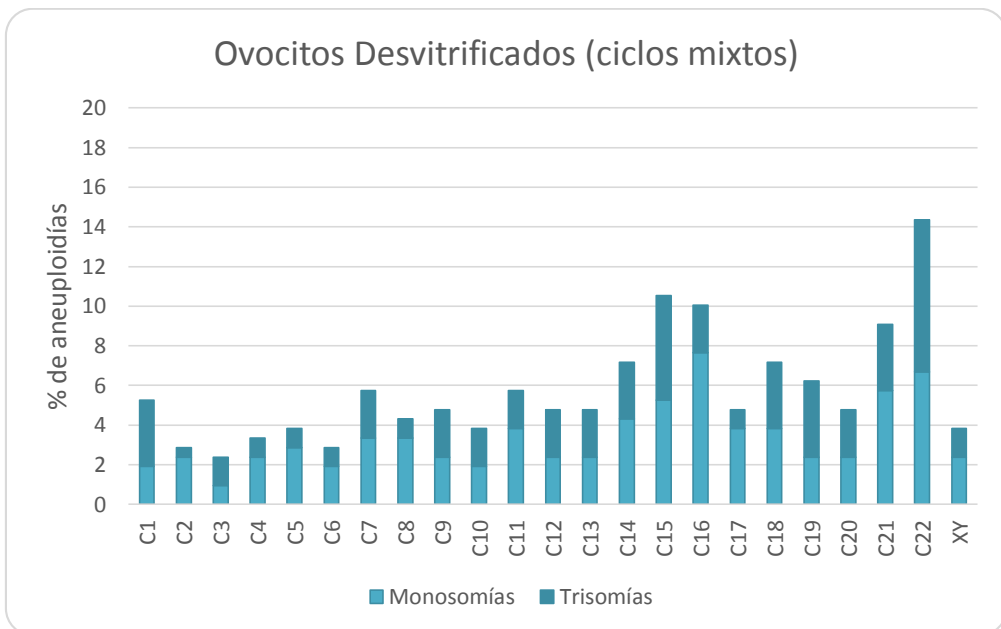


Figura 5.- Diagrama de barras apiladas del porcentaje de monosomías y trisomías para cada cromosoma en embriones procedentes de ovocitos desvitrificados de ciclos mixtos de PGS

Como realizamos en el apartado anterior donde comparamos cohortes de embriones procedentes todos de ovocitos frescos con embriones procedentes de ovocitos todos desvitrificados, analizamos también en detalle en este grupo de pacientes con cohortes embrionarias de origen mixto el porcentaje de aneuploidías totales para cada uno de los cromosomas analizados en el diagnóstico mediante array de CGH (figura 6). Se encontraron diferencias significativas sólo en los cromosomas sexuales ($P < 0,01$), siendo menor el porcentaje de anomalías para estos cromosomas en los embriones procedentes de ovocitos de origen vitrificado. Para el resto de cromosomas las diferencias en el porcentaje de aneuploidías fueron no significativas, como cabría esperar en ovocitos procedentes de la misma paciente si además se considera segura la técnica de vitrificación, tal y como los datos de este estudio sugieren.

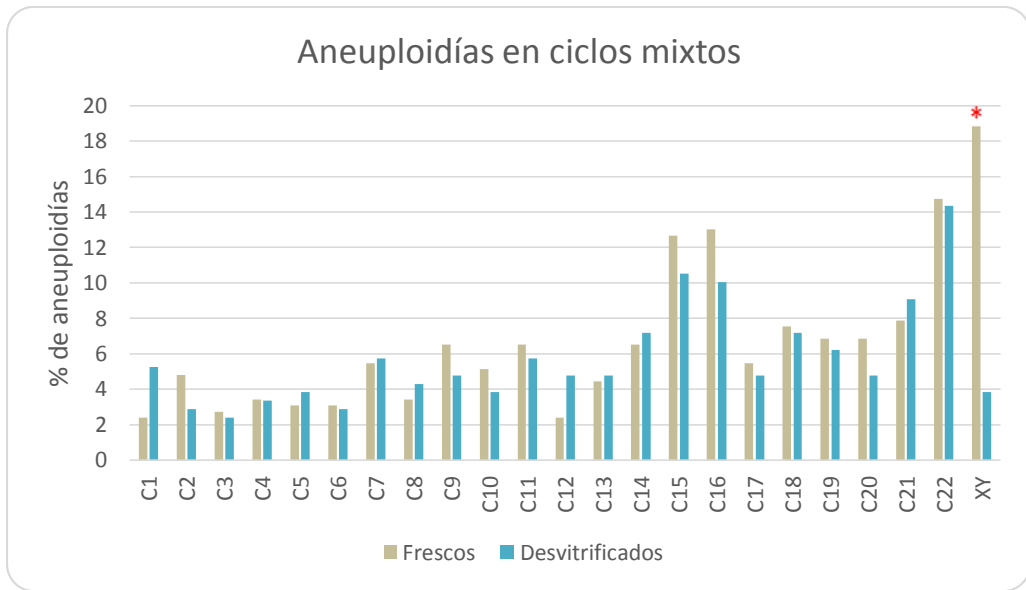


Figura 6.- Diagrama de barras del porcentaje aneuploidías para cada cromosoma en embriones procedentes de cohortes mixtas de ovocitos frescos y desvitrificados.
 *Significatividad $p < 0,05$

5.2.5.- Resultados clínicos de ciclos de PGS

En la [tabla 9](#) se recopilan los resultados clínicos de los ciclos de PGS con ovocitos de origen mixto, donde la tasa de gestación clínica por ciclo de PGS fue del 25,0%, la tasa de gestación clínica por transferencia del 49,0%, la tasa de implantación del 41,4%. Las tasas de gestación clínica evolutiva por ciclo de PGS (23,0%) y de gestación clínica evolutiva por transferencia (45,1%) son un buen valor de garantía para este tipo de estrategia.

Tabla 9.- Resultados clínicos de ciclos de PGS de ovocitos de origen mixto

	GLOBAL CICLOS MIXTOS
% de ciclos con transferencia [IC95%]	51% [41,2-60,8]
Tasa de gestación clínica /ciclo de PGS [IC95%]	25,0% [16,5-33,5]
Tasa gestación clínica / transferencia [IC95%]	49,0% [35,6-62,7]
Tasa de implantación [IC95%]	41,4% [32,8-56,0]
Media tasas de implantación/paciente [IC95%]	43,1% [33,4-52,8]
Tasa de gestación clínica evolutiva/ciclo PGS [IC95%]	23,0% [14,8-31,3]
Tasa de gestación clínica evolutiva / transferencia [IC95%]	45,1% [31,4-58,8]
Tasa de implantación evolutiva [IC95%]	38,5% [27,1-50,0]

Estimación del número mínimo de ciclos de vitrificación necesarios en las pacientes con baja respuesta para encontrar el primer blastocisto euploide

5.3

En este apartado intentamos encontrar respuesta a la pregunta que la mayoría de los clínicos se plantean en cuanto al número de estimulaciones a realizar para un ciclo de diagnóstico, “¿cuándo parar?”, mediante la estimación del número mínimo de ciclos de acumulación de ovocitos en pacientes con baja respuesta. ¿En qué ciclo estará el primer embrión normal?

En este apartado se incluyeron sólo aquellas pacientes que tuvieron 2 o más estimulaciones. Cumplían este requisito 30 pacientes con sólo ovocitos vitrificados y las 100 pacientes con ovocitos mixtos que realizaron como mínimo dos estimulaciones, siendo en este último caso la última estimulación la que correspondía a los ovocitos frescos. Del total de 130 ciclos, en el 86,1% de ellos se realizó hasta un máximo de 3 ciclos de estimulación. Siendo el grupo de 2 ciclos de estimulación el más prevalente, representando el 57,6% de los casos.

RESULTADOS

En la tabla 10 se indica el número de pacientes que se han realizado de 2 a 6 ciclos de acumulación de ovocitos previos al diagnóstico por arrays de CGH, cuántas obtuvieron uno o más embriones euploides, en qué ciclo se obtuvo el primer embrión normal y, en caso de gestación positiva (G+), de qué ciclo procedía.

Tabla 10.- Porcentaje de embriones normales y gestaciones positivas tras PGS en función del número de estimulaciones realizadas y el orden en el que se obtuvieron

	2 ciclos	3 ciclos	4 ciclos	5 ciclos	6 ciclos
Nº de pacientes (%)	73 (57,6)	37 (28,5)	14 (10,8)	4 (3,1)	2 (1,5)
Pacientes ≥1 embrión normal	40	12	10	2	0
Embrión normal 1º ciclo (%)	21 (52,5)	5 (41,6)	3 (30,0)	0	0
Embrión normal 2º ciclo (%)	19 (47,5)	3 (25,0)	1 (10,0)	1 (50,0)	0
Embrión normal 3º ciclo (%)	-	4 (33,3)	4 (40,0)	0	0
Embrión normal 4º ciclo (%)	-	-	2 (20,0)	1 (50,0)	0
Embrión normal 5º ciclo (%)	-	-	-	0	0
Embrión normal 6º ciclo (%)	-	-	-	-	0
Pacientes G+	19	5	5	2	0
G+ 1º ciclo (%)	8 (41,1)	1 (20,0)	2 (40,0)	0	0
G+ 2º ciclo (%)	11 (57,9)	1 (20,0)	0	1 (50,0)	0
G+ 3º ciclo (%)	-	3 (60,0)	2 (40,0)	0	0
G+ 4º ciclo (%)	-	-	1 (20,0)	1 (50,0)	0
G+ 5º ciclo (%)	-	-	-	0	0
G+ 6º ciclo (%)	-	-	-	-	0

G+: gestación positiva

En las pacientes que se realizaron 2 ciclos de estimulación, la probabilidad de obtener un embrión normal fue igual en los dos ciclos (52,5% vs. 47,5%) y el porcentaje de pacientes que quedaron embarazadas con embriones normales obtenidos en el primer o segundo ciclo fue similar (41,1% vs. 57,9%).

En las pacientes con 3 ciclos de estimulación, la probabilidad de obtener un embrión normal fue similar en los 3 ciclos al igual que la probabilidad de conseguir gestación. En las pacientes que se realizaron 4 o 5 ciclos de estimulación, la probabilidad de obtener un embrión normal o de conseguir una gestación se mantuvo hasta la cuarta estimulación. No se consiguieron ni embriones normales ni gestaciones a partir de 4 estimulaciones ni en las pacientes que se realizaron 5 ciclos de estimulación ni en las que se realizaron 6. No obstante, el número de pacientes que llegó a este número de ciclos es escaso, y por tanto no es posible extraer conclusiones al respecto.

06

DISCUSIÓN

Actualmente la vitrificación es la técnica de criopreservación de ovocitos más estandarizada en la práctica diaria, ya que logra resultados clínicos similares a los obtenidos con ovocitos frescos (Almodin *et al.*, 2010; Cobo *et al.*, 2010; Rienzi *et al.*, 2010; Parmegiani *et al.*, 2011; Sole *et al.*, 2013). La vitrificación de ovocitos en diferentes ciclos de estimulación para su acumulación está siendo aplicada con éxito en pacientes bajo respondedoras de forma regular en los ciclos de FIV (Cobo *et al.*, 2012). La introducción de la vitrificación en los programas de FIV abre además las posibilidades de mejorar la selección embrionaria con mayor número de embriones en un ciclo de tratamiento (Cobo y Diaz, 2011; Rienzi *et al.*, 2012) y como hemos descrito en la presente tesis doctoral permitiría mejorar los resultados de los programas de PGD/PGS en pacientes con baja respuesta ovárica, asociada o no a edad materna avanzada, representando una opción simple, reproducible y eficiente.

En los tratamientos de reproducción asistida, el número limitado de ovocitos obtenidos en pacientes definidas como bajo respondedoras supone el principal problema para optimizar las tasas de recién nacido vivo. La consecuencia de recuperar pocos ovocitos es obtener un número reducido de embriones para poder seleccionar y transferir y, por ello, estas pacientes tienen tasas de gestación por transfer más bajas y menor tasa acumulada de embarazo por ciclo iniciado en comparación con pacientes con respuesta adecuada a la estimulación. Las pacientes bajo respondedoras tienen por tanto un menor número de ovocitos y embriones, hecho que reduce significativamente sus posibilidades de éxito en un ciclo de PGS.

Este trabajo de tesis doctoral se centra en pacientes que se realizaron un ciclo de PGS, en los resultados obtenidos en pacientes normo respondedoras y en aquellas con baja respuesta que requirieron varias estimulaciones con objeto de aumentar su probabilidad de éxito.

Un valor añadido de nuestro estudio es el análisis de ciclos mixtos de ovocitos para PGS, evaluando embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados de la misma paciente.

Efecto de la vitrificación en la tasa de supervivencia

6.1

En IVI Valencia, y en todas las clínicas IVI, se cuenta con elevadas tasas de supervivencia de los ovocitos y embriones y el desarrollo e implantación son comparables a los de los ciclos con ovocitos y embriones frescos. En nuestro centro, como ya hemos mencionado anteriormente, el método de vitrificación empleado es el del Cryotop®, avalado por diversos trabajos (Rienzi *et al.*, 2010; Cobo y Diaz, 2011; Cobo *et al.*, 2012; Ku *et al.*, 2012).

La relación entre la supervivencia y la edad, no es más que un reflejo de la calidad ovocitaria, que como es bien sabido declina considerablemente con la edad. De ahí que no sorprende el comportamiento de los ovocitos de pacientes mayores con respecto a la vitrificación en los resultados del presente trabajo de tesis doctoral (del 81,0% al 88,2%).

Una lectura similar, sería que la proporción de ovocitos que se pierden durante la vitrificación, los que no sobreviven, supone un primer filtro para los ovocitos de peor calidad, incapaces de sobrellevar el procedimiento con éxito, sobreviviendo solo los de mejor calidad.

Se han descrito tasas de supervivencia en el programa de ovodonación de IVI Valencia del 97,2% (Cobo *et al.*, 2013), en pacientes con baja respuesta del 84,9% al 95% (Cobo *et al.*, 2012).

Otros centros con ovocitos propios reportan tasas de supervivencia del 89,7% (Ubaldi *et al.*, 2010), 96,8% (Rienzi *et al.*, 2010), estudios multicéntricos del 84,7% (Rienzi *et al.*, 2012) y del 92,5% al 97% (Cobo y Diaz, 2011).

Es evidente que el fin de acumular ovocitos vitrificados en la gestión de ciclos de pacientes con baja respuesta ovárica va íntimamente ligado a la estandarización en el laboratorio de FIV de un sistema de vitrificación eficiente. Las tasas de supervivencia después de la desvitrificación de estos ovocitos deben ser óptimas (entre 80 y 100%); si éste no fuera el caso, dicho enfoque no debería ser ofrecido por las clínicas que no alcancen tales tasas a las pacientes de baja respuesta.

Efecto de la vitrificación en la tasa de fecundación

6.2

Resulta interesante observar en este trabajo que, una vez corregida la merma de ovocitos que no sobreviven a la desvitrificación, se encontraron tasas de fecundación similares independientemente del origen del ovocito, fresco o vitrificado, siendo del 72 al 74%, de igual forma que en el grupo de pacientes con ciclos mixtos (69,0% frescos vs. 71,9% vitrificados) sin encontrar diferencias significativas en cuanto al origen de los ovocitos. Del mismo modo que reporta Goldman (Goldman *et al.*, 2013).

Nuestros datos se comparan con otros encontrados en la literatura en pacientes de baja respuesta (66,8% frescos vs. 65,6% desvitrificados) (Cobo *et al.*, 2012), y en publicaciones con ovocitos donados, con tasas de fecundación del 79,2% en ovocitos frescos y del 76,6% en desvitrificados (Rienzi *et al.*, 2010) y en otras publicaciones del 80,7% en frescos y del 78,2% en vitrificados (Sole *et al.*, 2013).

Efecto de la vitrificación en el desarrollo embrionario

6.3

- **Desarrollo embrionario temprano:** Los resultados de este estudio muestran un mayor bloqueo embrionario hasta D3 en el grupo de ovocitos vitrificados, dando lugar a un porcentaje significativamente menor de embriones con buen desarrollo y que fueron biopsiados en D3 con respecto al total de ovocitos correctamente fecundados en cada grupo, 75,6% frescos vs. 69,1% desvitrificados. Sin embargo, no se vio reflejado en diferencias significativas en la media de embriones biopsiados por ciclo de PGS (5,1 frescos vs. 4,5 desvitrificados) debido a que este efecto, junto con el menor número de ovocitos MII, se vio compensado por el hecho de haber realizado una media de 2,2 estimulaciones en el grupo de ovocitos vitrificados, frente a una única estimulación en el grupo de ovocitos frescos.

Dicho incremento del bloqueo embrionario en D3 también se dio en el subgrupo de ovocitos vitrificados de los ciclos mixtos, hecho que se reflejó en una tasa significativamente menor de embriones biopsiados para este subgrupo (77,1% frescos vs. 65,9% desvitrificados). Este grupo de ovocitos mixtos, en el que los ovocitos frescos y vitrificados proceden de las mismas pacientes nos sirve como control para poder determinar un ligero efecto de la vitrificación en el desarrollo embrionario temprano, con ligero incremento de bloqueo embrionario en los

primeros estadios tras la vitrificación. Resultados que coinciden con otros descritos anteriormente en la literatura (Forman *et al.*, 2012; Forman *et al.*, 2013).

- Tasa de blastocisto: Por otro lado, en el grupo de ovocitos vitrificados también se observó una menor tasa de llegada a blastocisto en D5 (67,5% frescos vs. 58,1% vitrificados), que podría estar justificado por las diferencias significativas en la edad de las mujeres incluidas en cada uno de los grupos. Sin embargo en los ciclos mixtos, resulta muy interesante no encontrar diferencias estadísticamente significativas en la tasa de blastocisto entre cada subgrupo (58,2% y 58,9% en ovocitos frescos y vitrificados, respectivamente), no existiendo pues diferencias intrasujeto en cuanto al desarrollo a blastocisto respecto del número de embriones biopsiados, independientemente del origen del ovocito.

Sin embargo, otros autores sí reportan una menor tasa de blastocisto procedentes de ovocitos vitrificados (Forman *et al.*, 2012; Goldman *et al.*, 2013).

Así pues, los resultados presentados sugieren que la vitrificación podría ejercer una selección temprana, con un primer punto de selección en la supervivencia a la vitrificación y un segundo punto de control en las dos primeras divisiones antes de la activación del genoma embrionario.

Efecto de la vitrificación en la incidencia de aneuploidías

6.4

Los resultados de PGS mediante la técnica de aCGH fueron validados previamente con una informatividad del 97,1% en los embriones analizados, con una tasa de error del 1,9% (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Mir *et al.*, 2013). En nuestro estudio la tasa de informatividad fue del 99% sin observarse diferencias significativas entre ambos grupos según el origen ovocitario. Por tanto, la técnica de aCGH permite un análisis altamente preciso en el análisis de todos los cromosomas, proporcionando una valiosa información para pacientes, embriólogos y clínicos.

Como ya hemos mencionado, el número de embriones generado en un ciclo de reproducción asistida está relacionado con el número de ovocitos recuperados. En un estudio descriptivo se determinó la frecuencia de aneuploidías mediante aCGH en función de la edad, mostrando una correlación negativa entre la edad de la mujer y la tasa de euploidía embrionaria (Ata *et al.*, 2012), de forma similar a los resultados de

antiguas publicaciones (Marquez *et al.*, 2000; Munne *et al.*, 1995). En este estudio también se comparó la tasa de euploidia embrionaria con el número de ovocitos obtenidos y no se observó impacto de la respuesta ovocitaria en el porcentaje de embriones euploides (Ata *et al.*, 2012). No obstante, aunque la proporción de embriones euploides permaneció sin cambios, la proporción de las mujeres que tenían al menos un embrión euploide aumentaba cuando se obtuvieron más ovocitos y embriones.

En un ciclo de estimulación convencional la tasa de aneuploidías no está relacionada con el número de embriones generados, un número razonable de ovocitos MII aspirados podría ser 15, tal como se sugiere en otros trabajos (Garrido *et al.*, 2011; Sunkara *et al.*, 2011). Sin embargo este estudio no argumenta a favor o en contra de los protocolos convencionales de estimulación ovárica *versus* estimulaciones leves o ciclos naturales ya que podría haber repercusiones en la receptividad endometrial, y estaría pues fuera del alcance de este estudio buscar la relación de diferentes protocolos de estimulación y regímenes hormonales, con la euploidia y con las tasas de implantación (Baart *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2011).

Los resultados de un reciente trabajo del equipo de Grifo (Goldman *et al.*, 2015), donde realizaron biopsia de trofoectodermo en el estadio de blastocisto de embriones procedentes de ovocitos vitrificados, aportan más datos sobre la seguridad y eficacia de la criopreservación de ovocitos. Aunque obtuvieron una menor tasa de llegada a blastocisto, no encontraron diferencias en las tasa de aneuploidías, ni en las de implantación y recién nacidos en comparación con los blastocistos derivados de ovocitos frescos.

Resulta imprescindible en este apartado hacer referencia al efecto de la vitrificación sobre el huso meiótico del ovocito, estructura particularmente sensible implicada en la segregación de cromosomas. Cuestión ya planteada desde hace años con la congelación lenta, son numerosos los estudios en animales y humanos al respecto (Pickering y Johnson, 1987; Joly *et al.*, 1992; Gook *et al.*, 1993; Aman y Parks, 1994; Almeida y Bolton, 1995; Rienzi *et al.*, 2004; Noyes *et al.*, 2010).

En el laboratorio de IVI Valencia empleamos el método Cryotop® de manera rutinaria desde el año 2007. Además de evaluar los resultados clínicos conseguidos con esta técnica, se realizó una evaluación básica de los efectos de la técnica sobre los ovocitos. Estos estudios incluyeron el análisis del huso meiótico *in vivo* mediante el sistema de luz polarizada Oosight™ (Martinez-Burgos *et al.*, 2011). Se evaluó la presencia del huso

meiótico antes de la vitrificación (en fresco), durante el equilibrio, inmediatamente tras la desvitrificación y a las dos horas post-desvitrificación. La estructura del huso meiótico aparece de forma clara y característica. No hay que olvidar que el proceso de equilibrio se realiza a temperatura ambiente, con lo que la tubulina debería depolimerizarse. Sin embargo esto no ocurre debido a la presencia de crioprotectores que actúan como estabilizadores de esta proteína, lo que explica que el huso meiótico esté íntegro tras 1 minuto a temperatura ambiente. Esto no ocurre en los protocolos de congelación lenta, en los que los ovocitos permanecen a temperatura ambiente durante mucho tiempo en presencia de crioprotectores relativamente baja. En los procesos de vitrificación/desvitrificación el huso desaparece durante la fase de dilución del crioprotector si ésta se realiza a temperatura ambiente. Este hecho resulta lógico, ya que estamos retirando el crioprotector permeable, permitiendo la rehidratación del ovocito, de esta forma los ovocitos son expuestos unos minutos a temperatura ambiente en ausencia de crioprotector, lo que explica la depolimerización del huso meiótico (Ciotti *et al.*, 2009). Existen diferencias significativas en las mediciones de retardancia en fresco, inmediatamente tras la desvitrificación y a las 2 horas de cultivo *in vitro*, al cabo de las cuales las mediciones de retardancia vuelven a ser las mismas que en fresco, lo que indica que el huso se ha repolimerizado tras el cultivo a temperatura fisiológica.

Adicionalmente, los datos de otra publicación indican que el proceso de vitrificación de ovocitos no incrementa las aneuploidías embrionarias y no posee impacto sobre la implantación (Forman *et al.*, 2012), lo que constituye un aporte muy valioso para la validación de la técnica, ya que indica que los embriones generados a partir de ovocitos vitrificados no tienen un riesgo incrementado de generar embriones con anomalías cromosómicas.

Otras hipótesis sugieren centrar la investigación en el impacto de la vitrificación de ovocitos y su desarrollo hasta blastocisto sobre los orgánulos subcelulares, estructuras críticas como el aparato de Golgi, ribosomas o mitocondrias (Smith *et al.*, 2011). Un trabajo previo con vitrificación lenta de ovocitos ya sugería una pérdida de polaridad mitocondrial después de la descongelación (Jones *et al.*, 2004). En IVI también se estudiaron los posibles efectos subcelulares de la vitrificación con Cryotop® mediante un estudio de ultraestructura de ovocitos vitrificados (datos no publicados). No se observaron cambios morfológicos destacables, hallazgo que coincide con los encontrados por otros investigadores (Nottola *et al.*, 2009).

En nuestro estudio, en las pacientes con ciclos mixtos se observó una ligera disminución de la tasa global de aneuploidías en los ovocitos vitrificados (84,7% vs. 77,3%), sin embargo el rendimiento global considerado como blastocisto euploide por ovocito MII inicial obtenido fue similar (7,5% y 6,8% en frescos y vitrificados respectivamente). Este efecto se podría explicar por un mayor porcentaje de ovocitos aneuploides entre aquellos que no sobreviven a la vitrificación y que no alcanzan un desarrollo embrionario temprano óptimo, de manera que entre los embriones biopsiados existen menos embriones aneuploides en el grupo de ovocitos vitrificados y por la compensación de ambos efectos, el resultado final sobre la eficiencia del ciclo fue similar.

Estos datos son altamente destacables ya que el análisis de cohortes embrionarias procedentes de ovocitos frescos y desvitrificados de una misma paciente corroboran la idea de que la técnica de vitrificación por el método Cryotop® es una técnica segura que no incrementa las aneuploidías en los embriones.

De forma más específica, los datos del presente estudio no mostraron diferencias significativas en los diferentes tipos de anomalías cromosómicas analizadas (aneuploidías segmentales, complejas y caóticas) según el origen del ovocito.

En la literatura se ha descrito que el riesgo de anomalías complejas en los blastocistos aneuploides se veía incrementado con la edad (Franasiak *et al.*, 2014; Rodrigo *et al.*, 2014). Dado el tamaño muestral de las cohortes de nuestro estudio no nos permite estratificar ni realizar rangos de edad e indicación clínica para valorar este efecto.

La vitrificación de ovocitos no aumenta la incidencia de aneuploidías.

Nuestros resultados concuerdan con la correlación negativa descrita entre la edad de la mujer y la euploidía embrionaria (Marquez *et al.*, 2000; Munne *et al.*, 1995). 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 con alta respuesta son aneuploides, lo cual es más elevado de lo

esperable ya que se trata de mujeres jóvenes, sanas y fértiles (Reis Soares *et al.*, 2003; Munne *et al.*, 2006; Keskintepe *et al.*, 2007). Estos datos podrían explicar 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 *et al.*, 1989; Pickering *et al.*, 1990; McKiernan y Bavister, 1990; Almeida y Bolton, 1995; Natale *et al.*, 2001; Viuff *et al.*, 2001; Beyer *et al.*, 2009; Nelissen *et al.*, 2012) o la estimulación ovárica *per se* (Munne *et al.*, 1997).

Estimulaciones moderadas no incrementan la tasa de aneuploidías (Baart *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2011; Labarta *et al.*, 2012). Son interesantes los resultados derivados del análisis de ciclos no estimulados para FIV que 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. 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 (Labarta *et al.*, 2012; Labarta *et al.*, 2014).

Impacto clínico de la vitrificación

6.5

La utilidad y seguridad de la aplicación de programas de vitrificación de ovocitos la avalan sus resultados comparables a los de ovocitos frescos en tasas de fecundación, desarrollo embrionario y tasas de implantación. Como referente presentamos el estudio publicado por Cobo *et al.* en 2012 en el que se incluyen pacientes con baja respuesta ovárica. Aunque no encontraron diferencias significativas, la tasa de recién nacido vivo por paciente en el grupo de acumulación de ovocitos dobló la conseguida en el grupo de pacientes que realizó los ciclos en fresco. Otro hallazgo importante fue que la tasa de cancelación de la transferencia embrionaria fue significativamente menor en el grupo que vitrificó ovocitos (9,1% vs. 34,0%). Otra ventaja de esta estrategia fue que al disponer de una cohorte embrionaria mayor, la disponibilidad de

embriones adicionales para vitrificar para futuras criotransferencias (28,9% vs. 8,7%) también fue mayor, incrementando así la tasa de éxito acumulada (36,4% vs. 23,7%) (Cobo *et al.*, 2012).

Por otra parte los ovocitos que sobreviven, fecundan y evolucionan conservan su potencial para implantar y dar lugar a gestación de una manera similar a la que se observa con ovocitos frescos, como así lo indica la tasa de gestación e implantación (Forman *et al.*, 2012; Goldman *et al.*, 2015).

En el presente trabajo de tesis doctoral no encontramos diferencias significativas en la tasa de gestación evolutiva por transfer. Y lo que es más importante, igualándose los resultados de las pacientes bajo respondedoras a los de las normo respondedoras cuando se acumulan ovocitos en la baja respuesta.

En las pacientes con baja respuesta se ha descrito una alta tasa de abandono del tratamiento, por ello la vitrificación se ha postulado como una estrategia para disminuir en lo posible la tasa de cancelación (Verberg *et al.*, 2008). Por tanto, la acumulación de ovocitos mediante la vitrificación en situaciones de respuesta disminuida a la estimulación, está asociada a una menor tasa de abandono y de transferencias canceladas, mejores tasas de recién nacido vivo por transferencia realizada, más ciclos con embriones vitrificados y mayor tasa acumulada de niño en casa, lo que supone una alternativa exitosa de tratamiento en estos casos. Además, disminuye la tasa de abandono del tratamiento secundaria a los malos resultados obtenidos por la imposibilidad de los pacientes de sobrellevar la situación, reportándose una tasa de abandono superior al 75% en pacientes con baja respuesta que siguen su ciclo de FIV con los ovocitos obtenidos en un ciclo en fresco (Cobo *et al.*, 2012).

Nuestro estudio retrospectivo de cohortes demuestra, aunque con un limitado número de casos, que los resultados obtenidos con la vitrificación de ovocitos en otros grupos de pacientes se pueden trasladar a los programas de diagnóstico genético preimplantacional, donde las pacientes con baja respuesta pueden beneficiarse de la vitrificación de ovocitos después de varios ciclos repetidos de estimulación ovárica para mejorar sus probabilidades de encontrar un embrión normal para la transferencia y con ello incrementar la tasa de embarazo por tratamiento.

No encontramos diferencias clínicas según el origen de los ovocitos, obteniendo un rendimiento similar por MII inyectado: No se observaron diferencias estadísticas en el

número de blastocistos euploides por ovocito MII microinyectado (10,0% frescos vs. 7,1% desvitrificados), cálculo en el que en el grupo de ovocitos desvitrificados no se contabilizaron los ovocitos que no sobrevivieron a la vitrificación. Sí que se observaron sin embargo diferencias significativas en el número de blastocistos euploides por número de ovocitos MII iniciales totales del que partimos (10,0% frescos vs. 6,2% desvitrificados; $P < 0,01$). Estas diferencias se podrían explicar por la diferencia de la media de edad de los dos grupos, 38,9 vs. 40,9, con mayor edad en el grupo de ovocitos vitrificados, donde también se observó una tendencia no significativa hacia un mayor porcentaje de embriones aneuploides. Todos estos datos apuntan hacia una mejora en el resultado global de la paciente por una menor tasa de abandono.

Otra alternativa sería la acumulación de embriones vitrificados en día 2 o día 3 de desarrollo (Cobo *et al.*, 2012) con resultados clínicos también prometedores en PGS (Rodrigo *et al.*, 2014). Se han descrito perfiles metabólicos similares entre embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados, datos que refuerzan la idea de acumular tanto ovocitos como embriones para un único ciclo de diagnóstico (Dominguez *et al.*, 2013). También debe considerarse como estrategia la acumulación de blastocistos vitrificados para el diagnóstico genético.

Relación coste-beneficio

6.6

Cualquier sesgo debido a un mayor número de embriones o la edad de la mujer se elimina por la estratificación de los datos según número de embriones y la edad materna y por el uso de modelos de regresión. En este estudio de tesis doctoral, la media de embriones biopsiados en los ciclos de acumulación de ovocitos de pacientes con baja respuesta fue equiparable al de las pacientes normo respondedoras. Esta estrategia puede compararse con los casos reportados en Europa, por ejemplo, donde el número medio de embriones generados en El Reino Unido entre 1991 y 2008 fue de 5, en más de 400.000 ciclos (Sunkara *et al.*, 2011). No sucede así en los Estados Unidos, donde los protocolos de estimulación suelen ser más agresivos en general. Sin embargo, es difícil demostrar este punto ya que la Sociedad Tecnológica de Reproducción Asistida (SART) de este país no informa sobre el número de embriones generados.

Aunque los costes de tratamiento pueden ser doble o triple en comparación con una única estimulación ovárica para ICSI con PGS, el total de costes de los ciclos

acumulados son inferiores porque los pacientes suelen abonar un único procedimiento de ICSI (en el caso de acumulación de ovocitos) y un sólo análisis genético combinado con la transferencia de un embrión.

El objetivo de un tratamiento de reproducción asistida es lograr un recién nacido vivo sano, preferiblemente gestación única, en el menor tiempo posible empleando el método más seguro y con la menor intervención. La transferencia de más de un embrión aumenta el riesgo de embarazo múltiple. Cuando existen limitaciones estrictas sobre el número de embriones a transferir, los aCGH pueden ayudar a lograr un embarazo único viable en el menor tiempo posible con el menor número de transferencias embrionarias, minimizando el riesgo de abortos y de recién nacidos vivos con cromosomopatías.

Número de estimulaciones

6.7

Los resultados de un ciclo de PGS también van a estar influidos por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Por ello es recomendable obtener un número mínimo de ovocitos como resultado de la estimulación ovárica. Vandervorst aconsejaba cancelar aquellos ciclos en los que no se esperara obtener al menos 6 ovocitos, ya que las expectativas de transferencia y embarazo se reducen considerablemente (Vandervorst *et al.*, 1998). Sin embargo, la vitrificación de ovocitos nos permite acumularlos en varios ciclos de estimulación hasta conferir a este grupo de pacientes el estatus de normo respondedoras.

Este trabajo de tesis doctoral nos ha permitido demostrar que la estrategia de acumular ovocitos vitrificados procedentes de ciclos de estimulación hormonal consecutivos permite obtener un número suficiente de embriones disponibles para el diagnóstico genético. Como consecuencia de ello, un elevado porcentaje de las pacientes tuvieron transferencia de al menos un blastocisto euploide.

Finalmente, en cuanto al número recomendado de estimulaciones a realizar previas al ciclo de PGS, hemos visto que la probabilidad de obtener un embrión normal o de conseguir una gestación en las pacientes que se realizaron 4 o 5 ciclos de estimulación se mantuvo hasta la cuarta estimulación. Sin conseguirse ni embriones normales ni gestaciones a partir de 4 estimulaciones ni en las pacientes que se realizaron 5 ciclos de estimulación ni en las que se realizaron 6. No obstante, como ya hemos mencionado en el apartado de resultados, el número de pacientes en las que se realizaron más de 3

ciclos fue muy limitado y sólo podemos considerar relevantes los resultados obtenidos hasta el tercer ciclo de estimulación.

Es fundamental además considerar en cada caso el número de estimulaciones a realizar en función del número de ovocitos obtenidos en cada ciclo y la edad de la paciente.

Este trabajo de tesis doctoral también sugiere que lo más aconsejable es informar a las pacientes de que debemos garantizar un número razonable de ovocitos vitrificados con el fin de incrementar las posibilidades de éxito, por lo que probablemente se requiera más de un ciclo de estimulación.

07

CONCLUSIONES

- 1) La supervivencia de los ovocitos al proceso de vitrificación es muy elevada y está relacionada con la calidad ovocitaria, la cual declina con la edad de la paciente.
- 2) La vitrificación de ovocitos no afecta a la tasa de fecundación. Sí que existe un ligero impacto negativo de la vitrificación de ovocitos sobre el desarrollo embrionario temprano, pero se corrige durante el desarrollo posterior, no observándose un efecto sobre la tasa de llegada a blastocisto.
- 3) La vitrificación de ovocitos no aumenta la incidencia de aneuploidías embrionarias.
- 4) En un ciclo de PGS, la probabilidad de obtener al menos un blastocisto euploide es independiente del origen fresco o vitrificado del ovocito, siendo el rendimiento por ovocito MII inyectado equiparable.
- 5) La vitrificación de ovocitos no disminuye el potencial implantatorio de los embriones, por lo que la acumulación de ovocitos para aumentar las posibilidades de encontrar un blastocisto euploide, puede ser una estrategia adecuada en un programa de PGS.
- 6) La probabilidad de obtener un embrión normal o de conseguir gestación se mantiene estable en los tres primeros ciclos de estimulación. A partir de tres ciclos el reducido número de casos que hemos realizado no nos permite establecer conclusiones.

08

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Asmar N, Peinado V, Vera M, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Hassold T and Rubio C. Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage. *Fertil Steril* 2012;98:145-150.
- Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, Al-Deery M, Jaroudi K and Coskun S. Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl* 2005;51:69-76.
- Almeida PA and Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995;3:357-365.
- Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL and Pereira PC. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod* 2010;25:1192-1198.
- Aman RR and Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994;50:103-110.
- Ata B, Kaplan B, Danzer H, Glassner M, Opsahl M, Tan SL and Munne S. Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated. *Reprod Biomed Online* 2012;24:614-620.
- Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, Macklon NS and Fauser BC. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007;22:980-988.
- Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, Gianaroli L, Magli MC, Venturini PL, Francioso R, Conte N and Ragni N. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2004;9:312-320.
- Beyer CE, Osianlis T, Boekel K, Osborne E, Rombauts L, Catt J, Kravetski V, Aali BS and Gras L. Preimplantation genetic screening outcomes are associated with culture conditions. *Hum Reprod* 2009;24:1212-1220.
- Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, Haentjens P, Van der Elst J and Devroey P. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online* 2008;17:848-854.
- Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS and Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:58-65.
- Campos-Galindo I, Garcia-Herrero S, Martinez-Conejero JA, Ferro J, Simon C and Rubio C. Molecular analysis of products of conception obtained by hysteroembryoscopy from infertile couples. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:839-848.
- Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, Kort HI and Nagy ZP. Two successful pregnancies obtained following oocyte

- vitrification and embryo re-vitrification. *Reprod Biomed Online* 2008;16:346-349.
- Chatziparasidou A, Nijs M, Moisdou M, Chara O, Ioakeimidou C, Pappas C and Christoforidis N. Accumulation of oocytes and/or embryos by vitrification: a new strategy for managing poor responder patients undergoing pre implantation diagnosis. *F1000Res* 2013;2:240-240.v2. eCollection 2013.
- Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A and Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril* 2009;91:2399-2407.
- Cobo A, Bellver J, Domingo J, Perez S, Crespo J, Pellicer A and Remohi J. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. *Reprod Biomed Online* 2008;17:68-72.
- Cobo A, Castello D, Vallejo B, Albert C, de los Santos JM and Remohi J. Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes: double vitrification has no impact on delivery rates. *Fertil Steril* 2013;99:1623-1630.
- Cobo A, de los Santos MJ, Castello D, Gamiz P, Campos P and Remohi J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril* 2012;98:1138-46.e1.
- Cobo A and Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011;96:277-285.
- Cobo A, Garrido N, Crespo J, Jose R and Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online* 2012;24:424-432.
- Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A and Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657-1664.
- Cobo A, Meseguer M, Remohi J and Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;25:2239-2246.
- Cobo A, Remohi J, Chang CC and Nagy ZP. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *Reprod Biomed Online* 2011;23:341-346.
- Cobo A, Vajta G and Remohi J. Vitrification of human mature oocytes in clinical practice. *Reprod Biomed Online* 2009;19 Suppl 4:4385.
- Cohen J, Wells D and Munne S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 2007;87:496-503.
- Collodel G, Giannerini V, Antonio Pascarelli N, Federico MG, Comodo F and Moretti E. TEM and FISH studies in sperm from men of couples with recurrent

- pregnancy loss. *Andrologia* 2009;41:352-360.
- Creasy MR, Crolla JA and Alberman ED. A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Hum Genet* 1976;31:177-196.
- de Boer EJ, den Tonkelaar I, te Velde ER, Burger CW, Klip H, van Leeuwen FE and OMEGA-project group. A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause. *Fertil Steril* 2002;77:978-985.
- De Souza E, Halliday J, Chan A, Bower C and Morris JK. Recurrence risks for trisomies 13, 18, and 21. *Am J Med Genet A* 2009;149A:2716-2722.
- de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP and Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357-362.
- Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, Meuleman C, Frijns JP, Vermeesch JR and D'Hooghe TM. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2010;93:364-373.
- Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, Martinez S, Al-Asmar N, Riboldi M, Diaz-Gimeno P, Valbuena D and Simon C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil Steril* 2015;104:534-541.e1.
- Dominguez F, Castello D, Remohi J, Simon C and Cobo A. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertil Steril* 2013;99:565-572.
- Edgar DH and Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2012;18:536-554.
- El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A and Braude P. Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve--an eight year study. *Hum Reprod* 2002;17:1519-1524.
- Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 1986;23:1-13.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L and ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616-1624.
- Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Spizzichino L, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F and Michel CE. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014;101:1375-1382.
- Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, Treff NR and Scott RT, Jr. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:100-7.e1.

- Forman EJ, Li X, Ferry KM, Scott K, Treff NR and Scott RT, Jr. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril* 2012;98:644-649.
- Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel CE, Kokocinski F, Cohen J, Munne S and Wells D. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS Genet* 2015;11:e1005241.
- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR and Scott RT, Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014;101:656-663.e1.
- Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Muntefering H and Rehder H. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 2001;9:539-547.
- Fuller B and Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004;9:680-691.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA and Wright G, Jr. Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase I, 1981. *Fertil Steril* 1983;39:167-173.
- Garcia JI, Noriega-Portella L and Noriega-Hoces L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod* 2011;26:782-790.
- Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martinez M, Carmona L and Pellicer A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril* 2013;99:1994-1999.
- Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, Martinez-Salazar FJ, Landazabal A, Remohi J, Pellicer A and Simon C. High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod* 2000;15:2292-2296.
- Garcia-Velasco JA, Moreno L, Pacheco A, Guillen A, Duque L, Requena A and Pellicer A. The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil Steril* 2005;84:82-87.
- Garrido N, Bellver J, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Cumulative live-birth rates per total number of embryos needed to reach newborn in consecutive in vitro fertilization (IVF) cycles: a new approach to measuring the likelihood

- of IVF success. *Fertil Steril* 2011;96:40-46.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP and Iammarrone E. Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J Endocrinol Invest* 2000;23:711-716.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP and Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999;72:837-844.
- Goldman KN, Kramer Y, Hodes-Wertz B, Noyes N, McCaffrey C and Grifo JA. Long-term cryopreservation of human oocytes does not increase embryonic aneuploidy. *Fertil Steril* 2015;103:662-668.
- Goldman KN, Noyes NL, Knopman JM, McCaffrey C and Grifo JA. Oocyte efficiency: does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a per-oocyte basis?. *Fertil Steril* 2013;100:712-717.
- Gook DA, Osborn SM and Johnston WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993;8:1101-1109.
- Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D and Munne S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011;95:953-958.
- Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013;100:595-602.
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, Reismer E, Borg K, Wikland M and Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008;23:2806-2812.
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM and Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;5:708-714.
- Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH and Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995;15:41-49.
- Harton GL, Munne S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, Griffin DK, Wells D and PGD Practitioners Group. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2013;100:1695-1703.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA and Jacobs PA. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980;44:151-178.

BIBLIOGRAFÍA

- Hernandez ER, Hurwitz A, Vera A, Pellicer A, Adashi EY, LeRoith D and Roberts CT, Jr. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:419-425.
- Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A and Garcia-Velasco JA. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:1137-1140.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M and Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004;19:2884-2888.
- Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M and Munne S. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril* 2012;98:675-680.
- Hook EB, Cross PK, Jackson L, Pergament E and Brambati B. Maternal age-specific rates of 47,+21 and other cytogenetic abnormalities diagnosed in the first trimester of pregnancy in chorionic villus biopsy specimens: comparison with rates expected from observations at amniocentesis. *Am J Hum Genet* 1988;42:797-807.
- Joly C, Bchini O, Boulekbache H, Testart J and Maro B. Effects of 1,2-propanediol on the cytoskeletal organization of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1992;7:374-378.
- Jones A, Van Blerkom J, Davis P and Toledo AA. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Hum Reprod* 2004;19:1861-1866.
- Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakisn K, Cengiz G and Donmez E. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2000;15:2003-2007.
- Kailasam C, Keay SD, Wilson P, Ford WC and Jenkins JM. Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome. *Hum Reprod* 2004;19:1544-1547.
- Keltz MD, Vega M, Sirota I, Lederman M, Moshier EL, Gonzales E and Stein D. Preimplantation genetic screening (PGS) with Comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1333-1339.
- Keskintepe L, Agca Y, Sher G, Keskintepe M and Maassarani G. High survival rate of metaphase II human oocytes after first polar body biopsy and vitrification: determining the effect of previtrification conditions. *Fertil Steril* 2009;92:1706-1715.

- Keskintepe L, Sher G and Keskintepe M. Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: comparison between fluorescence in-situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online* 2007;15:303-309.
- Kim JW, Lee WS, Yoon TK, Seok HH, Cho JH, Kim YS, Lyu SW and Shim SH. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC Med Genet* 2010;11:153-2350-11-153.
- Ku PY, Lee RK, Lin SY, Lin MH and Hwu YM. Comparison of the clinical outcomes between fresh blastocyst and vitrified-thawed blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1353-1356.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A and Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999;14:3077-3079.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O and Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300-308.
- Kyrou D, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Bontis J and Tarlatzis BC. How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2009;91:749-766.
- Labarta E, Bosch E, Alama P, Rubio C, Rodrigo L and Pellicer A. Moderate ovarian stimulation does not increase the incidence of human embryo chromosomal abnormalities in in vitro fertilization cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1987-94.
- Labarta E, Bosch E and Pellicer A. Impact of ovarian stimulation with gonadotrophins on embryo aneuploidy. *Hum Reprod Update* 2014;20:964.
- La Marca A, and Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;20:124-140.
- Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM *et al.* Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996;14:400-405.
- Lee DW, Grasso P, Dattatreymurty B, Deziel MR and Reichert LE, Jr. Purification of a high molecular weight follicle-stimulating hormone receptor-binding inhibitor from human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:163-168.
- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P and Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?. *Reprod Biomed Online* 2003;7:623-633.
- Liebermann J and Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006;86:20-26.

BIBLIOGRAFÍA

- Loutradis D, Drakakis P, Milingos S, Stefanidis K and Michalas S. Alternative approaches in the management of poor response in controlled ovarian hyperstimulation (COH). *Ann N Y Acad Sci* 2003;997:112-119.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Gordts S, Fredericks V and Crippa A. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online* 2009;18:536-542.
- Magli MC, Gianaroli L, Munne S and Ferraretti AP. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:297-301.
- Manor D, Kol S, Lewit N, Lightman A, Stein D, Pillar M and Itskovitz-Eldor J. Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum Reprod* 1996;11:2502-2506.
- Manor D, Stein D and Itskovitz-Eldor J. Preimplantation diagnosis by FISH: the Rambam experience. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:308-309.
- Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M and Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 2006;21:3036-3043.
- Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M and Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000;1:17-26.
- Martinez-Burgos M, Herrero L, Megias D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC and Garcia-Velasco JA. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril* 2011;95:374-377.
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F and Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011;17:454-466.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM *et al.* In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9-17.
- Mateu E, Rodrigo L, Prados N, Gil-Salom M, Remohi J, Pellicer A and Rubio C. High incidence of chromosomal abnormalities in large-headed and multiple-tailed spermatozoa. *J Androl* 2006;27:6-10.
- McKiernan SH and Bavister BD. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 1990;43:404-413.
- Mercader A, Valbuena D and Simon C. Human embryo culture. *Methods Enzymol* 2006;420:3-18.
- Mersereau JE, Plunkett BA and Cedars MI. Preimplantation genetic screening in older women: a cost-effectiveness analysis. *Fertil Steril* 2008;90:592-598.
- Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P and Karande VC. A prospective randomized controlled trial

- of preimplantation genetic screening in the "good prognosis" patient. *Fertil Steril* 2009;91:1731-1738.
- Milan M, Cobo AC, Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendia P, Peinado V, Delgado A, Mir P, Simon C *et al.* Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online* 2010;21:649-657.
- Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milan M, Mercader A, Buendia P, Delgado A, Pellicer A, Remohi J *et al.* Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010;25:1812-1817.
- Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendia P, Mateu E, Milan-Sanchez M, Peinado V, Pellicer A, Remohi J, Simon C *et al.* False positive rate of an arrayCGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:143-149.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J and Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-391.
- Munne S, Ary J, Zouves C, Escudero T, Barnes F, Cinioglu C, Ary B and Cohen J. Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online* 2006;12:340-346.
- Munne S and Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998;4:842-855.
- Munne S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, Tucker M, Cohen J and Gianaroli L. Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 1997;12:780-784.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C and Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* 2002;4:223-232.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J and Sable D. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91-97.
- Munne S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J and Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 2004;24:638-643.
- Munne S, Sultan KM, Weier HU, Grifo JA, Cohen J and Rosenwaks Z. Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1191-9; discussion 1199-201.
- Munne S, Wells D and Cohen J. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril* 2010;94:408-430.
- Nagaoka SI, Hassold TJ and Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and

BIBLIOGRAFÍA

- new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 2012;13:493-504.
- Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Toledo AA and Kort HI. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertil Steril* 2009;92:520-526.
- Natale DR, De Sousa PA, Westhusin ME and Watson AJ. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR. *Reproduction* 2001;122:687-693.
- Nelissen EC, Van Montfoort AP, Coonen E, Derhaag JG, Geraedts JP, Smits LJ, Land JA, Evers JL and Dumoulin JC. Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 2012;27:1966-1976.
- Nottola SA, Coticchio G, Sciajno R, Gambardella A, Maione M, Scaravelli G, Bianchi S, Macchiarelli G and Borini A. Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. *Reprod Biomed Online* 2009;19 Suppl 3:17-27.
- Noyes N, Knopman J, Labella P, McCaffrey C, Clark-Williams M and Grifo J. Oocyte cryopreservation outcomes including pre-cryopreservation and post-thaw meiotic spindle evaluation following slow cooling and vitrification of human oocytes. *Fertil Steril* 2010;94:2078-2082.
- Oktay K, Rodriguez-Wallberg KA and Sahin G. Fertility preservation by ovarian stimulation and oocyte cryopreservation in a 14-year-old adolescent with Turner syndrome mosaicism and impending premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2010;94:753.e15-753.e19.
- Pabon JE, Jr, Findley WE and Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 1989;51:896-900.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM and Filicori M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:505-512.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Remohi J, Pellicer A and Simon C. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls. *J Soc Gynecol Investig* 2003a;10:315-322.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online* 2003b;6:232-237.
- Pellicer A, Ardiles G, Neuspiller F, Remohi J, Simon C and Bonilla-Musoles F. Evaluation of the ovarian reserve in young low responders with normal basal levels of follicle-stimulating hormone using three-dimensional ultrasonography. *Fertil Steril* 1998;70:671-675.

- Pellicer A, Ballester MJ, Serrano MD, Mir A, Serra-Serra V, Remohi J and Bonilla-Musoles FM. Aetiological factors involved in the low response to gonadotrophins in infertile women with normal basal serum follicle stimulating hormone levels. *Hum Reprod* 1994;9:806-811.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Minguez Y, Gimenez C, Egozcue J, Remohi J and Simon C. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999;71:1033-1039.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A and Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102-108.
- Pickering SJ and Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1987;2:207-216.
- Polyzos NP and Devroey P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel?. *Fertil Steril* 2011;96:1058-61.e7.
- Polyzos NP, Nwoye M, Corona R, Blockeel C, Stoop D, Haentjens P, Camus M and Tournaye H. Live birth rates in Bologna poor responders treated with ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online* 2014;28:469-474.
- Reis Soares S, Rubio C, Rodrigo L, Simon C, Remohi J and Pellicer A. High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2003;80:656-657.
- Remohi J, Vidal A and Pellicer A. Oocyte donation in low responders to conventional ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993;59:1208-1215.
- Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G, Remohi J, Ragni G and Ubaldi FM. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod* 2012;27:1606-1612.
- Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J and Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004;19:655-659.
- Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F and Ubaldi F. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010;25:66-73.
- Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Cobo AC, Peinado V, Milan M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, Garcia-Herrero S, Mir P *et al*. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res Int* 2014;2014:517125.

BIBLIOGRAFÍA

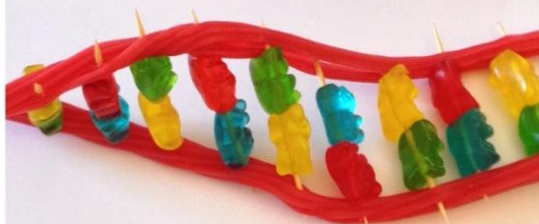
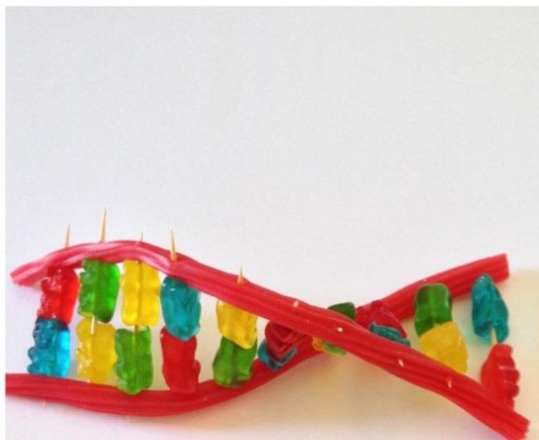
- Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Gil-Salom M and Rubio C. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2010;94:1380-1386.
- Rodrigo L, Rubio C, Peinado V, Villamon R, Al-Asmar N, Remohi J, Pellicer A, Simon C and Gil-Salom M. Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples. *Fertil Steril* 2011;95:1005-1012.
- Rubio C, Bellver J, Castellón G, Guillem A, Vidal C and Giles J. RCT study in advanced maternal age patients using array-CGH: interim analysis. *Hum.Reprod.* 2014:Vol. 29, Supp 1, i16.
- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, De los Santos MJ, Giles J, Labarta E, Domingo J *et al.* Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril* 2013;99:1400-1407.
- Rubio C, Buendia P, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Peinado V, Delgado A, Milan M, Mir P, Simon C *et al.* Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2009;18:687-693.
- Rubio C, Castellón G, Rodrigo L, Bellver J, Guillen A and Remohí J. Improvement of clinical outcome in severe male factor infertility with embryo selection based on array-CGH: a randomized controlled trial. *Fertil.Steril.* 2014:Vol. 102, Issue 3, e24-e25.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J and Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084-2092.
- Rubio C, Gimenez C, Fernandez E, Vendrell X, Velilla E, Parriego M, Rodrigo L and Spanish Interest Group in Preimplantation Genetics, Spanish Society for the study of the biology of reproduction. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum Reprod* 2009;24:2045-2047.
- Rubio C, Mercader A, Alama P, Lizan C, Rodrigo L, Labarta E, Melo M, Pellicer A and Remohi J. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod* 2010;25:2290-2297.
- Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendia P, Remohi J, Simon C and Pellicer A. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005;11:497-506.
- Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J and Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent

- miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003;18:182-188.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG and Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010;94:1700-1706.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M and Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* 2009;92:157-162.
- Schoolcraft WB, Surrey ES, Minjarez DA, Stevens JM and Gardner DK. Management of poor responders: can outcomes be improved with a novel gonadotropin-releasing hormone antagonist/letrozole protocol?. *Fertil Steril* 2008;89:151-156.
- Scott RT, Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X and Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:697-703.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C and Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011;96:344-348.
- Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z and Munne S. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003;79:30-38.
- Simpson JL. What next for preimplantation genetic screening? Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient. *Hum Reprod* 2008;23:2179-2181.
- Smith GD, Motta EE and Serafini P. Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *Reprod Biomed Online* 2011;23:298-306.
- Sole M, Santalo J, Boada M, Clua E, Rodriguez I, Martinez F, Coroleu B, Barri PN and Veiga A. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013;28:2087-2092.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I and Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004;19:2849-2858.
- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I and Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 2008;23:2818-2825.

BIBLIOGRAFÍA

- Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R and Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005;11:53-57.
- Stoop D, De Munck N, Jansen E, Platteau P, Van den Abbeel E, Verheyen G and Devroey P. Clinical validation of a closed vitrification system in an oocyte-donation programme. *Reprod Biomed Online* 2012;24:180-185.
- Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T and Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2012;27:2297-2303.
- Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J and Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 2011;26:1768-1774.
- Surrey ES and Schoolcraft WB. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2000;73:667-676.
- Trokoudes KM, Pavlides C and Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril* 2011;95:1996-2000.
- Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, Baroni E, Albricci L, Colamaria S, Capalbo A, Sapienza F, Vajta G and Rienzi L. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Hum Reprod* 2010;25:1199-1205.
- Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S, Baroni E, Sapienza F, Cobellis L and Greco E. Management of poor responders in IVF. *Reprod Biomed Online* 2005;10:235-246.
- Vajta G and Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779-796.
- Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, Joris H, Van Steirteghem A and Devroey P. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod* 1998;13:3169-3176.
- Verberg MF, Eijkemans MJ, Heijnen EM, Broekmans FJ, de Klerk C, Fauser BC and Macklon NS. Why do couples drop-out from IVF treatment? A prospective cohort study. *Hum Reprod* 2008;23:2050-2055.
- Viuff D, Hendriksen PJ, Vos PL, Dieleman SJ, Bibby BM, Greve T, Hyttel P and Thomsen PD. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. *Biol Reprod* 2001;65:204-208.
- Voullaire L, Slater H, Williamson R and Wilton L. Chromosome analysis of

- blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;106:210-217.
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T and Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1035-1041.
- Wang L, Cram DS, Shen J, Wang X, Zhang J, Song Z, Xu G, Li N, Fan J, Wang S *et al.* Validation of copy number variation sequencing for detecting chromosome imbalances in human preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2014;91:37.
- Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Mareello E, Hill D and Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003;80:467-468.
- Wilding M, Forman R, Hogewind G, Di Matteo L, Zullo F, Cappiello F and Dale B. Preimplantation genetic diagnosis for the treatment of failed in vitro fertilization-embryo transfer and habitual abortion. *Fertil Steril* 2004;81:1302-1307.
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005;11:33-41.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES and Salem RD. 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. *Mol Cytogenet* 2012;5:24-8166-5-24.
- Yin X, Tan K, Vajta G, Jiang H, Tan Y, Zhang C, Chen F, Chen S, Zhang C, Pan X *et al.* Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophoctoderm cells of human blastocysts. *Biol Reprod* 2013;88:69.
- Zeleznik AJ, Schuler HM and Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981;109:356-362.



Collage "Sweet, sweet, sweet, Candy DNA"
Guillem Milán Buendía, Blanca y Ángel Buendía Gaya, verano 2015

AGRADECIMIENTOS

Gracias. He tenido el honor y el placer de contar como directores de tesis con tres personas excepcionales, Mari Carmen, Ana y Ernesto, porque no sólo aportaron profesionalidad sinó porque además pusieron toda su experiencia y entusiasmo en marcha para que saliera adelante esta tesis y siempre me animaron, ayudaron y enseñaron con una sonrisa y gesto amable aun cuando parecía desfallecer. Gracias por dejarme cocinar esta tesis con amor.

Gracias en especial a Mari Carmen, por transmitir tu saber y buen hacer y darme la oportunidad de crecer profesionalmente y como persona. Gracias por hacer que ir a trabajar sea un placer. Gracias por compartir y dar tanto sin esperar nada a cambio. Dedicando horas a éste y cada uno de los proyectos, dándolo todo por y para todos. No existen palabras para agradecerte tanta, tanta, tanta luz y tanto amor.

Al Dr. Antonio Pellicer y al Dr. José Remohí, Toni y Pepe, gracias por vuestra visión científica, por ser motor. Ejemplo a seguir de constancia y esfuerzo, por mejorar y superarse.

A mis chicas del PGD, Arantxa, Laura, Diana, Amparo Mercader, más que una mentora, una persona excepcional de la que nunca dejo de aprender como profesional y como persona. Todas hemos compartido mucho más que horas, siempre dando lo mejor y con el buen hacer de las cosas.

A todos y cada uno de mis compañeros de FIV sin excepción alguna, todos y cada uno de vosotros habéis aportado una parte a este trabajo de tesis doctoral, y mucho más y bueno en mi día a día en el FIV. Un gran equipo de profesionales y, mejor, un gran equipo humano. Una gran familia. Alma fundamental del IVI. Muchas gracias.

Al Lab-FISH, aunque ya no estemos juntos físicamente siempre os sentiré y me sentiré como el mismo equipo. Formásteis y formáis una parte de mí.

A Amparo Ruíz, Carmina Vidal (Carmi, gracias por todo), Carlos Simón y a todos los gines. A Pepe, por tu profesionalidad pero más por hacernos reír hasta saltar las lágrimas. Pep y De Los, gracias.

A todas y cada una de las personas que componemos el IVI, a todas las que están y las que pasaron.

A Nico y Escrí, por mucho más de lo que creéis. A Dina.

A Carles e Isabel, todo empezó con vosotros investigando y soñando en el departamento. La Universitat, tan lejana ya, tan parte integrante de mí. Gracias por creer en mí.

A mis imprescindibles, a mis luces, Amparo, Joaquín, Mari Carmen (tú de nuevo), Vero, Amalia, Boni, Mar, Pilar Alberó. César, gracias por reaparecer.

Susi y Patri, os quiero.

A Wences por tu amistad y tu ayuda incondicional, por estar a mi lado, a pedazos, a ratos, a párpados, a sueños. Por compartir sonrisas y volar. Siempre.

A mi padre y a mi hermano, a mi familia, Cristina (Cris, mi cuñi, mi amiga, mi hermana), Ángel, Blanca, tía y Tania. Mamá, seguro que me guardas desde el cielo. Sin vuestro apoyo incondicional no hubiera llegado hasta aquí. A mi tío Manolo, desde tu mundo interior seguro que estarás orgulloso, siempre creíste en mí y me animaste a seguir contramarea para lograr mis aspiraciones. Gracias a mi familia por soportar mis ausencias en el lab, mis horas de estudio y nervios ante trabajos, proyectos y congresos.

A Guillen, mi hijo, lo mejor de mi vida, por hacerme sonreír y llorar de felicidad e impulsarme y motivarme a ser la mejor persona y la mejor mamá del mundo. Nunca pensé que se pudiera querer tanto, tanto, tanto. Gracias.

Lo que importa es cuánto amor ponemos en el
trabajo que realizamos

Madre Teresa de Calcuta



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA