



VALENCIA, OCTUBRE 2018

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
ESCUELA DE DOCTORADO

*CULTIVO DE PREEMBRIONES HUMANOS EN
PRESENCIA DE ALTA TENSIÓN DE OXÍGENO:
RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y PERINATALES*

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDINA Y BIOTECNOLOGÍA

MARIA RENDÓN ABAD

DIRECTORES:

DRA. MARÍA JOSÉ DE LOS SANTOS MOLINA

PROFESOR VICENTE SERRA SERRA

TUTOR:

JOSÉ ALEJANDRO REMOHÍ GIMÉNEZ

A mis hijos y marido

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis realizado en la Universidad de Valencia necesita de este apartado de forma fundamental ya que sin la implicación, trabajo, paciencia y dedicación de todos aquellos que de alguna manera me han ayudado y apoyado, no hubiera sido posible llevarlo a cabo.

En primer lugar, a mis directores de tesis, la Dra. Maria José de los Santos y el Profesor Vicente Serra, por su experiencia y profesionalidad, por su buen hacer en todo momento y su paciencia conmigo. En especial a María José por ser igual de cercana como de excelente profesional, por su implicación con mi trabajo y también conmigo como persona, ya que siempre ha estado disponible para mis dudas e inquietudes.

A Alfredo Navarro, por ayudarme con mis incertidumbres y los planteamientos estadísticos. Porque en alguna ocasión, he resultado ser un poco insistente y él siempre ha tenido en un momento u otro, un rato para dedicármelo.

No puedo dejar de mencionar a mis hijos y marido por la paciencia de aguantar muchos fines de semana sin poder hacer planes conmigo para que yo pudiera dedicarme a mi trabajo de tesis. También por entender mis malos momentos, cuando en algunas ocasiones lo veía todo de color gris. Y digo gris, porque nunca ha llegado a ser negro, ya que ellos siempre me han arrancado una sonrisa.

A mis padres y suegros, por apoyarme y valorarme en un camino que no siempre ha estado fácil. Recordándome el esfuerzo que se necesita para poder llegar a una meta.

A Anna, mi cuñada, por su tiempo para ayudarme con el diseño, formato y encuadernación de la tesis.

A mis amigas de universidad: Carol, María, Sol y Esther por siempre tener buenas palabras, palabras de apoyo y fuerza.

A mis compañeras de trabajo, Berta Pujal y Ana Arjona por escucharme cuando les explicaba los resultados de mi tesis y les enseñaba cómo iba tomando forma este manuscrito.

A todos vosotros, mil gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. La Reproducción Asistida (RA) en el mundo	8
1.2. Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).....	11
1.3. Sistemas de cultivo embrionario	15
1.3.1. Bases del cultivo embrionario.....	15
1.3.2. Estrategias de cultivo embrionario	19
1.3.3. Condiciones de cultivo y ambiente materno	20
1.3.3.1. Condiciones externas	21
1.4. Baja Tensión de Oxígeno	24
1.4.1. Condiciones de oxígeno en el ambiente materno.....	24
1.4.2. Cultivo embrionario en baja tensión de oxígeno <i>in vitro</i>	26
1.4.3. Impacto del cultivo embrionario en baja tensión de oxígeno en el metabolismo embrionario.....	28
1.5. Riesgos obstétricos y perinatales derivados la Reproducción Asistida (RA)	30
1.5.1. Riesgos obstétricos y perinatales derivados de la FIV y el ICSI.....	30
1.5.2. Riesgos obstétricos y perinatales del cultivo embrionario.....	33
2. OBJETIVOS	35
3. HIPÓTESIS	35
4. MATERIAL Y MÉTODOS	36
4.1. Diseño del estudio y participantes	36
4.2. Descripción de las variables	38
4.3. Antropometría en niños recién nacidos	39
4.3.1. Cálculo de los percentiles por edad gestacional de los recién nacidos.....	40
4.3.2. Estandarización de los percentiles mediante <i>Z-score</i>	43
4.4. Análisis estadístico.....	44
4.4.1. Análisis estadístico por objetivos del estudio.....	44
4.4.2. Predicción de éxito de las tasas obstétricas acumuladas mediante Poisson ..	45
4.5. Protocolos de estimulación ovárica de las donantes y preparación endometrial para las receptoras	45

4.6. Ética	47
5. RESULTADOS	48
5.1. Resumen estudio	48
5.2. Pruebas de homogeneidad de datos.....	49
5.3. Resultados de datos obstétricos	56
5.4. Predicción de éxito de las tasas obstétricas acumuladas mediante <i>Poisson</i>	60
5.5. Resultados datos neonatales/perinatales de los RNV.....	65
6. DISCUSIÓN.....	76
7. CONCLUSIONES	82
8. BIBLIOGRAFÍA	83
9. APÉNDICES.....	96
Predicción de éxito de las tasas obstétricas acumuladas mediante <i>Poisson</i>	96
Índice de Ilustraciones y tablas	99
Índice de Abreviaturas.....	101
Glosario.....	104
Hoja de información y Consentimiento informado entregado a los pacientes que participaron en el ECA	122

PRÓLOGO

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado (A. Szent-Györgyi)

La presente tesis doctoral pretende realizar una investigación de carácter clínico, tan importante hoy en día para el desarrollo del conocimiento y la potencial mejora de los diagnósticos y tratamientos que se pueden ofrecer al paciente.

Uno de los campos en medicina que está experimentando mayor demanda es el de la medicina reproductiva, tanto por razones médicas como por razones sociológicas. Por lo que esto provoca la necesidad de investigar sobre diferentes aspectos de esta disciplina. A menudo en medicina reproductiva, se ha primado la eficacia de los tratamientos (obtener una gestación que dé lugar a descendencia) en lugar de la seguridad, relegada a un segundo plano. Sin embargo actualmente, esto está cambiando y está aumentando la tendencia de investigar la seguridad de las técnicas y cómo podrían afectar a las descendencia obtenida a través de ellas, a través de estudios a medio y largo plazo.

Este trabajo se encuentra estructurado en 6 bloques, acompañados de un glosario, apéndice y bibliografía.

El primer bloque se trata de una introducción en la que figuran diferentes capítulos que engloban la explicación de las técnicas básicas de reproducción: Fecundación *in Vitro* (FIV) e Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), además de cómo se utilizan de forma diferencial en el mundo. También se incluyen varios apartados de disertación de los cultivos embrionarios, tanto a nivel de medios de cultivo (composición química) como a nivel de condiciones físicas. Todos estos factores externos, deben ser lo más parecidos a los que existen en el ambiente materno para poder reproducir *in vitro* lo que sucede *in vivo*. Finalmente, se aborda el impacto de estas técnicas sobre el preembrión generado y posteriormente sobre la descendencia que se obtiene.

El segundo y tercer bloque de trabajo son los objetivos que se pretende abordar con este estudio y la hipótesis de trabajo planteada.

El cuarto bloque hace referencia al diseño del estudio y toda la metodología empleada para llevar a cabo la investigación que dará lugar al quinto bloque, los resultados del trabajo de defensa de tesis doctoral. En el cuarto bloque también se incluye un apartado de ética, básico para los estudios experimentales que se realizan con pacientes.

Finalmente, se llega al punto final de la tesis, la discusión de los resultados obtenidos y cuáles son las conclusiones que se pueden generar del estudio. Dentro de este apartado se incluyen las limitaciones encontradas y su aplicabilidad al campo de la medicina reproductiva.

RESUMEN

El presente estudio investiga sobre los resultados obstétricos y perinatales en los ciclos de donación de ovocitos de pacientes que participaron en un ensayo aleatorizado (ECA), que analizó el efecto del uso de la concentración atmosférica vs baja concentración de oxígeno durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Posteriormente se añadieron nuevos datos (datos que no se encontraban en el ECA) para aumentar el tamaño muestral del estudio.

Se incluyeron 1230 ciclos de pacientes de los que 1125 corresponden al ECA. Como intervención del estudio se definió el cultivo de preembriones en una atmósfera de 6% CO₂ (Dióxido de Carbono), 6% O₂ (Oxígeno) y 88,5% N₂ (Nitrogeno) (cultivo de baja tensión de oxígeno o de 6% de oxígeno) versus un sistema de doble gas en aire (cultivo de tensión de oxígeno atmosférica).

Las medidas principales del estudio son los resultados obstétricos y perinatales de los recién nacidos que provienen tanto de embarazos únicos como de embarazos gemelares.

Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de variables gestacionales y perinatales. Para los principales resultados gestacionales, como la tasa de recién nacido vivo (RNV) por transferencia embrionaria (TE) y por ciclo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. Por TE la tasa de RNV es de un 35,4% en 6% de oxígeno y un 36,8% en 20% de oxígeno ($p=0,53$). Por ciclo, es de un 34,1% vs a un 35,3% ($p=0,56$), respectivamente. En el caso de las variables perinatales, el peso medio en las gestaciones únicas fue de un 3218 ± 559 g en 6% de oxígeno vs a un 3193 ± 668 g en tensión de oxígeno atmosférica ($p=0,67$). Para las gestaciones gemelares, el peso fue de 2310 ± 496 g en 6% de oxígeno y 2327 ± 587 g en 20% de oxígeno ($p=0,79$).

Como conclusiones, se puede decir que aparentemente en los casos de ciclos de donación de óvulos, el uso de la concentración atmosférica de oxígeno durante el cultivo de preembriones durante estadios tempranos de desarrollo, no afecta los resultados perinatales y obstétricos a corto plazo.

Palabras clave: donación de ovocitos, baja tensión de oxígeno, resultados perinatales, resultados obstétricos.

ABSTRACT

The current study investigates the obstetric and perinatal outcomes in the oocyte donation cycles of patients who participated in a Randomized Controlled Trial (RCT), it analyzed the effect of the use of atmospheric concentration vs. low oxygen concentration in the early stages of embryonic development.

Subsequently, new data were added to increase the sample size of the study. In this study 1230 patient cycles were included, of which 1125 are from the RCT. As a study intervention, the embryo culture was defined in an atmosphere of 6% CO₂, 6% O₂, 88.5% N₂ (low oxygen tension culture or 6% oxygen) versus a double gas in air system (atmospheric oxygen tension culture).

The main outcomes are the obstetric and perinatal outcomes of newborns that come from both single pregnancies and twin pregnancies.

The results show no statistically significant differences for most gestational and perinatal variables. For the main gestational results such as the Live Birth Rate (LBR) by embryo transfer (ET) and per cycle, no statistically significant differences are found. By ET, the LB (*Live Birth*) rate is 35,4% in 6% oxygen and 36,8% in 20% oxygen ($p = 0,53$). Per cycle is 34,1% vs 35,3% ($p = 0,56$) respectively. In the case of perinatal variables, the mean weight in single pregnancies was 3218 ± 559 g in 6% oxygen vs 3193 ± 668 g in atmospheric oxygen tension ($p = 0,67$). For twin gestations, the weight was 2310 ± 496 g in 6% oxygen and 2327 ± 587 g in 20% oxygen ($p = 0,79$).

In conclusion, it can be said that in cases of egg donation cycles, the use of atmospheric oxygen concentration during cleavage stage of embryo development, seems not to affect affect the perinatal obstetric and short-term outcomes.

Key words: egg donation, low oxygen tension, perinatal outcomes, obstetric outcomes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Reproducción Asistida (RA) en el mundo

En la actualidad la Reproducción Asistida (RA) y las técnicas asociadas (TRA), actualmente denominadas MAR del inglés (*Medically Assisted Reproduction*), se han convertido en el tratamiento por excelencia de la infertilidad en los últimos 30 años. La utilización global y su efectividad van aumentando sensiblemente, en unos países más que en otros a pesar de importantes diferencias entre ellos.

Según la zona del mundo donde nos encontremos existen diferencias remarcables en cuanto a estos asuntos, normalmente éstas son debidas a aspectos socio-sanitarios, legislativos o incluso del desarrollo socioeconómico del propio país.

Para poder valorar las TRA empleadas, su eficacia (a nivel de resultados positivos) y su seguridad (riesgos asociados) existe un Comité Internacional que se encarga de la monitorización de estas técnicas, *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies* (ICMART) (Dyer *et al.*, 2016).

El último informe publicado de este comité valora el uso de estas técnicas de aproximadamente dos tercios del planeta durante los años 2008, 2009 y 2010.

En dicho informe en el que también participa España, aportando los datos derivados del Registro Nacional Actividad-Registro SEF, se calcula que de aproximadamente 4.461.309 ciclos de RA iniciados han nacido 1.144.858 niños. Un alto número de casos, que deja ver la importancia de la monitorización de estas técnicas para observar como la aplicación de éstas van cambiando, su eficacia y su seguridad. Este número se encuentra subestimado, ya que no todos los países están incluidos, ni todas las clínicas participan en él.

El informe valora las técnicas como la Inseminación Artificial Intrauterina (IAI), la Fecundación *In Vitro* (FIV), la Inyección Intracitoplasmática de Espematozoides más conocida como ICSI por el acrónimo en inglés (*Intracytoplasmatic Sperm Injection*; ICSI), la transferencia embrionaria en fresco (TE) (*Embryo Transfer*; ET) y postcriopreservación (TEC), la Maduración *in Vitro* de ovocitos (MIV), el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), la Donación de Ovocitos, la Maternidad Subrogada y la Reducción Fetal.

El análisis de los resultados, se hace mediante el cálculo de tasas u otras medidas de éxito de las TRA. Como la tasa de gestación/parto (TG/TP) por aspiración ovocitaria, por transferencia de preembriones en fresco o tras su criopreservación. También, por número de preembriones transferidos por ciclo. Y otras tasas como la tasa de parto gemelar (TPG), tasa de parto múltiple (TPM), tasa de aborto (TA), tasa muerte perinatal (TMP), tasa de mujeres de más de 40 años que se someten a ciclos de RA con ovocitos propios, entre otras.

De los resultados de este informe, se concluye que existe un aumento de la utilización de las TRA (un 9,5% más). Pero que su utilización no se encuentra uniformemente distribuida entre países, por ejemplo, existe un rango de 8 ciclos por millón habitantes en República Dominicana (2010) a 4775 ciclos por millón de habitantes en Israel (2010).

Tal vez uno de los aspectos más novedosos es que el número de TEC han aumentado notablemente del 2008 al 2010 (casi un 30%). Esto es debido a varias circunstancias, entre ellas, la tendencia de utilizar la transferencia de un único preembrión (TUE) también conocida como SET del inglés (*Single Embryo Transfer*), que da lugar a la criopreservación de los preembriones sobrantes de los ciclos en fresco. También, se debe a la tendencia a diferir las transferencias de preembriones al siguiente ciclo, y a la mejora de las técnicas de criopreservación que arrojan mayores tasas de supervivencia.

Además, se ha observado que existe una menor TPM y de mortalidad perinatal en los TEC respecto a los TE en fresco. Entre las causas propuestas que podrían explicar los resultados, se encuentra que las parejas que tienen TEC normalmente son parejas dónde ha habido preembriones sobrantes de ciclos anteriores donde se ha logrado un embarazo previo (tienen una mejor respuesta frente a las TRA).

El número de ciclos dónde se utiliza la técnica ICSI se mantiene constante, sin embargo, existen muchas diferencias por país o región, casi un 100% de los ciclos de TRA en Oriente Medio son derivados a ICSI mientras que en Asia solamente es del 55%. Aunque, en principio el ICSI es una técnica pensada sobre todo para el tratamiento de la infertilidad debida al factor masculino (un 40% de las parejas que acuden a las TRA), algunos estudios han reportado que el ICSI mejora las tasas de éxito en parejas que no presentan factor masculino (Van Rumste, Evers, & Farquhar, 2004). En cualquier caso, esta masiva utilización del ICSI se está haciendo más universal y recibe algunas críticas de organismos y sociedades científicas.

En cuanto a la efectividad de los ciclos de TRA podemos decir que existe tendencia hacia la mejora. Las tasas de gestación y parto por ciclo autólogo (con ovocitos propios) de 25,7% en 2008 a 27,1% en 2010, aunque existen diferencias muy marcadas entre regiones (de un 17,8% en Asia en 2008 a un 44,5% en Norte-América en 2010).

El aborto temprano ha disminuido ligeramente (2%) aunque la proporción de mujeres de 40 años o más ha aumentado de forma global (un 8%), es importante comentar que en este grupo la TP disminuye al 11%.

La tasa de transferencia embrionaria de un único preembrión (TUE) es la tendencia a seguir ya que ha aumentado notablemente. Aunque, existen diferencias muy significativas entre países, mientras que Australia/Nueva Zelanda tenía un 64,4% en 2010, la tasa mundial se sitúa en el 30%. Por la misma razón, la transferencia de 3 preembriones ha caído a un 16,7% y de 4 preembriones a un 4,0% (2010), una vez más existen muchas diferencias entre países.

Al disminuir el número de preembriones que se transfieren, es lógico que la TPM haya disminuido también, con las consiguientes diferencias entre países (la tasa parto gemelar varia del 8,2% en Australia/Nueva Zelanda en 2010 al 30,0% de los países del este en el mismo año).

Estos hechos se encuentran estrechamente relacionados con la disminución de la TP pretérmino o prematuro (alrededor del 20% en 2010). El riesgo de embarazo múltiple comporta complicaciones tanto para la madre como para los RNV. Existe una alta correlación entre las complicaciones perinatales y el número de preembriones transferidos.

Esta situación, provoca que se plantee el número de preembriones a transferir en cada caso individualmente, y no como una rutina en los centros donde se practican las TRA. Ya que, cuando se comparan las tasas de éxito de los ciclos de TRA (TG y TP), sí que existen diferencias entre cuando se transfieren uno o dos preembriones (un 9% más cuando se transfieren dos en lugar de uno en ciclos con transferencia en fresco, y no existe diferencia cuando la transferencia es postcongelación), pero esto se ve compensado por el riesgo que esto conlleva. Por estas razones, la TPM ha disminuido globalmente aunque solo existen cuatro países con una MBR menor a 10% (Australia, Nueva Zelanda, Japón y Suecia). Por lo tanto, la utilización de la transferencia embrionaria doble TED, solo se tendría que reservar a las pacientes de peor pronóstico.

El número de preembriones transferidos también se ve influido por el coste económico que tienen las TRA, muchas veces los pacientes son los mismos que piden la transferencia de más de un preembrión para aumentar la tasa de embarazo, ya que cada ciclo de TRA tiene un elevado coste (Hamilton & McManus, 2012; Chambers *et al.*, 2014). Sin embargo, el embarazo múltiple no solo implica riesgos para las madres y los RNV, sino que también provoca un gasto en sanidad elevado por las complicaciones (en el embarazo y parto) que conlleva. Por esta razón, los sistemas sanitarios de los países podrían plantearse gastar los recursos de una manera más eficiente ayudando a los pacientes que demandan las TRA y no en las complicaciones que pueden conllevar debido a los embarazos múltiples (ESHRE Capri Workshop, 2013) (Baird *et al.*, 2013).

En cuanto a la donación de ovocitos (analizado en 41 países) ha aumentado considerablemente el uso de esta técnica (un 35,8% del 2008 al 2010). Este aumento se debe en gran medida a España. España es el país con más donaciones de ovocitos en Europa, un 48,7% de todas las donaciones en Europa se llevan a cabo en España (la DR se sitúa alrededor del 20% en 2010). La donación no es legal en Japón, muchos países de Oriente Medio y algunos países europeos como Austria, Alemania o Suiza.

Para el DGP (analizado 30 países), podemos concluir que ha aumentado su utilización (un 30% del 2008 al 2010). Su tasa de éxito es parecida a la de los ciclos sin DGP. El aumento del DGP es debido a la mejora de las técnicas de diagnóstico avanzado, que hace un análisis exhaustivo de los 24 cromosomas. Además, cada vez se someten a las TRA mujeres de edad más avanzada que presentan un mayor número de aberraciones cromosómicas o de abortos recurrentes (debido a estas mismas aberraciones normalmente).

La maduración de ovocitos *in vitro* aumento en 14 países del 2008 al 2010. La maternidad subrogada fue practicada en 5 países en 2008, seis en 2009 y siete en 2010. La reducción fetal fue reportada en 22, 31 y 25 países en 2008, 2009 y 2010 respectivamente.

La Inseminación Artificial Intrauterina, con semen del marido aumentó (un 23,1% del 2008 al 2010). Las tasas de éxito se mantuvieron constantes y la tasa TPM disminuyó ligeramente. Cuando se ha utilizado semen de donante no se han visto diferencias entre los diferentes años del estudio.

El trabajo que realiza el ICMART es básico, ya que es necesaria la monitorización de todos estos datos obtenidos de la práctica de las TRA para poder evaluar parámetros fundamentales derivados de una buena práctica de las TRA (datos de efectividad y seguridad). Por esta razón el ICMART, junto con la

Universidad sueca de Uppsala han desarrollado un sistema de recogida de datos más eficiente. El número de niños nacidos de TRA ha aumentado en torno al 9% por año durante estos tres años, esto es debido a un mayor número de pacientes que se someten a estas técnicas junto con países donde se ha empezado a realizar este tipo de técnicas.

Es importante remarcar, que la participación no es completa (no se incluyen todos los países y ni clínicas donde se llevan a cabo las TRA). Por ejemplo la participación en Europa y Norte-América fue de más del 80% y de más del 75% respectivamente, pero en los Países de Oriente Medio fue muy baja del 22,2 en 2008 y del 7,5% en 2010.

En cuanto al acceso que tiene la población a estos tratamientos existe un rango muy amplio entre los países. El país que más ciclos tiene por millón de habitante es Israel (4000) y en África sub-sahariana es donde menos se acceso hay (80 ciclos por millón de habitantes). Esto es debido a dos factores: el socio-cultural y el económico (del país y del propio paciente). Los países donde existe financiación y ayudas para estos tratamientos tienen una mayor demanda de éstos, un ejemplo de ello serían Israel, Australia o los países nórdicos (tienen acceso a través del sistema sanitario público o de un privado pero con un alto reembolso para los pacientes).

1.2. Técnicas de Reproducción Asistida (TRA)

La demanda por parte de la sociedad actual de las diferentes TRA es debido a diversas razones, tanto médicas entre las que figuran enfermedades con varias etiologías (subfertilidad, enfermedades genéticas, preservación de la fertilidad postcáncer etc.), o por otras de tipo sociológico. Entre éstas últimas se encuentran principalmente, la postergación de la maternidad o debido a los diferentes tipos de estructuras familiares que se dan actualmente, como familias monoparentales o homoparentales. Hechos que provocan, que sea más necesario la investigación sobre diferentes aspectos de estas técnicas y las consecuencias que éstas pueden tener sobre la salud de la descendencia obtenida a través de ellas.

Este trabajo se referirá principalmente a las técnicas que implican el crecimiento del preembrión humano (al que nos referiremos partir de ahora como preembrión) en condiciones *in vitro* antes de ser transferido al útero materno.

Fecundación *In Vitro* (FIV) y la Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (*Intracytoplasmatic Sperm Injection*, ICSI)

La FIV en general nació para solventar problemas de obstrucción tubárica y rápidamente se fue extendiendo para dar solución a otros problemas, como por ejemplo aquellos asociados a la producción de células gaméticas. Estas técnicas incluyen, desde la administración de fármacos para inducir la ovulación, pasando por la Inseminación artificial hasta las diferentes técnicas de FIV que requieren, como su propio nombre indica, la inseminación del gameto femenino fuera del ambiente materno y la obtención de preembriones que serán transferidos de nuevo a la madre.

Brevemente, la técnica de FIV consiste en la fecundación de los ovocitos por parte de los espermatozoides en el laboratorio, este proceso implica normalmente la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) mediante hormonas para que se desarrollen varios folículos (que contienen los ovocitos), ya que así se incrementan las opciones de éxito de lograr una gestación. Aunque en algunos casos, las pacientes optan por ciclos naturales en los que no hay administración exógena de hormonas.

En cada paciente se lleva a cabo un protocolo personalizado de HOC y supresión de la ovulación de forma espontánea. Este protocolo está basado en los predictores de respuesta ovárica. La predicción de respuesta se lleva a cabo mediante el recuento de folículos antrales, determinados por ecografía transvaginal, que da una aproximación de los folículos primordiales (reserva ovárica). Es también habitual medir la concentración de dos hormonas: la hormona Anti-Mulleriana (AMH, *Anti-Mullerian Hormone*) y la hormona estimuladora de los folículos (FSH, *Follicle Stimulating Hormone*) (He, Zhao, & Powell, 2010). Tanto los niveles de AMH como los FSH bajos están asociados a una baja respuesta. Una vez estimada la posible respuesta de la paciente a la HOC, se pauta la medicación para llevarla a cabo. Por un lado, se suprime la ovulación espontánea mediante agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH, *Gonadotropin-releasing hormone*). Y posteriormente se pauta la administración de preparados de gonadotropinas basados principalmente en la FSH (Farquhar, Rishworth, Brown, Nelen, & Marjoribanks, 2015) para estimular el crecimiento de los folículos.

Es importante llevar a cabo monitoreo ecográfico de los folículos, conjuntamente con la determinación sérica de estradiol, de esta manera se puede controlar tanto el crecimiento de los folículos como prevenir el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO) (OHSS, *Ovarian Hyperstimulation Syndrome*) (Kwan, Bhattacharya, Kang, & Woolner, 2014). Finalmente, en el protocolo de HOC, se lleva a cabo la maduración final de los ovocitos, utilizando gonadotropina coriónica humana (hCG, *human Chorionic Gonadotropin*) o un agonista de GnRH si se usa un protocolo de antagonista de GnRH para la supresión de la ovulación. A continuación, se realiza una recuperación transvaginal de ovocitos justo antes de la ruptura de los folículos (mediante la llamada punción folicular).

Para la FIV, se recuperan del líquido folicular procedente de folículos preovulatorios, los ovocitos maduros, los que se encuentran en Metafase II (MII). Estructuralmente, el ovocito maduro mide entre 110-115 μm y está rodeado de una membrana llamada oolema. Esta membrana contiene el citoplasma del ovocito u ooplasma, donde se encuentran las organelas citoplasmáticas y el núcleo. Rodeando al conjunto ovocito-oolema está la llamada zona pelúcida, que es de naturaleza glicoproteica y tiene un grosor de 15-20 μm que disminuye tras de la fecundación. El conjunto ovocito-zona pelúcida mide aproximadamente 150 μm . Entre el oolema y la zona pelúcida está el espacio perivitelino, en el que se encuentra el corpúsculo polar.

La presencia de un corpúsculo polar (CP) indica que la maduración nuclear ha finalizado. Se cree que hace falta un breve intervalo de tiempo tras la extrusión del primer CP, para que el citoplasma madure completamente. Un ovocito puede ser meióticamente maduro pero no haber alcanzado la madurez citoplasmática, lo que puede llevar a fallos o defectos en la fecundación.

Los ovocitos recuperados tras la punción folicular están rodeados de células de la granulosa que forman el *cumulus ooforus*. Estas células son imprescindibles para la reanudación de la meiosis. La capa más interna constituye la corona radiata.

Tradicionalmente, la valoración de la maduración del ovocito se ha basado en el grado de expansión del cúmulo y la corona que lo rodea (Veeck, 1988):

- Metafase II (MII): células del cúmulo expandidas y luteinizadas.
- Metafase I (MI): células del cúmulo menos expandidas.
- Profase I: células del cúmulo compactadas.

La aparición de la microinyección espermática de espermatozoides (ICSI), y la necesaria denudación de los ovocitos para su realización, ha permitido valorar con más exactitud su estadio madurativo así como su morfología (Sathananthan, Trounson, & Wood, 1986).

Históricamente la evaluación de la madurez de los ovocitos se basaba en la expansión y el aspecto del complejo *cumulus*-corona que rodea al ovocito. Esta valoración, aunque se acerca bastante a la maduración real del ovocito, no es del todo fiable debido a la disparidad que puede existir en el proceso de maduración del ovocito y del *cumulus*, en pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada (Laufer *et al.*, 1984; Scott & Smith, 1998).

Con la introducción de la ICSI, esta situación cambió completamente, ya que, al tener que denudar el ovocito antes de su microinyección, se podía visualizar mejor la morfología del mismo.

Los ovocitos recuperados de pacientes sometidas a estimulación ovárica muestran diferentes estados de maduración meiótica. Sólo los MII son válidos para la ICSI, mientras que los MI pueden ser cultivados durante unas horas para ver si se produce la liberación del corpúsculo polar, en cuyo caso podrán ser microinyectados (De Vos *et al.*, 2003). Los ovocitos en profase I, que muestran vesícula germinal (VG), no pueden ser utilizados debido a que tienen carga cromosómica diploide.

Al mismo tiempo, el ovocito debe haber crecido completamente y haber completado la maduración nuclear y citoplasmática de una manera coordinada, para que pueda existir una correcta fecundación. Alteraciones o asincronías en este proceso pueden derivar en diferentes anomalías morfológicas, dependiendo de sí se ha afectado la maduración nuclear (Ebner *et al.*, 2001), o la maduración citoplasmática (Xia, 1997; Hassan-Ali *et al.*, 1998).

Algunas alteraciones pueden ser causadas por un descenso del aporte sanguíneo al folículo durante la estimulación, lo que implica una deficiencia de oxígeno. Se ha demostrado una asociación entre una disminución del aporte sanguíneo al folículo y defectos en el huso mitótico y en los cromosomas. La hipoxia también afecta a la concentración de ATP (Adenosin Trifosfato) intracitoplasmático y la organización del citoplasma.

Se acepta que los ovocitos metafase II de buena morfología deben de tener un citoplasma nítido y moderadamente granuloso, un espacio perivitelino pequeño, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida (ZP) clara (Xia, 1997; Ebner *et al.*, 2001), aunque la mitad de los ovocitos que se recuperan son morfológicamente anormales, y presentan tanto anomalías citoplasmáticas como extracitoplasmáticas (Ebner *et al.*, 2002).

Una vez que tenemos los ovocitos clasificados los colocaremos en un medio adecuado para su desarrollo. El medio o medios adecuados, serían aquellos capaces de responder a las necesidades metabólicas del preembrión en cada momento evolutivo.

Por otro lado, se prepara el semen para utilizarlo para la fecundación, se realiza un lavado para eliminar el plasma seminal y células tales como células de espermatogénesis, epiteliales o leucocitos (las más frecuentes). La preparación para llevar a cabo la FIV tradicional es distinta que para llevar a cabo un ICSI. En el caso de FIV se pondrán en una gota de cultivo miles de espermatozoides en contacto con los ovocitos (con las células de la granulosa intactas) y en el ICSI solamente se necesita microinyectar un espermatozoide por ovocito (previamente desnudados) por lo que la concentración de espermatozoides de la muestra es sensiblemente inferior.

El primer nacimiento en humanos mediante ICSI data del 1992 (Palermo, Joris, Devroey, & Van Steirteghem, 1992), el procedimiento ganó popularidad en muchos países europeos y desde allí se ha ampliado globalmente. Principalmente este proceso surgió por la necesidad de mejorar las tasas de éxito en los casos de oligozoospermias y teratozoospermias muy severas (baja concentración y motilidad de los espermatozoides), pero además se ha demostrado que el ICSI es de gran valor en otros procedimientos como por ejemplo para el uso de espermatozoides testiculares y del epidídimo (Schoysman *et al.*, 1993; Tournaye *et al.*, 1994). También para su utilización en el caso de criopreservación de gametos, tanto con los espermatozoides (Devroey *et al.*, 1995; Podsiadly, Woolcott, Stanger, & Stevenson, 1996) como con los ovocitos criopreservados, ya que los éstos últimos presentan un endurecimiento de la zona pelúcida una vez descongelados (Porcu *et al.*, 1997). Otra aplicación es la de utilizar el ICSI en el caso de realizar DGP a los preembriones que se generarán postfecundación para evitar la contaminación con el material genético de otras células (células del cúmulo) (Sermon *et al.*, 1999). También, se usa cuando los ovocitos se han madurado en cultivo, es decir el paso de los ovocitos de MI (Metafase I) a MII (Metafase II) (Cha *et al.*, 2000). Todos estos avances en medicina reproductiva han propulsado a la técnica de ICSI y actualmente es la que más se utiliza en un alto porcentaje.

Por lo tanto, dependiendo de la calidad y cantidad de los espermatozoides se escogerá entre la FIV y el ICSI. Para la FIV se utilizan entre 50000 y 100000 espermatozoides motiles que se disponen en la placa de Petri junto al ovocito a fecundar. La fecundación se evalúa a las 20-24 horas, se observan los dos pronúcleos en el citoplasma (uno femenino y otro masculino) y los dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino del cigoto. A partir de las 24 horas postfecundación se produce la singamia de los pronúcleos (combinación de las cromátidas) y le sigue la primera división celular del preembrión hacia estadio de dos células. La técnica de ICSI (se atribuye a Van Steirteghem y colegas en Bélgica) (Van Steirteghem, Liu, *et al.*, 1993; Van Steirteghem, Nagy, *et al.*, 1993; Van Steirteghem *et al.*, 1994), fue una revolución, ya que se puede conseguir un embarazo con un solo espermatozoide. Esto es de vital importancia en casos donde existe poca cantidad de estos gametos, como en hombres con el Síndrome de células de Sertoli, también se han utilizado otras células precursoras de espermatozoides como las comentadas anteriormente, pero se ha observado que las tasas de éxito de fecundación son más bajas en estos casos.

Desde la introducción del ICSI, se ha investigado mucho sobre los efectos negativos que puede suponer “saltarse” los mecanismos naturales mediante los que el espermatozoide entra dentro del ovocito, además de la incorporación artificial de estructuras del espermatozoide como el acrosoma, que no entrarían en una fecundación convencional.

Tanto la FIV convencional como la ICSI implican fecundar al ovocito fuera del ambiente materno y por lo tanto la generación de preembriones *in vitro*, situación que al mismo tiempo ha generado la necesidad de crear condiciones de cultivo que traten de conservar, en la medida de lo posible la viabilidad de los preembriones creados, especialmente cuando se requieren sistemas de cultivo prolongado que permitan la consecución de estadio de blastocisto.

1.3. Sistemas de cultivo embrionario

1.3.1. Bases del cultivo embrionario

El medio de cultivo que se utiliza en las TRA se cree puede afectar de manera determinante en el resultado y tasas de éxito de éstos (Quinn, Kerin, & Warnes, 1985; Mantikou, Youssef, *et al.*, 2013). Actualmente, existen mejores resultados en cuanto a tasas de implantación y embarazo en los tratamientos de FIV que en la concepción espontánea, en parte se atribuye a la mejora de los medios de cultivo (Vajta, Rienzi, Cobo, & Yovich, 2010).

Hasta los años 80, la mayoría de los laboratorios elaboraban sus propios medios de cultivo, esta costumbre se ha ido erradicando a medida que se han ido transponiendo las regulaciones europeas en el ámbito de los requisitos técnicos necesarios para la elaboración de los medios de cultivo en el campo de la Reproducción Asistida. Esta transición, ha dado lugar a un escenario muy particular en el que existe una gran variedad de medios de cultivo de diferentes de diferentes casas comerciales donde existe poca transparencia sobre sus componentes y su concentración lo que genera un punto de preocupación en las diferentes sociedades científicas (Biggers, 2000; Sunde *et al.*, 2016).

La investigación sobre qué tipo de medio de cultivo puede ser mejor para el cultivo de los preembriones humanos, es bastante complicada y no existe una regulación clara al respecto. Por un lado, se plantea un dilema ético-práctico ya que resulta complicado la evaluación de la seguridad de los medios en la especie humana a corto y medio plazo y sobre todo donde establecer el punto de corte que determine los valores de seguridad. Dada la escasez de temas regulatorios en muchos casos las pruebas se realizan en especies inferiores siendo en su mayoría realizadas en ratón (Quinn & Horstman, 1998) y son ausentes o limitados los estudio a largo plazo cuando se traslada su aplicación al ámbito humano. De hecho, la historia de los medios de cultivo y en general del cultivo de embriones de especies diferentes a la humana originando diferentes puntos de controversia que necesitan ser discutidos (Chronopoulou & Harper, 2015).

Como se ha apuntado anteriormente, la aproximación de los medios de cultivo en humanos se ha desarrollado a través de los resultados obtenidos en animales. Desde que en 1929 Lewis y Gregory estudiaran el desarrollo de embriones de conejo en plasma, pasando por la experimentación de Brinster con miles de embriones de ratón que llevaron a la optimización de los parámetros básicos como pH,

osmolaridad, substratos de energía, tipos de aminoácidos (AAs) y albúmina, dónde además también se demostró cambio de los perfil metabólico según etapas del desarrollo (de piruvato en estadio de 2 células a glucosa en estadio de 8 células) (Brinster, 1963, 1965a, 1965b, 1965c).

Las hipótesis de trabajo para el desarrollo del “medio ideal” fueron dos: una de ellas se basaba en la formulación del medio según la fisiología *in vivo* mientras que la segunda apuntaba a la simplicidad en la formulación del medio (Lawitts & Biggers, 1991; Quinn, 1995a, 1995b; Leese, 1998). La primera estrategia comportó el estudio de la composición de los fluidos reproductivos, en 1980 el análisis de los fluidos tubáricos de humanos (Borland, Biggers, Lechene, & Taymor, 1980) propició la producción de fluido tubárico sintético (Mortimer, 1986). Sin embargo, el estudio de la composición de estos fluidos es laborioso e incompleto además que puede estar influenciado por otros muchos parámetros (Leese, 2002; Summers & Biggers, 2003). Un ejemplo de esta aproximación es el medio HTF (*Human Tubal Fluid*) que es ligeramente parecido a fluido tubárico humano (Summers & Biggers, 2003). La segunda estrategia está basada en la simplicidad utilizando software sofisticado para evaluar componentes y su interacción. Esta aproximación se utilizó en preembriones de ratón y se creó el medio SOM (*Simplex Optimization Medium*) posteriormente suplementado con potasio (*Simplex Optimization Medium with Potassium*, KSOM) (Lawitts & Biggers, 1991, 1993). Esta composición del medio se trasladó a humanos sin conseguir grandes mejora en lo que se refiere a resultados (Summers & Biggers, 2003).

Los primeros científicos en cultivar ovocitos humanos fueron Rock y Merkin en 1944, éstos fueron obtenidos de tejido ovárico después de una laparotomía (cuando el ciclo menstrual estaba cercano a la ovulación) y se cultivaron en suero humano (Rock & Menkin, 1944). Posteriormente, se cultivaron y fecundaron ovocitos en un medio que contenía solución Tyrodes, BSA (*Bovine Serum Albumin*), penicilina, piruvato sódico, fenol y bicarbonato sódico (Steptoe & Edwards, 1970). Los mismos investigadores, cultivaron preembriones hasta la etapa de blastocisto usando el medio *Ham's F10* con suero humano o fetal (Steptoe, Edwards, & Purdy, 1971). En 1978 nació la primera niña fruto de una FIV (se necesitaron más de 100 intentos), este preembrión fue cultivado en solución salina *Earle's* con piruvato y suero de la misma paciente. Ménéz *et al.*, en 1984 cuestionaron el hecho de añadir todo el suero al medio de cultivo, se creó el medio B3, que contenía albúmina, algunos AAs, el medio B3 era una modificación del medio B2 que se utilizaba para preembriones bovinos basado en la composición de los fluidos reproductivos y suero (Ménéz, 1976). Fueron los grupos de Ménéz y Quinn los que empezaron a comercializar medios de cultivo para la FIV humana (Ménéz, Testart, & Perrone, 1984; Quinn *et al.*, 1985), pero como ya se ha comentado, la formulación del medio de cultivo en humanos se tiene que basar en este tipo de experimentación animal, ya que la gran mayoría de los experimentos planteados no pueden plantearse con preembriones humanos.

Básicamente y a modo de resumen se presenta una breve introducción de los requisitos y propiedades de cada uno de los componentes que pueden llevar los medios de cultivo embrionario. Los componentes que podemos encontrar en las formulaciones de los medios de cultivo son (*Handbook of In vitro Fertilization*):

- a) Agua: Es el principal componente. A la hora de la confección de los medios de cultivo, lo más importante es la fuente y la pureza del agua que se utiliza. El tipo de agua que ofrece más garantías es el agua que purificada mediante sistema de ultrafiltración que genera un agua libre de pirógenos (nivel de endotoxina menor de 0.125 IU/ml).
- b) Iones: Su presencia es importante puesto que la concentración externa de los iones tiene un efecto profundo en los niveles intracelulares y por lo tanto en la regulación de los diferentes procesos celulares. Aun así, el efecto individual de cada ion en la viabilidad y desarrollo embrionario es muy difícil de evaluar por las interacciones que existen entre los iones y otros componentes del medio, por ejemplo: carbohidratos y aminoácidos. Más allá de sus acciones específicas, una de las funciones principales es la de su contribución al mantenimiento de la osmolaridad de los medios de cultivo.
- c) Carbohidratos: Es una de las principales fuentes de energía. Su presencia está asegurada en los medios de cultivo. Además, están presentes en ambientes fisiológicos. Y sus concentraciones varían tanto entre el oviducto y el útero y durante el ciclo menstrual. La mayoría de los medios de cultivo contienen, glucosa, lactato y piruvato. En lo que se refiere a su presencia y concentración en los medios de cultivo embrionario, ésta ha sido en gran parte decidida por los datos extrapolados de cultivo de preembriones de ratón así como a las concentraciones observadas en el entorno fisiológico de los ovocitos y preembriones (Conaghan, Hardy, Handyside, Winston, & Leese, 1993; Barak *et al.*, 1998; De Silva, 1998; Quinn, 1998; Steeves & Gardner, 1999; Bavister, 1999; Coates, Rutherford, Hunter, & Leese, 1999; Lane & Gardner, 2000a)
- d) Aminoácidos: Este tipo de moléculas están también presentes en el ambiente fisiológico de gametos y preembriones. Los ovocitos y preembriones disponen de sistema de transporte de aminoácidos en sus membranas. Son además sustratos metabólicos, precursores anabólicos para síntesis de proteínas, hormonas y reguladores de funciones metabólicas (Gardner & Lane, 1998; Lane & Gardner, 2003). Son también utilizados por el preembrión para controlar su pH intracelular (Gly, Tau y Gln) (Gardner & Lane, 1996; Lane & Gardner, 1998). Se cree que los aminoácidos no esenciales tienen función en división embrionaria, formación de blastocisto, la eclosión e implantación. Los AA esenciales resultan inhibitorios en las primeras divisiones del preembrión, pero participan en el desarrollo de la masa celular interna (MCI) y favorecen desarrollo fetal. Por ejemplo, tanto los ovocitos como los preembriones tienen sistemas de transporte específicos para aminoácidos que ayudan a mantener el pH intracelular tan importante para la viabilidad celular.
- e) Vitaminas: Importantes para el metabolismo de los carbohidratos y aminoácidos en la síntesis de fosfolípidos de membrana y algunas de ellas como la Vitamina C y E, tienen papel antioxidante (Ross & Gardner, 1994; Lane & Gardner, 1998; Devreker & Englert, 2000).

- f) Quelantes: Mayoritariamente se utiliza el EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*), pero también la transferrina y su presencia favorecen la división en los primeros estadios, pero es perjudicial tras la compactación. Su función principal reside en unir los iones para que permanezcan en solución pero disminuir su actividad (Quinn & Margalit, 1996; Gardner, M V Lane, & M Lane, 2000).
- g) Ácidos nucleicos: Su presencia no es habitual en muchos medios de cultivo y no está claro que intervengan en la formación de blastocistos y ni en la expansión, aunque los preembriones de ratón y conejo, pueden incorporar nucleósidos marcados a su ARN (Ácido Ribonucleico) y ADN (Ácido Desoxirribonucleico) (Jo, 1975; Chan, Seraj, Kalugdan, & King, 1995). En estadios preimplantarios no son necesarios ya que la ruta de biosíntesis de dichos precursores es una ruta *de novo*.
- h) Proteínas: Una de las razones de la presencia de proteínas en los medios de cultivo en un principio es meramente técnica ya que evita que los gametos y preembriones se peguen a las placas y las pipetas durante su manipulación (suero y albúmina). Ayuda a minimizar las fluctuaciones de pH fuera del incubador (sobre todo el suero). Capta iones (zinc⁺, Cu²⁺) y pequeñas moléculas, y es un reservorio de diferentes moléculas como esteroides, vitaminas, ácidos grasos. Podría ser utilizado por los preembriones para procesos anabólicos o metabólicos (Gardner, 1998; Jones, Trounson, Lolatgis, & Wood, 1998). También se cree que su presencia en los medios de cultivo puede favorecer la supervivencia tras la criopreservación.
- i) Hormonas y factores de crecimiento (FC): Existen multitud de evidencias de la existencia de factores de crecimiento en el tracto reproductivo y en el preembrión preimplantatorio y pueden ser reguladores potenciales del desarrollo embrionario (Bongso *et al.*, 1989; Gardner & Leese, 1990; Bongso, Fong, Ng, & Ratnam, 1992; Rieger *et al.*, 1995; De los Santos *et al.*, 1996). Aunque entre sus hipotéticos beneficios están la disminución de apoptosis, el incremento de la proliferación celular, y en consecuencia la mejora de la evolución hasta blastocisto. No está clara la necesidad de su presencia y utilidad en los medios de cultivo por los efectos desconocidos que su presencia a largo plazo pueda tener sobre los preembriones, además de encarecer los medios de cultivo. No obstante, se pueden encontrar en el mercado, medios de cultivo con presencia de diferentes factores de crecimiento y hormonas.
- j) Antibióticos: Aunque fueron añadidos de forma rutinaria a los medios de cultivo como la penicilina-G y la estreptomycinina, pero es la gentamicina el antibiótico utilizado por excelencia en los medios de cultivo como medida profiláctica, para evitar la contaminación producida por el semen o por las bacterias del tracto reproductor femenino. Su ausencia, no obstante, es beneficiosa para el desarrollo de los preembriones ya que éstos van más deprisa en ausencia de antibióticos.

1.3.2. Estrategias de cultivo embrionario

Aunque desde el punto de vista legal el cultivo embrionario humano puede mantenerse hasta 14 días, en el marco de la RA los preembriones humanos pueden cultivarse durante 6-7 días permitiendo que estos alcancen el estadio denominado blastocisto.

Para ello, se han desarrollado diferentes estrategias que describiremos brevemente. Una de las utilizadas, pero cada vez más en desuso son los cocultivos de células somáticas y preembriones. Se dedicará unos breves apuntes a este tipo de cultivo por las implicaciones que este sistema tiene a la hora de emular el ambiente materno.

En una primera aproximación Biggers en 1962 cultivo preembriones de ratón con células las Trompas de Falopio. El cocultivo en humanos se estableció en 1989 con la utilización de fibroblastos del útero de bovino o con células tubáricas humanas lo que mejoraba la morfología e implantación del preembrión y las tasas de embarazo (Biggers, Gwatkin & Brinster, 1962; Bongso *et al.*, 1989; Wiemer *et al.*, 1989). Existen muchos estudios sobre diferentes líneas celulares que se han utilizado para “alimentar” al preembrión (*Feeder cell lines*) (Simón *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2000; Mercader *et al.*, 2003; Mercader, Valbuena, & Simón, 2006). También, se utilizaron como aproximaciones para mejorar ciclos con mujeres con preembriones de baja calidad (que ya habían tenido ciclos de FIV fallidos) (Desai, Abdelhafez, Bedaiwy, & Goldfarb, 2008). Existen estudios aleatorizados que han comprobado el efecto favorable de éstos (Morgan *et al.*, 1995; Parikh, Nadkarni, Naik, Naik, & Uttamchandani, 2006; Ng, Mingels, Morgan, Macklon, & Cheong, 2018) sin embargo existen otros que no (Tucker *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha observado que los efectos beneficiosos del cocultivo no son ni específicos de tejido ni de especie (pero actualmente no se permite realizar cocultivos con células animales). Entre los efectos positivos del cocultivo destacar la producción de factores de crecimiento, regulación de pH y la eliminación de productos perjudiciales (Bongso *et al.*, 1991; Bavister, 1992). Existe un metaanálisis en el que se ha concluido que los cocultivos mejoran la tasa de implantación, la tasa de gestación clínica y la tasa de gestación evolutiva (Kattal, Cohen, & Barmat, 2008).

Otra de estas aproximaciones serían los cultivos secuenciales, dónde los medios de cultivo son diferentes según las necesidades del preembrión en cada punto de desarrollo (De los Santos *et al.*, 1996; Bongso & Tan, 2005; Ilic, Genbacev, & Krtolica, 2007), en contraposición a los que abogan por el mínimo cambio en la composición del medio, de forma que el preembrión humanos escoja lo que necesite en función de sus necesidades nutricionales contribuyendo, según sus defensores a una disminución del estrés (Dieamant *et al.*, 2017; Cimadomo *et al.*, 2018; López-Pelayo, Gutiérrez-Romero, Armada, Calero-Ruiz, & Acevedo-Yagüe, 2018).

A continuación, se presenta un breve resumen de las diferentes ventajas y desventajas planteadas en las diferentes opciones:

Cultivo monofásico (con renovación)	Cultivo monofásico (sin renovación)	Cultivo secuencial
Distorsión cultivo	No distorsión cultivo	Distorsión cultivo
No acumulación de factores endógenos ni toxinas	Acumulación de factores endógenos y toxinas	No acumulación de factores endógenos, factores crecimiento, ni toxinas
Más coste en fungible y tiempo	Menos coste en fungible y tiempo	Más coste en fungible y tiempo
El cultivo se reemplaza por cultivo fresco pero mismos nutrientes	El cultivo NO se reemplaza por cultivo fresco	Reemplazamiento por cultivo fresco y diferentes nutrientes
EDTA	EDTA	EDTA

Tabla 1 Ventajas y desventajas de cultivos monofásico y secuencial

1.3.3. Condiciones de cultivo y ambiente materno

La búsqueda de la composición ideal de los medios de cultivo y los requerimientos nutricionales de los preembriones humanos con la idea de emular el ambiente materno sigue ocupando una gran parte de la investigación en FIV. Por esta razón, las primeras propuestas se basaban en la utilización de los medios de cultivo en la composición de los fluidos en los que los gametos y el preembrión se ven expuestos en condiciones *in vivo*, en el tracto reproductivo femenino (Leese, 1998). Las primeras aproximaciones se realizaron en numerosos modelos animales, entre ellos roedores (Sherman & Salomon, 1975; Biggers, 1998), ganado (Thibodeaux *et al.*, 1992; Edwards, Batt, Gandolfi, & Gardner, 1997; Merton *et al.*, 2003; y otras especies (Davis, 1985; Prichard *et al.*, 1992), poniendo en evidencia que los preembriones se desarrollan mejor *in vivo* que *in vitro*. Un ejemplo de ello, fue cuando Lonergan y colegas desarrollaron un estudio en el que cigotos bovinos producidos *in vitro* eran transferidos al oviducto y daban lugar a blastocistos de mayor calidad que cuando se hacía a la inversa, es decir, cigotos producidos *in vivo* se transferían a medios de cultivo hasta la etapa de blastocisto, daban lugar a blastocistos de peor calidad (Lonergan *et al.*, 2003). La calidad de los preembriones era proporcionalmente inversa a los días que pasan en medios de cultivo, por lo que era mejor realizar transferencias de preembriones en día 2-3 que en etapa de blastocisto (Market-Velker, Fernandes, & Mann, 2010) para conseguir gestaciones.

Durante las primeras décadas de la FIV, la mayoría de preembriones eran transferidos en día 3 de desarrollo (8-16 células), ya que el cultivo hasta etapa de blastocisto estaba muy poco refinado y la mayoría se bloqueaban antes de llegar a esta etapa.

El ambiente al que está sometido el preembrión, va cambiando según el lugar del tracto reproductivo femenino en el que se encuentra, y por lo tanto cambia según día de desarrollo. Esto llevó a desarrollar medios secuenciales comerciales como el G1 y G2 cuya formulación cambiaba en base al uso

para estadios tempranos o tardíos (Chatot, Ziomek, Bavister, Lewis, & Torres, 1989; Lane & Gardner, 1997; Gardner, 1998). Gardner y colegas en 1996 analizaron la composición de fluidos uterinos y tubáricos en el ciclo menstrual y observaron concentraciones cambiantes de glucosa y lactato. Este descubrimiento ayudo a la composición del medio G1 y G2 (Barnes *et al.*, 1995; Gardner, Lane, Calderon, & Leeton, 1996). Además, las necesidades metabólicas del preembrión cambian según el día de desarrollo, como se ha visto por ejemplo con la glucosa y el piruvato que pueden afectar a este desarrollo (Conaghan, Handyside, Winston, & Leese, 1993; Gardner, 1998). Se ha discutido, si este cambio de medio al preembrión le puede provocar un estrés innecesario, existe un debate abierto para el que no existen resultados consistentes (Macklon *et al.*, 2002; Reed, Hamic, Thompson, & Caperton, 2009; Vajta, Rienzi, Cobo, & Yovich, 2010; Quinn, 2012).

En varios estudios donde se ha comparado la transferencia embrionaria de blastocisto versus la transferencia en día 3, se ha visto que el cultivo prolongado podría provocar un aumento del peso medio del recién nacido (en gestaciones únicas), más riesgo de parto pretérmino, mayor proporción de defectos del recién nacido y mayor incidencia de gemelos monozigóticos (El Mouatassim, Guérin, & Ménézo, 1999; Tarlatzis *et al.*, 2002; Milki *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2007; Källén *et al.*, 2010; Finnström *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2014).

1.3.3.1. Condiciones externas

El control de las condiciones ambientales durante el cultivo de los preembriones humanos preimplantarios, presta especial atención a una serie de parámetros externos, como son temperatura, presión parcial de dióxido de carbono (PCO₂), intensidad de luz, osmolaridad y presión parcial de oxígeno. Su control resulta esencial para asegurar la máxima viabilidad a los preembriones humanos que se generan *in vitro*. Aquí se repasan brevemente algunos aspectos a tener en cuenta en cada uno de ellos:

- a) Temperatura: A pesar de que la temperatura en el líquido folicular como en el testículo es un poco menor de 37°C, la verdad es que, en reglas generales la temperatura de cultivo de los preembriones humanos preimplantarios se mantiene en un ambiente de 37°C. Los incubadores actuales poseen sondas de temperaturas altamente fiables que permite su control en rangos de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ aunque pueden tener oscilaciones de $+ 0,5^\circ\text{C}$. Aun así, se hace necesario un control de calidad externo capaz de verificar y/o calibrar el buen funcionamiento de estos aparatos. El control de la temperatura adecuada fuera y dentro de los incubadores, durante los cultivos embrionarios o durante su manipulación es fundamental. Una disminución de la temperatura de uno a varios grados, aparte de afectar al metabolismo de los preembriones o su tasa de división, también afecta a otros componentes subcelulares de los ovocitos y los preembriones como son los husos meiótico y mitótico despolimerizándolos e incrementando el riesgo de inducir anomalías cromosómicas. Por ejemplo, la exposición de ovocitos a 34°C durante 10-30 minutos disminuye la recuperación de los husos meióticos en un 25 %. Si la disminución es a temperatura ambiente, menos del 50% de los husos se recuperan. Esta situación parece ser una de las

principales responsables de las anomalías cromosómicas, pues afectan a la configuración de los cromosomas que pierden su organización en la placa metafásica. (Pickering, Braude, Johnson, Cant, & Currie, 1990; Almeida & Bolton, 1995; Wang, Meng, Hackett, Odenbourg, & Keefe, 2001).

- b) Luz: Aunque no existe unanimidad en cuanto a los resultados, se intenta que la intensidad lumínica durante el cultivo y manejo de ovocitos y/o preembriones sea lo menor posible, intentando reproducir las condiciones del tracto reproductor masculino y femenino. Se cree que el posible efecto negativo de la luz, se debe tanto a la creación de radicales libres por su interacción con moléculas presentes en los medios de cultivo, como su acción directa sobre el ovocito y preembriones al carecer éstos de pigmentos protectores. Se estima que los niveles de radiación segura oscilan entre 500 y 1000 lux, como referencia un día radiante en los trópicos tiene 100.000 lux y un día nublado 2000 lux. La mayoría de las bombillas de los microscopios emiten una parte de luz parte de luz UV por lo que idealmente deberán tener filtros de luz ultravioleta, pero además la irradiación que transmiten puede llegar a ser de 50.000 lux. Como regla de oro: 1000 lux proporcionan una energía de 5 Kj.m⁻².h⁻¹ y el preembrión/ovocito comenzará a tener daños a partir de 10-20 minutos. La tabla siguiente muestra algunos estudios sobre de los efectos de la luz en la viabilidad de los preembriones de diferentes especies de mamíferos (Ottosen, Hindkjaer, & Ingerslev, 2007).

AUTOR	FUENTES DE LUZ	ESPECIE	PARÁMETRO	CONCLUSIÓN
Daniel 1964	Luz visible fluorescente (UV e IR), 2600 Lux	Preembrión de conejo	Número de divisiones por tiempo	Disminución significativa después de 4 horas de iluminación
Kruger & Stander 1985	Luz visible incandescente-fluorescente, 2900 Lux	Preembrión de ratón	Desarrollo de estadio de 2 células a blastocisto	No existe efecto después de 30 minutos de iluminación
Schumacher & Fischer 1988	Luz visible fluorescente, 2400 Lux	Preembrión de conejo	Proliferación celular con incorporación de timidina	Disminución significativa después de 30 minutos de exposición
Barlow <i>et al.</i> 1992	Luz halógena incandescente, 4000 Lux	Ovocitos de ratón fecundados	Primera división celular	Disminución significativa después de 60 minutos de iluminación
Umaoka <i>et al.</i> 1992	Luz visible fluorescente, 2400 Lux	Preembrión de hámster	Desarrollo del preembrión de 1 a 4-8 células	Disminución significativa después de 5 minutos, muy perjudicial después de 30 minutos para primera división celular



AUTOR	FUENTES DE LUZ	ESPECIE	PARÁMETRO	CONCLUSIÓN
Schumacher <i>et al.</i> 1998	Luz visible fluorescente (UV e IR), <1600 Lux	Preembrión de conejo en día 3-4	Anormalidades de ploidía de ADN	No aumento después de 24 horas de iluminación
Takahashi <i>et al.</i> 1999	Luz visible 380-780 nm, 400 Lux	Preembrión de hámster	Fragmentación de ADN medido por Comet	Efecto significativo después de 5 o más minutos
Squirrel <i>et al.</i> 2001	Luz monocromática laser 514, 532 y 568 nm, 115 Kj/m ²	Preembrión de hámster	Desarrollo de estadio de 2 células a mórula-blastocisto	Reducción significativa a 115 Kj/m ²

Tabla 2 Estudios sobre el efecto de la luz sobre preembriones de mamíferos Nota: Tomada de Ottosen *et al.*, (2007)

- c) Presión Parcial Dióxido de Carbono (PCO₂). Este parámetro resulta fundamental para controlar el pH de los medios en los que se cultivan los gametos y preembriones. La PCO₂, debe ajustarse de manera precisa para conseguir que el medio de cultivo posea un pH fisiológico alrededor de 7,2-7,4. El dióxido de carbono (CO₂) juega un complejo papel en el medio de cultivo debido a que influye la cantidad de CO₂ disuelto, el pH y la cantidad de iones HCO₃⁻. Las reacciones que tienen lugar en el medio son:



El incremento de la concentración de ion bicarbonato desplaza la ecuación (1) hacia la izquierda, de modo que el pH se establece en 7,4. Para establecer un pH determinado se debe tener en cuenta especialmente los niveles de bicarbonato sódico y la PCO₂. Cada medio tiene una concentración recomendada de bicarbonato y PCO₂ para alcanzar el pH correcto que viene dada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch. La medición del pH siempre nos dará una visión más real de lo que sucede en un medio de cultivo dado, sometido a las condiciones particulares de cada laboratorio de Embriología Clínica. Dado que el pH es dinámico y cambia en función de la presión parcial de CO₂, es importante mantener el % de CO₂ constante. Este es un requisito fundamental en todos los estadios de desarrollo, pero se hace más esencial sobre todos en ovocitos desnudos y preembriones descongelados que son especialmente vulnerables a las fluctuaciones de pH. En el caso de los ovocitos al igual que los preembriones tienen capacidad limitada para combatir la alcalosis del medio de cultivo y más facilidad para combatir la acidosis; sin embargo, esta última requeriría un consumo extra de energía al tener que utilizar el antiporter Na⁺/H⁺. En cualquier caso, ambas condiciones ejercerían un efecto estresante sobre los ovocitos y preembriones que podría repercutir en la capacidad de desarrollo. Como ejemplo, en preembriones de ratón, un cambio de pH de 7.4 y 6.8 durante solo 3 horas origina una disrupción de la localización de mitocondrias y filamentos de actina (Squirrel, Lane, & Bavister, 2001). El aumento del pH entre 0,1 y 0,15, incrementa la glicolisis y disminuye el metabolismo oxidativo. Resulta altamente interesante observar como prácticas tan extendidas y habituales en los laboratorios de FIV tales como son los protocolos de vitrificación,

afectan de formas sensible a la capacidad de los preembriones de controlar su pH interno (Lane & Gardner, 2000b).

El siguiente diagrama muestra un esquema de capacidad de regular el pH según en el estadio evolutivo durante el desarrollo preimplantacional:

pHe: 7.2-7.4 pHi: 7.1

Estadio celular	pH Interno (pHi)
Ovocitos Vesícula Germinal	7.04 + 0.07
Ovocitos Metafase I	7.03 + 0.04
Ovocitos Metafase II	6.98 + 0.02
Preembriones 2-8 células	7.12 + 0.01




Ilustración 1 Diagrama de la capacidad de regular el pH por parte de ovocitos y preembriones tempranos
 pHe: pH externo, pHi: pH interno

El control del pH resulta pues fundamental ya que controla aspectos tan importantes como glicólisis y otras funciones metabólicas, también afecta a la conformación de las proteínas y a la dinámica del citoesqueleto. También, está implicado en el transporte celular así como en funciones epigenéticas (Swain, 2010a). Sin embargo, no existen estudios en humanos que aborden como los cambios transitorios de pH pueden afectar a la capacidad evolutiva del preembrión, y de esta manera saber si se incrementan los errores mitóticos.

- d) Presión Parcial de Oxígeno (PO₂): En cuanto la presión parcial de oxígeno, el presente proyecto de tesis tiene como objetivo de investigación ver cómo podría afectar esta variable física sobre los resultados obstétricos y perinatales.

1.4. Baja Tensión de Oxígeno

1.4.1. Condiciones de oxígeno en el ambiente materno

En los procedimientos de FIV los preembriones preimplantatorios están expuestos a un ambiente *in vitro* por varios días. En lo que a la concentración de oxígeno se refiere, los preembriones en condiciones *in vivo* se encuentran expuestos a bajas concentraciones de este gas. Estas condiciones varían también según la porción del oviducto en el que se encuentren y de la especie de la que hablemos. Por ejemplo, en el oviducto de conejo y útero de conejo y hámster va de un 8,7% de oxígeno a un 1,5% de oxígeno en el útero de monos *Rhesus* y humanos (Yedwab, Paz, Homonnai, David, & Kraicer, 1976; Fischer, Künzel, Kleinstein, & Gips, 1992).

Esta diferencia de concentraciones de oxígeno entre el útero y el oviducto sugiere que el preembrión pasa por un gradiente decreciente de oxígeno hasta que alcanza su mínimo en el estado de

mórula cuando empieza el proceso compactación. Esto coincide con el cambio de preferencia de las rutas metabólicas del preembrión, de la fosforilación oxidativa para la producción de energía en las primeras etapas de desarrollo a la producción de ATP por glicólisis en los preembriones postcompactados (Leese, 1995).

Cambios similares han sido observados en humanos, de forma que en los fluidos del folículo preovulatorio de humanos existe una concentración que varía del 1,5 al 5,5 % de oxígeno (Gosden & Byatt-Smith, 1986). También existe una baja concentración de oxígeno en los folículos preovulatorios (1% -5.5%) (Gosden & Byatt-Smith, 1986). En humanos, durante las primeras etapas del embarazo existe una concentración de 2,2% (20 mmHg) de oxígeno en el fluido celómico y de un 2% (15-18 mmHg) en el líquido amniótico (Jauniaux, Ben-Ami, & Maymon, 2013). Algunos estudios han medido la concentración de O₂ en la cavidad uterina mujeres que no estaban embarazadas, se observó que existía una concentración de un 2% (15mmHg) de O₂ en el útero (Yedwab, Paz, Homonnai, David, & Kraicer, 1976), un posterior trabajo demostró que la concentración de oxígeno era de media un 2% (18,9 mmHg) en la superficie endometrial en el momento de la fecundación (Ottosen *et al.*, 2006). Sin embargo no existe ningún estudio que reporte la concentración de oxígeno en el oviducto humano.

La concentración de oxígeno en el líquido folicular en humanos se correlaciona de forma negativa con las anomalías cromosómicas y citoplasmáticas de los ovocitos (Van Blerkom, Antczak, & Schrader, 1997). Además, se ha observado que una baja concentración de oxígeno es beneficiosa en la maduración de ovocitos *in vitro* (Preis, Seidel, & Gardner, 2007). Existe un estudio donde se ha medido la concentración de oxígeno de la vena ovárica (un 7% de O₂) y en los folículos (8% de O₂) en humanos (Shalgi, Kraicer, & Soferman, 1972). Sin embargo, existen estudios contradictorios de cómo se utiliza este oxígeno, un estudio mantiene que este oxígeno se consume principalmente por las células de las granulosa mientras que el ovocito se encuentra en anoxia (Gosden & Byatt-Smith, 1986). Otro estudio postula justamente lo contrario (Clark, Stokes, Lane, & Thompson, 2006).

Los preembriones *in vivo* se encuentran rodeados por el fluido oviductal dónde se encuentra el oxígeno y los substratos necesarios para su desarrollo. Durante las primeras etapas de desarrollo, el preembrión se concentra en la producción de energía y activación de los genes. La producción de energía se basa en la respiración aeróbica y se oxidan los substratos (piruvato y aminoácidos) para obtener la energía. Posteriormente, existe un cambio de metabolismo hacia la glicólisis oxidativa (Martin, 2000). La producción de moléculas de ATP aumenta con la compactación del preembrión y la formación de blastocisto, respalda la síntesis de proteínas y los sistemas de transporte iónico (Thompson, Sherman, Allen, McGowan & Tervit, 1998).

En 1991 se propuso un modelo, dónde se sugirió que para los preembriones de especies pequeñas (como el caso de ratón) un 5% de oxígeno es suficiente para las primeras etapas de desarrollo (fosforilación oxidativa). Sin embargo, en preembriones de especies de mayor tamaño, el preembrión en etapas postcompactación crea un gradiente de oxígeno hasta llegar a la anoxia en el centro del preembrión (Byatt-Smith, Leese, & Gosden, 1991). Este modelo se ve reforzado por otros estudios, dónde se ha visto que una concentración de un 2% de O₂ resulta perjudicial en preembriones de ratón

postcompactados (Kind, Collett, Harvey, & Thompson, 2005) pero óptima en blastocistos bovinos (Thompson, 2000).

Pero, ¿por qué el cultivo en concentraciones propias de la atmósfera podría ser perjudicial para los preembriones? Bien, en condiciones normales, el oxígeno se utiliza en la fosforilación oxidativa, el consumo de oxígeno es dependiente de los sustratos disponibles, de la concentración de oxígeno y de la integridad de los complejos enzimáticos mitocondriales que forman canales de alta energía de electrones. Sin embargo, si la integridad de las membranas mitocondriales se ve comprometida pueden generarse especies ROS (*Reactive Oxygen Species*). Especies que se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Pero que si aumentan en gran manera pueden resultar en daños significativos a las estructuras celulares.

Las ROS que se generan son el radical anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo altamente tóxicos (OH^-), que generan diferentes grados de daño oxidativo (Shigenaga, Aboujaoude, Chen, & Ames, 1994). A pesar, de que existen mecanismos de protección endógenos en los ovocitos y los preembriones, como la actividad superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (El Mouatassim, Guérin, & Ménéz, 1999), los radicales libres de oxígeno afectan al ADN mitocondrial, proteínas y lípidos, alteran el ratio de glutatión oxidado a glutatión reducido (Orrenius, Burkitt, Kass, Dypbukt, & Nicotera, 1992; Orrenius, McCabe, & Nicotera, 1992), agregan componentes del citoesqueleto y condensan el retículo endoplasmático (Tarín, 1996). El estrés oxidativo también causa fragmentación del ADN. Todos estos daños causan en el preembrión fragmentación (Noda *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998), apoptosis, retraso o bloqueo del desarrollo (Johnson & Nasr-Esfahani, 1994) o incluso pueden comprometer el posterior embarazo (Catt & Henman, 2000).

1.4.2. Cultivo embrionario en baja tensión de oxígeno *in vitro*

A lo largo de esta introducción, hemos hablado en varias ocasiones de los posibles beneficios de simular las condiciones fisiológicas para mejorar la viabilidad embrionaria, por lo que el control de la concentración de oxígeno es una variable más a tener en cuenta.

La tensión de oxígeno utilizada durante el cultivo embrionario en FIV ha sido la atmosférica (20%) durante más de 30 años. Actualmente, existen muchos estudios que están tratando de estudiar el efecto de la concentración de oxígeno en el cultivo de preembriones de diferentes especies de mamíferos.

En estudios con preembriones de mamíferos se ha observado una disminución de los ciclos de división celular, disminución de las células apoptóticas, menor incidencia de mosaicismo, mejor MCI: Masa Celular Interna (*Inner Cell Mass*; ICM), mayor número de blastocistos, cuando se encuentran en un 5% de O_2 vs a un 20% de O_2 . Sin embargo, cuando hablamos de preembriones humanos existen resultados contradictorios (aunque no existe ningún estudio dónde se reporte unos peores resultados clínicos en bajas concentraciones de oxígeno). Por esta razón, cada vez más los laboratorios de FIV están adoptando esta medida. Existen varios estudios al respecto de cómo puede afectar la concentración de oxígeno al éxito de las TRA.

La concentración ambiental de oxígeno además de no ser la que existe *in vivo* puede provocar un aumento de las especies ROS.

En el 2000 Catt y Henman postularon tres mecanismos por los que se pueden ayudar a minimizar los daños que puede causar el estrés oxidativo (Catt & Henman, 2000):

- Disminuir la tensión de oxígeno durante el cultivo *in vitro*.
- Introducir en la composición del medio de cultivo componentes antioxidantes.
- Disminuir el tiempo de fecundación para evitar el daño oxidativo causado por el propio metabolismo del espermatozoide.

Se han llevado a cabo varios estudios dónde se evalúan condiciones de cultivo idénticas donde la única diferencia entre ellas era la concentración de oxígeno, atmosférica (20%) o fisiológica (5-8%). Se han evaluado aspectos morfológicos y de desarrollo a nivel embrionario, resultados de éxito/efectividad derivados de la aplicación de la TRA (como tasa de embarazo, de parto, de aborto, etc.), resultados de seguridad, como resultados perinatales de los recién nacido vivos (RNV) entre los que figuran la talla, el peso, el perímetro craneal, etc.

Recientemente, se llevó a cabo una revisión de varios estudios dónde se quería observar si la concentración de oxígeno a niveles fisiológicos (alrededor del 5%) mejora las tasas de éxito de las TRA debido a los contradictorios resultados que existen en la literatura. En esta revisión se incluyeron solamente estudios clínicos aleatorizados, fueron 7 estudios los que finalmente cumplieron los criterios de inclusión (al principio se seleccionaron 45, 21 se descartaron por no ser realmente aleatorios y 12 se descartaron por aleatorizar por ciclo y no por paciente, criterio de inclusión de la revisión). El principal resultado a analizar era la tasa de RNV (por paciente). También se analizó el tasa de embarazo clínico (saco gestacional 6-8 semanas de gestación) y evolutivo (más de doce semanas de gestación), aborto, embarazo múltiple y de malformaciones congénitas. Otros resultados analizados fueron la tasa de implantación, número de preembriones de buena calidad por ciclo y tasa de criopreservación de preembriones supernumerarios.

En esta revisión se analizaron 7 estudios (2422 pacientes) pero en el metaanálisis se incluyeron solamente 4 (1382 pacientes), ya que los 3 restantes solamente mostraban los % de las tasas y no el tamaño de los grupos de pacientes.

La tasa de RNV parece ser que mejora en bajas concentraciones de oxígeno (resultado estadísticamente significativo), de un 30% en concentración atmosférica a un 32-43% en baja concentración de oxígeno. Esta tasa tiene en cuenta tanto las transferencias embrionarias en día 3 como las de días posteriores (4, 5 o 6). Sin embargo, cuando se estratifica por día de transferencia, si se analizan los resultados de transferencia en día 3 no se encuentran diferencias en cuanto a esta tasa entre las dos concentraciones de O₂, lo contrario sucede cuando hablamos de transferencias en etapa de blastocisto (día 4, 5 o 6) dónde existen diferencias significativas a favor de la baja concentración de oxígeno. Sin embargo, estas diferencias podrían ser debidas a la diferencia de tamaño de los diferentes grupos que se comparan.

En cuanto a las tasas de embarazo (clínico y evolutivo), también se observa que es significativamente mejor en bajas concentraciones de O₂. Además, los datos a nivel embrionario (tasa de implantación y criopreservación) y de calidad embrionaria también son mejores cuando la concentración de O₂ es similar a la fisiológica. Las tasas de embarazo múltiple, de aborto y de malformaciones no muestran diferencias significativas entre ambas condiciones de cultivo.

Por lo tanto, podemos decir que no existen evidencias en esta revisión que sustenten que la baja concentración de oxígeno provoca mejores resultados en cuanto a la principal tasa de éxito: la tasa de recién nacido vivo/paciente (solo publicada en tres de los estudios analizados). La tasa de malformación tampoco se ha analizado ampliamente, ya que sólo un estudio publicó los resultados, por lo que no se dispone mucha información al respecto.

De esta revisión podemos concluir que existe una falta de homogeneidad en cuanto a la metodología empleada, tipo de randomización o aleatorización, nomenclatura, etc. Que hace que sea muy complicado llevar a cabo un buen análisis conjunto de los datos, por lo que los autores animan a la comunidad de investigadores a llevar a término más estudios dónde se comparen los dos tipos de cultivo (las dos concentraciones de oxígeno) y como éstas pueden afectar a la salud de la descendencia obtenida mediante estas TRA (Bontekoe *et al.*, 2012).

1.4.3. Impacto del cultivo embrionario en baja tensión de oxígeno en el metabolismo embrionario

Como se ha comentado anteriormente, el preembrión parece poder adaptarse al ambiente en el que se encuentra *in vitro*, determinado por los diversos protocolos de TRA que existen (principalmente a los distintos tipos de medio de cultivo y otras condiciones físicas como la temperatura, concentración de oxígeno, etc.). Sin embargo, se ha visto que estas condiciones afectan a la expresión génica de los preembriones que se encuentran en cultivo y por lo tanto al perfil metabólico de éstos (Gardner *et al.*, 2013; Skiles *et al.*, 2018).

La concentración de oxígeno se ha visto que es determinante en cuanto a algunas rutas metabólicas que utiliza el preembrión y en cuanto a la expresión génica de éste. Por ejemplo, en blastocistos de cerdo se altera el metabolismo glicolítico (Wale & Gardner, 2012), también en preembriones de ratón se ha observado la expresión diferencial de algunos biomarcadores (Katz-Jaffe, Linck, Schoolcraft, & Gardner, 2005). Otros estudios de preembriones de ganado y ratón, han demostrado que cuando existen condiciones de baja tensión de oxígeno disminuye la expresión de genes de estrés, como el de las *Heat Shock Proteins* (HSP) o Proteínas de Choque Térmico (PCT) (Edwards, Ealy, & Hansen, 1995) o la Manganese Superóxido Dismutasa (Corrêa, Rumpf, Mundim, Franco, & Dode, 2008).

Por otro lado, también se ha visto que existe un cambio del patrón de metilación según la concentración de oxígeno en muchas células como fibroblastos, células del trofoblasto y células tumorales (Shahzad, Bertrand, Minhas, & Coomber, 2007; Pucci *et al.*, 2012; Robinson, Neary, Levendale, Watson, & Baugh, 2012).

Actualmente, en el campo de la metabolómica se han desarrollado nuevas tecnologías que permiten realizar un análisis global tanto cualitativo como cuantitativo de los metabolitos segregados por células o tejidos. Por ejemplo, se puede conocer si existe un perfil metabólico alterado de los preembriones que provenían de pacientes con obesidad comparándolo con los preembriones de pacientes con normopeso (Bellver *et al.*, 2015).

Los metabolitos de bajo peso molecular son los productos finales del metabolismo celular, y por lo tanto su análisis, puede esclarecer los cambios que se producen cuando se producen cambios de condiciones genéticas, nutricionales o ambientales (Singh & Sinclair, 2007). Estas técnicas no invasivas para el estudio del perfil metabólico, se han utilizado para crear la huella metabólica de preembriones frescos o vitrificados y poder observar si existen diferencias entre ellos (Domínguez, Castelló, Remohí, Simón, & Cobo, 2013). O por ejemplo, comparar si existen algunos metabolitos, que pudieran ser predictores de la viabilidad de los preembriones y de las tasas de embarazo (Brison, Hollywood, Arnesen, & Goodacre, 2007; Seli *et al.*, 2011; Nadal-Desbarats *et al.*, 2013) o como predictores de aneuploidías (Sánchez-Ribas *et al.*, 2012; Hardarson *et al.*, 2012; Vergouw *et al.*, 2012; Kirkegaard *et al.*, 2014).

Estudios en diferentes especies de mamíferos, apuntan a que la tensión de oxígeno atmosférica es capaz de provocar un cambio de las rutas metabólicas (Wale & Gardner, 2012; Kumar *et al.*, 2015). El estudio incluyó grupos de substratos: glucosa, piruvato, aminoácidos, ácidos grasos y fosfolípidos. Sin embargo, existen muy pocos estudios que compararen los perfiles metabólicos de los preembriones humanos cultivados en estas dos condiciones de oxígeno (6% y 20% de Oxígeno) (De los Santos *et al.*, 2015). En este estudio prospectivo, se utilizaron preembriones de pacientes que se sometieron a una donación de ovocitos, se fecundaron mediante ICSI, se cultivaron en concentraciones de oxígeno distintas (6% y 20%) y transfirieron a las pacientes en día 3. Los dos grupos eran comparables ya que los ovocitos eran de donantes (cumplen unos requisitos comunes), la valoración morfológica de los preembriones entre grupos también fue similar y las características de las parejas que recibían el tratamiento también eran comparables. Para realizar el perfil metabólico global, se utilizó la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (*Ultra-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*; UPLC-MS), y se procedió al análisis de los principales componentes. Se realizó un análisis global (*Principal Components Analysis*; PCA) para crear un perfil metabólico en cada concentración de oxígeno, y se observó que sólo tres metabolitos fueron significativamente distintos entre los dos grupos. Es decir, que existía un perfil metabólico casi idéntico entre los medios de los preembriones que estaban en cultivo en las dos concentraciones de oxígeno distintas. La falta de diferencias notables, podía deberse bien a que el tipo de análisis no permitía su detección ya que no se detectaron componentes como el Triptófano o la Fenilalanina presentes en cultivos de otras especies (Booth, Holm, & Callesen, 2005; Booth, Watson, & Leese, 2007). La glucosa, otro de los metabolitos analizados, tampoco fue diferente entre ambas condiciones de cultivo, lo cual podría explicarse debido a que no es el sustrato utilizado preferencialmente en el preembrión humano en etapas tempranas de desarrollo y por lo tanto, la concentración de oxígeno durante el cultivo podía ejercer poco efecto (Leese, Hooper, Edwards, & Ashwood-Smith, 1986; Hardy *et al.*, 1989; Conaghan, Handyside, Winston, & Leese 1993).

De la misma forma se analizaron los ácidos grasos y fosfolípidos cuya presencia sobre todo de saturados (esteárico y palmítico) es esencial en los gametos femeninos (Matorras *et al.*, 1998), tampoco fueron diferentes entre ambas condiciones de cultivo, posiblemente al no ser requeridos en primeras etapas de desarrollo (la beta oxidación de un ácido graso produce tres veces más energía que una molécula de glucosa) (Dunning, Russell, & Robker, 2014).

1.5. Riesgos obstétricos y perinatales derivados la Reproducción Asistida (RA)

1.5.1. Riesgos obstétricos y perinatales derivados de la FIV y el ICSI

La medicina reproductiva es un campo en el que por diferentes circunstancias se han ido introduciendo diferentes técnicas sin elaborar suficientes estudios preclínicos que demostraran la inocuidad de la técnica; la introducción de la ICSI o el DGP son algunos ejemplos. Las nuevas técnicas reproductivas pueden presentar riesgos de seguridad, principalmente para la descendencia obtenida a través de ellas. Por ejemplo, para la FIV, el primer estudio sobre la salud a largo plazo de los niños de FIV se publicó 12 años después de su implementación clínica (Morin *et al.*, 1989). Recientemente, se han llevado a cabo estudios prospectivos de seguimiento de la descendencia de las TRA que permiten estudiar la salud de grandes grupos de niños derivados de diferentes técnicas reproductivas. Aunque, los resultados a menudo son difíciles de interpretar debido a la naturaleza observacional de estos estudios (y el riesgo asociado de factores de confusión, por ejemplo, subfertilidad de los padres), diferencias en las definiciones de medidas de resultado clínico, falta de uniformidad en los protocolos de evaluación y heterogeneidad de las razones subyacentes para el tratamiento de la fertilidad.

Por otro lado, se ha visto que, aunque los niños concebidos a través de TRA son predominantemente sanos (Hart & Norman, 2013a, 2013b). También se ha observado que existe una leve pero mayor incidencia de defectos congénitos (Rimm, Katayama, Diaz, & Katayama, 2004; Wen *et al.*, 2012; Davies *et al.*, 2012; Hansen, Kurinczuk, Milne, de Klerk, & Bower, 2013), bajo peso al nacer (Dumoulin *et al.*, 2010; Kleijkers *et al.*, 2016), crecimiento enlentecido y desviaciones del desarrollo (Ceelen, van Weissenbruch, Vermeiden, van Leeuwen, & Delemarre-van de Waal, 2008; Ceelen *et al.*, 2009). También niveles más altos de biomarcadores cardiovasculares y metabólicos durante su vida posterior (Ceelen *et al.*, 2009; Hart & Norman, 2013b), hecho que podría sugerir que los niños con FIV tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas.

Además, en los modelos animales se ha observado que la FIV reduce significativamente esperanza de vida en ratones expuestos a un alto contenido de grasa dieta (Rexhaj *et al.*, 2013). Por otro lado, la FIV también podría inducir modificaciones epigenéticas que pueden tener efectos sobre desarrollo y metabolismo de la descendencia (Mahsoudi, Li, & O'Neill, 2007; Chen *et al.*, 2014; Feuer & Rinaudo, 2017).

Aunque, se han observado todos estos resultados, la interpretación del efecto global suele ser compleja debido al uso de varios métodos para realizar FIV, la falta de controles y varias definiciones de

medidas de los resultados (por ejemplo, defectos de nacimiento). Además, de que los datos sobre los efectos en la salud de la descendencia obtenida mediante TRA no se recogen de manera uniforme.

Algunos autores proponen utilizar un modelo animal como el ratón para poder evaluar la seguridad de las TRA antes de implementarlas en humanos (Mulder *et al.*, 2018).

Las razones para utilizar el ratón como modelo básicamente son dos:

- Solamente existe una divergencia genética del 10% con los humanos (Waterston, Lander, & Sulston, 2002). Los modelos de primates no humanos muestran la mayor similitud genética con una divergencia genética de apenas 1-3% en chimpancés, gorila y orangután (Chen & Li, 2001) debido a su gran similitud con los humanos (a nivel cognitivo, biológico y fisiológico). Este sería un muy buen modelo, pero es poco ético y está prohibido según la legislación de la UE (Directiva 2010/63/ UE) trabajar con estos animales con fines de investigación.
- La esperanza de vida es corta y por lo tanto los resultados se obtienen en un periodo de tiempo corto. Si se utilizasen otros animales domésticos serían necesarias décadas para obtener resultados (Ceelen & Vermeiden, 2001; Vodička *et al.*, 2005; Lorenzen, Follmann, Jungersen, & Agerholm, 2015). Sin embargo, los ratones alcanzan su madurez sexual a las 6-8 semanas. Por lo que, permite el estudio de las enfermedades relacionadas con la edad en un período relativamente corto.

Además, los costes de mantenimiento de los animales son bajos y éticamente entraña menos problemas (Santulli *et al.*, 2015). En la ilustración 2 se puede observar las pruebas fisiológicas desde el nacimiento hasta la muerte en vida de ratón versus la vida humana. A grandes rasgos, podemos ilustrar las dos principales etapas de la vida: el desarrollo infantil y la edad adulta. En cada etapa se incluyen ejemplos de pruebas fisiológicas que se podrían llevar a cabo. Estas cortas etapas de desarrollo, en el ratón permiten la investigación de trastornos metabólicos y del desarrollo, relacionados la mayoría de las veces con la edad en humanos.

En cuanto a valoraciones cognitivas en la infancia y la adolescencia de los niños nacidos mediante algunas TRA, y a pesar de que la mayoría de los estudios presentaban sesgo de selección, debido a la exclusión de los niños con mayor riesgo de deterioro cognitivo. Se observó que no había diferencias en los resultados cognitivos entre los niños concebidos con FIV convencional y aquellos concebidos de forma espontánea. Sin embargo, cuando se comparó a los niños concebidos mediante ICSI con los concebidos de forma espontánea, los resultados fueron inconsistentes (se analizó un total de tres estudios): un estudio reportó un cociente de inteligencia (CI) más bajo (CI, 5-7 puntos, de media) entre los niños ICSI mientras que los dos restantes estudios de alta calidad no encontraron diferencias entre los dos grupos. Además, entre estos tres estudios también se compara los niños concebidos con ICSI versus concebidos mediante la FIV convencional, uno encontró diferencias significativas en el riesgo de retraso mental (más riesgo con ICSI), otro encontró una pequeña diferencia en cuanto CI (3 puntos menos, de media) y el último no encuentra diferencias en absoluto. Hubo pocos estudios que evaluaron la criopreservación de preembriones, o tratamientos menos invasivos como la inducción de la ovulación sin FIV/ICSI (Rumbold *et al.*, 2017).

INTRODUCCIÓN

Todos estos estudios ponen de manifiesto el efecto de las técnicas de RA sobre la salud de los niños, sin embargo no permiten ponderar el peso específico de otras variables como estimulación ovárica controlada o las del cultivo embrionario *in vitro*, ya que estos podrían ser una causa adicional que hay que valorar, sin olvidar otros factores como la subfertilidad de los progenitores *per se* cuya contribución se ha discutido en numerosas ocasiones por expertos en la materia (Pinborg *et al.*, 2013).

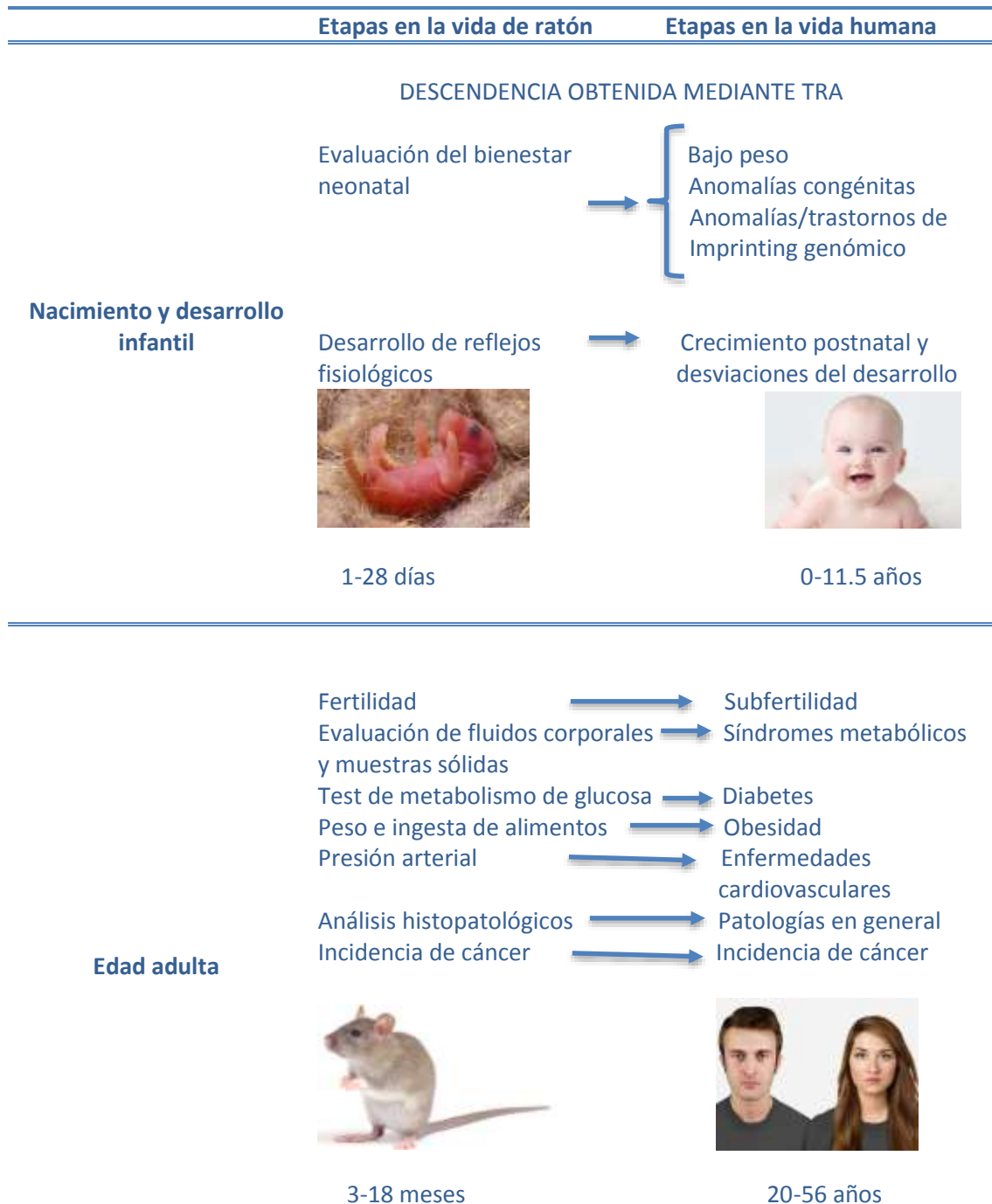


Ilustración 2 Comparativa entre ratón y humano de las etapas de vida y los patologías asociadas Nota: Tomada de Mulder *et al.*, (2017)

1.5.2. Riesgos obstétricos y perinatales del cultivo embrionario

Entre las variables del cultivo embrionario, el medio de cultivo que se utiliza para mantener la viabilidad de los preembriones en el laboratorio, puede ser un condicionante que podría repercutir en los resultados y tasas de éxito los tratamientos de RA (Mantikou, Youssef, *et al.*, 2013). Prueba de ello es que los medios de cultivo son capaces de ejercer un efecto sobre el patrón de expresión génica en el preembrión preimplantatorio en etapa de blastocisto, es decir que el epigenoma del preembrión se ve afectado en función de la composición química de los medios de cultivo (Kleijkers *et al.*, 2015; Mantikou *et al.*, 2016). A pesar de ello, su efecto real sobre los resultados clínicos es todavía controvertido. El número de estudios aleatorizados y bien diseñados que comparan diferentes medios de cultivo y sus tasas clínicas de éxito (dónde la tasa de recién nacido vivo es la más relevante en los tratamientos de FIV es limitado (Mantikou, Youssef, *et al.*, 2013; Youssef *et al.*, 2015).

Recientemente, un estudio aleatorizado multicéntrico llevado a cabo por Kleijkers y colegas en 2016, se compararon dos medios de cultivo muy utilizados a nivel mundial: HTF (*Human Tubal Fluid*) y G5 (post-FIV/ICSI). Ambos medios de cultivo utilizan bajas concentraciones de oxígeno (6% en G5 y 5% en HTF). Este estudio analizaba muchos resultados a nivel embrionario (morfología del preembrión, tasa fecundación, número de preembriones viables y transferidos, tasa implantación, número de preembriones criopreservados...), gestacional (tasa embarazo bioquímico y clínico, aborto, tasa recién nacido vivo...) y perinatal (edad gestacional, talla y peso del recién nacido, malformaciones...).

Los resultados que se obtienen de la morfología embrionaria y desarrollo embrionario parecen ser mejores en G5 que en HTF, arrojando mejor tasa de fecundación en HTF comparado con G5 (69.1% vs 62.9%) pero posteriormente el número de preembriones viables es superior en G5 y su tasa de implantación también es significativamente más alta en G5 (20.2% en G5 vs 15.3% en HTF).

En cuanto a los resultados gestacionales, hablando de forma global parece que existen mejores resultados cuando se utiliza G5 en lugar de HTF. Pero, de todos ellos solo resulta estadísticamente significativo el embarazo clínico (47.7% en G5 vs 40.1% en HTF) y la tasa de aborto (15.8% en G5 vs 13.4% en HTF).

Sin embargo, en cuanto a los resultados perinatales y obstétricos parece que ocurre justamente lo contrario parece ser ligeramente mejores cuando se utiliza HTF en lugar de G5. El peso del recién nacido es superior en el grupo de HTF y el número de recién nacidos pretérmino (antes de las 37 semanas de gestación) también es inferior en el grupo de HTF. En cuanto a las malformaciones, el tamaño de la muestra era demasiado pequeña para disponer de suficientes datos para analizar los resultados.

Aunque el principal resultado a analizar era la tasa de recién nacido vivo y ésta no resulto estadísticamente significativa entre los dos grupos: 44.1% en G5 vs 37.9% en HTF, con un Riesgo Relativo (RR)= 1.2 (IC 95%, Intervalo de Confianza del 95%: 0.99-1.37) (Kleijkers *et al.*, 2016).

Aun así, otros estudios, a pesar de su carácter retrospectivo, han sugerido que los medios de cultivo pueden afectar al peso del recién nacido (Nelissen *et al.*, 2012), que se detecta a partir del segundo

trimestre de embarazo (Nelissen *et al.*, 2013) y que permanecen hasta los dos años de vida (Kleijkers *et al.*, 2014), sembrando la duda sobre la repercusión de los medios a medio y largo plazo.

Queda patente la necesidad de llevar a cabo más estudios sobre las diferentes formas de cultivar los preembriones en los laboratorios de FIV y sobre de qué forma puede afectar esto a los resultados gestacionales y más a largo plazo sobre la salud de la descendencia que se obtiene mediante las TRA (Kleijkers *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

Objetivo específico nº 1:

Conocer si el uso de baja tensión de oxígeno durante el cultivo en las primeras etapas del desarrollo embrionario mejora los resultados de gestación, gestación clínica, gestación evolutiva por transferencia embrionaria en dos poblaciones diferentes de estudio:

Población inicial compuesta por las parejas que participaron a un estudio prospectivo aleatorizado.

Población total compuesta por la población inicial y una población adicional compuesta por pacientes no aleatorizadas cuyos preembriones también estuvieron expuestos a ambas condiciones de cultivo.

Objetivo específico nº 2:

Calcular la probabilidad de éxito de gestación, gestación clínica, gestación evolutiva acumulada por ciclo iniciado tras las transferencias en fresco y de preembriones criopreservados en ambas condiciones de cultivo.

Objetivo específico nº 3

Conocer si el uso de baja tensión de oxígeno durante el cultivo en las primeras etapas del desarrollo embrionario mejora los resultados obstétricos y perinatales.

3. HIPÓTESIS

En los cultivos embrionarios en estadios tempranos, el uso de presiones parciales de oxígeno atmosféricas altas no afecta a los resultados obstétricos ni perinatales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio y participantes

La población de estudio de esta tesis doctoral estuvo comprendida por mujeres (pacientes), que acudieron al centro de reproducción asistida de IVI Valencia. Éstas se sometieron a ciclos de donación de ovocitos y además consintieron participar en un estudio de carácter aleatorio, aprobado por la Junta de revisión institucional (IRB) sobre el uso de sujetos humanos en la investigación, en el Instituto Valenciano de infertilidad (IVI, Valencia). El estudio fue un estudio clínico aleatorizado prospectivo de único centro, no ciego, con grupos en paralelo con referencia NCT 01532193. El estudio aleatorizado, se llevó a cabo entre Noviembre del 2009 y Abril del 2012. Posteriormente, para aumentar la potencia del estudio se añadieron nuevos datos no aleatorizados que van desde Abril del 2012 hasta Junio del 2017.

Los criterios de inclusión y exclusión de las parejas fueron las siguientes:

- a) Criterios de inclusión: mujeres con buena salud física y mental, edad comprendida entre los 25 y los 45 años, primer o segundo tratamiento de donación de ovocitos, transferencia embrionaria en día 3 y en fresco y IMC (Índice de Masa Corporal) comprendido entre 18 y 30 Kg/m².
- b) Los criterios de exclusión: mujeres con patología uterina o hidrosalpinx, aborto recurrente y enfermedad de tipo crónico.

El cálculo del tamaño muestral del estudio inicial aleatorizado se calculó en base a un aumento de un 10% de tasa de gestación clínica del 54%, por ciclo de donación de ovocitos (con transferencia en fresco) cuando se utiliza el cultivo de baja tensión/concentración de oxígeno (prueba bilateral con $\alpha=0,05\%$ (nivel de significación) y un error $\beta= 0,2\%$). Según este cálculo se necesitaron 380 ciclos para cada tipo de cultivo embrionario (grupo experimental y grupo control).

De forma adicional y para incrementar el tamaño muestral se incluyeron datos de nuevos ciclos de ovodonación posteriores al estudio de pacientes que acudieron al centro, de Abril del 2012 a Junio del 2017. Cuyos preembriones crecieron en las condiciones de cultivo de oxígeno de interés. Por lo que, con una tasa de gestación clínica de, aproximadamente, del 54%, el conjunto de 537 transferencias embrionarias correspondientes al grupo del 6% de oxígeno y el de 623 transferencias del grupo de concentración de oxígeno atmosférico, la potencia estadística para detectar un 10% de diferencia entre métodos de cultivo, con un nivel de significatividad del 5%, se sitúa en el 93,3%. Por lo que añadiendo los nuevos casos se aumenta bastante la potencia estadística del estudio.

También se ha realizado el cálculo de la potencia estadística del estudio considerando la tasa de RNV por ciclo para los datos aleatorizados. Con una tasa de RNV de aproximadamente un 35%, un tamaño de muestra de 564 ciclos en el grupo de 6% de oxígeno y 561 ciclos en el grupo de 20% de oxígeno, para detectar una diferencia del 5% en una prueba de contraste de proporciones bilateral con un nivel de significatividad del 5% la potencia estadística se sitúa en un 43.3%. Si realizamos el mismo cálculo pero esta vez se calcula por transferencia embrionaria, con una tasa de aproximadamente un 38% de tasa de

RNV por transferencia embrionaria, un tamaño de muestra de 514 transferencias embrionarias en 6% de oxígeno y 499 transferencias embrionarias en 20% de oxígeno, para detectar un 5% de diferencia en la tasa de RNV, la potencia se sitúa 38,4%.

Se han realizado los mismos cálculos de potencia estadística esta vez para los datos completos, es decir, los cálculos de los datos aleatorizados más los datos que se añadieron posteriormente. Por ciclo iniciado, con una tasa de RNV por ciclo del 35%, una muestra de 571 ciclos en el grupo del 6% de oxígeno y 659 ciclos en el grupo del 20% de oxígeno, para detectar una diferencia del 5% en la tasa de RNV en una prueba de contraste de proporciones bilateral con un nivel de significatividad del 5%, la potencia estadística se sitúa en un 46,4%. Por transferencia embrionaria, la tasa de RNV es del 38%, un tamaño de muestra de 537 transferencias embrionarias en el grupo del 6% y 623 transferencias embrionarias en el grupo del 20%, para detectar una diferencia del 5%, la potencia estadística se sitúa en el 42,7%.

Las donantes de ovocitos fueron mujeres jóvenes de entre 18-35 años, con fertilidad probada (con hijos/embarazos de los ciclos de donación o hijos propios) y con un estado de salud general óptimo. Una vez fecundados, fecundación mediante Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI). Los preembriones generados se ponen en cultivo embrionario hasta día 3 de desarrollo en dos tipos de cultivo diferente (composición de gases):

- Cultivo en 5.5% CO₂, 6% O₂, 88.5% N₂
- Cultivo en 5.5% CO₂ y 20% O₂ en aire.

La transferencia de los preembriones se realizó en día 3 de desarrollo embrionario y se transfirieron siempre 1 o 2 preembriones según indicación clínica y voluntad de la paciente.

La aleatorización de la asignación de las pacientes se realiza mediante un programa informático (Comando `randseq` simple de Stata® 13.1, StataCorp LP), que genera una secuencia aleatoria 1:1. Se trata de una aleatorización total, finalmente se obtendrán el mismo número de pacientes en ambos grupos de estudio. La aleatorización y asignación de las pacientes a los dos grupos la llevaron a cabo los embriólogos de la clínica y no lo comunicaron al resto del equipo investigador ni a las pacientes (control del sesgo de selección).

El seguimiento de las pacientes fue uniforme (en ambos grupos) y completo (desde la asignación de los preembriones al grupo de estudio hasta el nacimiento de los recién nacidos vivos). Desde los datos sobre la morfología embrionaria (valorada por los embriólogos de la clínica IVI) hasta los datos sobre tasa de implantación y embarazo se obtuvieron del programa de gestión clínica del centro IVI de Valencia. Se valoraron los efectos adversos que se puedan producir durante el seguimiento (embarazos bioquímicos, ectópicos, abortos, problemas de salud/complicaciones del embarazo de la madre como por ejemplo la eclampsia).

Las pacientes se sometieron a prueba de embarazo a las 2 semanas postransferencia embrionaria (determinación de β -hCG en orina o sangre). A las 6-7 semanas postransferencia se realizará ecografía transvaginal para confirmar embarazo (observación del saco gestacional y latido fetal). Ecografía a las 12 semanas para confirmar embarazo evolutivo. Y controles ecográficos a las 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 semanas de gestación. Los datos perinatales del recién nacido vivo se obtuvieron en el centro donde se

tuvo lugar el parto de la paciente el mismo día del nacimiento. Las pérdidas durante el seguimiento se cuantificaron para que fueran equilibradas entre ambos grupos.

Para la recogida de los datos perinatales/neonatales se contactó a los centros, se les comunicó que se debe enviar el informe médico del recién nacido para poder obtener los datos de las variables que se analizarán en el estudio, el ginecólogo titular de la paciente se encargará de incorporar los datos al mismo programa de gestión clínica.

Todos los datos se exportaron a una base de datos que posteriormente se depurará mediante el programa Stata® 13.1 (StataCorp LP).

4.2. Descripción de las variables

a. Las variables obstétricas que se definieron fueron:

- Número de ciclos en fresco con transferencia embrionaria (TE): el número de ciclos en los que ha habido transferencia embrionaria con preembriones en fresco.
- β -HCG positiva/TE: prueba β -hCG positiva (al menos 50 IU/2 semanas postransferencia embrionaria) por transferencia embrionaria.
- Gestación clínica/TE: presencia de saco gestacional y latido cardíaco confirmado por ecografía transvaginal a las 6-8 semanas de gestación por transferencia embrionaria por transferencia embrionaria.
- Gestación evolutiva/TE: embarazo viable después de 12 semanas de gestación por transferencia embrionaria.
- Aborto/TE: Pérdida de la gestación por transferencia embrionaria.
- Aborto bioquímico/TE: pérdida de la gestación posterior a la determinación β -hCG positiva, es decir evolución negativa del aumento de la hormona de embarazo (β -hCG). Pérdida de la gestación anterior a la primera ecografía donde se establece la gestación clínica.
- Aborto clínico/TE: pérdida de la gestación a partir de un embarazo clínico que tiene lugar entre el diagnóstico del embarazo y las 20 semanas completas de edad gestacional.
- Reducción saco gestacional/TE: reducción de sacos gestacionales en la misma gestación por transferencia embrionaria.
- RNV/TE: Recién nacido vivo por transferencia embrionaria.
- RNV/Ciclo iniciado (ITT, *Intention To Treat*): Recién nacido vivo por ciclo iniciado.
- Número de preembriones transferidos por TE: Número de preembriones que se transfieren en la misma transferencia embrionaria.
- Número de Recién nacidos vivos (RNV) por TE: Número de RNV en el parto por transferencia embrionaria.

Las variables de muerte fetal (muerte del feto posterior a las 24 semanas de gestación) y embarazos extrauterinos (que se deben interrumpir por hallarse fuera de la cavidad uterina) no se han incluido en el estudio por tener muy pocos casos en los diferentes grupos de estudio, por lo tanto se han despreciado.

b. Las variables neonatales o perinatales que se definieron fueron:

- Relación de sexo de los recién nacidos: proporción de recién nacidas femeninas.
- Edad gestacional (EG): se escogió como referencia el día de obtención de los ovocitos como día 14 del ciclo. Se definirán las siguientes variables:
 - ❖ Muy prematuro: nacido antes de las 32 semanas de gestación.
 - ❖ Prematuro: nacido antes de las 37 semanas de gestación.
- Peso: El peso de los recién nacidos se recogió en gramos (g). El peso de los niños nacidos de embarazos únicos se trató de forma independiente de los niños que provienen de embarazos gemelares. Posteriormente se clasificarán según este peso en:
 - ❖ Peso muy bajo (PMB): <1500 g.
 - ❖ Peso bajo (PB): <2500 g. Entre los que diferenciamos lo que son de bajo peso a término (PBT), es decir que pesan menos de 2500 g y han nacido después de las 37 semanas.
 - ❖ Peso alto (PA): >4500 g.
- Peso por edad gestacional (percentiles): basado en la media de peso de la población de referencia de niños nacidos para la misma edad gestacional y sexo. Se definirán las siguientes variables:
 - ❖ Muy pequeño para su edad gestacional (MP): < percentil 3.
 - ❖ Pequeño para su edad gestacional (P): < percentil 10.
 - ❖ Grande para su edad gestacional (G): > percentil 90.
 - ❖ Muy grande para su edad gestacional (MG): >percentil 97.
- Z-score: puntuación basada en el percentil de peso ajustado por sexo, edad gestacional y media española.
- Talla al nacer (cm).
- Disparidad entre peso de los recién nacidos de embarazos gemelares (g).
- Perímetro craneal (cm).
- Malformaciones congénitas: Presencia de algún tipo de malformación anatómica/fisiológica de los RNIV. Tanto las malformaciones menores como mayores.
- Test de Apgar a los 1, 5 y 10 minutos.

Potenciales variables confundidoras o modificadoras del efecto: IMC, edad, número de tratamientos de TRA previos, conductas adictivas (consumo de tabaco y alcohol) de la paciente (receptora), número de preembriones transferidos, casos de esterilidad en el que interviene un factor masculino grave (concentración de espermatozoides < de 5 millones/ml).

4.3. Antropometría en niños recién nacidos

En términos de comparación, los índices antropométricos mayormente utilizados para evaluar el crecimiento de un niño fueron:

- Peso por altura (weight-for-height).
- Peso por edad (weight-for-age).
- Altura por edad (height-for-age).

Aunque podemos enumerar otros menos comunes: como el perímetro craneal.

Estandarización de medidas antropométricas:

En la práctica médica es habitual recurrir a las curvas patrón de crecimiento, actualmente ajustadas a la población objetivo. Sin embargo, cuando disponemos de una base de datos específica y con el fin de unificar criterios entre estudios, lo adecuado es recurrir a una estandarización de las medidas analizadas.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los índices de comparación más utilizados son: los *Z-scores*, los percentiles y las desviaciones de la mediana. Sin embargo, el *Z-score* se reconoce como la mejor fórmula para la comparación de medidas antropométricas.

El *Z-score* es el número de desviaciones típicas que, en una distribución normal, nos alejamos de la media.

El *Z-score* responde a la siguiente formulación:

$$Z = \frac{\text{Valor observado} - \text{Media de referencia}}{\text{Desviación estándar de referencia}}$$

Para $Z=-3$, por ejemplo, quiere decir que la observación se encuentra a 3 desviaciones típicas por debajo de la media dentro de la población de referencia. De modo que, al ser una medida adimensional adquiere el carácter de valor estandarizado. Esto nos permite poder comparar valores que pertenecen a grupos poblacionales diferentes, como puede ser, el peso de recién nacidos.

4.3.1. Cálculo de los percentiles por edad gestacional de los recién nacidos

El cálculo de los percentiles se basó en la media de peso de la población de referencia de niños nacidos para la misma edad gestacional y sexo. Estos percentiles nos permitieron clasificar los niños nacidos según si son grandes o pequeños para su edad gestacional.

Para el cálculo de los percentiles hemos utilizado el programa informático on-line gratuito GROW (*Gestation Related Optimal Weight*) software de la página Gestacion Network del Perinatal Institute (www.gestation.net).

La calculadora de percentiles utilizada se llama *Bulk centile calculator* (BCC), que genera percentiles múltiples para fines de investigación o auditoría. Se ha lanzado una nueva versión (v8.0.1), desarrollada en formato de hoja de cálculo Excel para más de 120 países, grupos étnicos y regiones.

La BCC se deriva de una base de datos internacional con más de 3 millones de nacimientos anónimos de 25 países e incluye 104 grupos étnicos o países de origen en los se incluye España. Se

analizaron cada uno de ellos para obtener una constante (peso esperado al nacer a los 280 días) y coeficientes de altura y peso maternos, paridad y sexo, utilizando técnicas de regresión múltiple.

El software permite la generación de estándares individuales o 'personalizados' mediante el ajuste de los factores fisiológicos que se sabe que influyen en el crecimiento fetal. Las características del embarazo se incorporan para calcular el peso óptimo a término (*Term Optimal Weight*, TOW). Este es el peso que se prevé que alcance el RNV en ausencia de patologías. El cálculo de TOW se centra en 40.0 semanas (280 días).

A través de este punto TOW, se traza la curva de proporcionalidad para delinear cómo se espera que se alcance este peso en un embarazo normal. Esto proporciona una curva de peso óptimo en la gestación (GROW) ajustada individualmente. Alrededor de esta línea óptima, se puede calcular la variación normal y se pueden dibujar límites tales como las líneas del percentil 10 y 90. Así, los pesos neonatales de embarazos previos, así como las mediciones de la altura del fondo uterino o las estimaciones del peso fetal en el embarazo actual, se pueden ver en relación con los límites de peso óptimo ajustados individualmente.

Cálculo del TOW: Los principales factores no patológicos que afectan el peso al nacer son: la edad gestacional, la altura materna, el peso materno en la primera visita ginecológica, la paridad y el grupo étnico (Gardosi, Chang, Kalyan, Sahota, & Symonds, 1992). El sexo del feto/neonato, cuando se conoce, también puede servir como factor de ajuste. Los coeficientes para ajustar estas variables se derivaron originalmente de un conjunto de datos de aproximadamente 30000 ecografías de partos. Permiten el cálculo de un peso al nacer esperado para cada embarazo y el percentil 'personalizado' de un peso particular.

En las versiones anteriores al 2009, el ajuste por peso materno se realizó dentro de los límites de IMC de 20-30 solamente. Sin embargo, en las versiones actuales del software, el ajuste se realiza sólo para excluir valores extremos, definidos como fuera del rango de IMC de 15-50, ya que se ha visto que con estos límites la asociación entre RNV pequeños para Edad Gestacional (PEG) y mortalidad perinatal es más fuerte.

Otras variables fisiológicas como la altura paterna tienen, a menos que sean extremas, un efecto relativamente menor (Wilcox, Newton, & Johnson, 1995) y, en cualquier caso, no siempre se conocen con certeza. La edad materna generalmente parece no jugar un papel significativo una vez que se ajusta la paridad.

También se sabe, que los factores patológicos como el tabaquismo, la privación social, la preeclampsia o la diabetes están relacionados con el peso al nacer, pero no están ajustados. El propósito es calcular el TOW como un estándar ideal, contra el cual se puede evaluar el peso real fetal o neonatal. Los factores de riesgo deben usarse como indicaciones clínicas para aumentar la vigilancia. TOW se centra en el día 280 de gestación, la mediana y la duración modal del embarazo en nuestra población.

Coefficientes para el ajuste del TOW: Los coeficientes se derivan de bases de datos adecuadas utilizando un modelo de regresión múltiple centrado en una edad gestacional estándar (280 días), el grupo étnico más grande, la estatura y el peso maternos promedio y paridad. Además, si se sabe el sexo del

RNV, se puede ajustar por él. El modelo de regresión tiene una constante a la que se agrega o resta cada una de las variables (coeficiente multiplicado por un valor). Por ejemplo, en el caso del sexo del feto se puede sumar +58,4 g en el caso de que sea masculino y -58,4 g en el caso que sea femenino (también se pueden omitir algunas variables). Otro ejemplo sería la paridad, si es el primer parto el término parao de la ecuación se anula, par=0. La fórmula es la siguiente:

$$\mathbf{TOW = Loc + ht_{ao} + wt_{ao} + eth_{ao} + parao + sex_{ao}}$$

Loc = *Location constant*, Constante en g que depende del lugar de nacimiento.

Constante española= 3429 g.

ht= *maternal height*, altura materna.

wt= *maternal weight*, peso materno (primera visita).

eth= *ethnicity*, origen étnico.

par= *parity*, paridad (número de neonatos).

sex= *sex of neonate*, sexo del neonato (si se conoce).

Curva de proporcionalidad (GROW): Una vez que se calcula el TOW se combina con una función de crecimiento de proporcionalidad para determinar el peso óptimo en todas las gestaciones. Esta función transforma los pesos promedio en todas las gestaciones en un porcentaje del peso del término en esa población. El principio de proporcionalidad puede usarse retrospectivamente (cuando ya sabes el peso del RNV al nacer) o bien proyectar el peso fetal para predecir el peso al nacer (Gardosi, Mongelli, Wilcox, & Chang, 1995; Mongelli & Gardosi, 1996).

Revisando las fórmulas que existen publicadas para el aumento de peso fetal se ha visto que la mayoría sigue un patrón similar aunque los resultados (pesos a término) pueden variar. Nuestra fórmula estándar es derivada de la ecuación de peso fetal de Hadlock que refleja de cerca el peso fetal normal en otras poblaciones (Hadlock, Harrist, & Martinez-Poyer, 1991). La ecuación de proporcionalidad es:

$$\mathbf{GA > 25: \% \text{ de peso} = 299.1 - 31.85 GA + 1.094 GA^2 - 0.01055 GA^3}$$

$$\mathbf{GA < 25: \% \text{ de peso} = -5.86048381 + 1.419180433 GA - 0.116517911 GA^2 + 0.004154453 GA^3}$$

GA (*Gestational Age*): es la edad gestacional entre 20 y 42 semanas.

Por lo tanto, para cada TOW predicho individualmente, la fórmula produce el peso relativo óptimo de la gestación GROW (*Gestational Related Optimal Weight*). La proporcionalidad de la ecuación es del 100.3% cuando la Edad Gestacional es de 40 semanas.

Los límites normales de peso para todas las gestaciones se calculan a partir del Coeficiente de Varianza (CV) del TOW. Se define como: de DE (Desviación Estándar) y la media (Constante) de la población del modelo de regresión, y definido como:

$$CV (\%) = \frac{DE \times 100}{Media}$$

DE: Desviación Estándar

Media: Constante de la población del modelo de regresión

Los límites de los percentiles se calculan con el valor Z. Por ejemplo, los percentiles 90 y 10 tienen un valor Z = ± 1.28.

Por lo tanto:

$$\text{Percentil 90} = \text{TOW} + Z \cdot \text{CV}$$

$$\text{Percentil 10} = \text{TOW} - Z \cdot \text{CV}$$

Finalmente se utilizó la calculadora de percentiles BCC, en formato de hoja de cálculo para permitir el cálculo de bases de datos completas. Esta calculadora permite determinar un percentil personalizado de peso para la edad gestacional en RNV, para pesos fetales estimados y peso al nacer en el embarazo actual.

Se debe introducir la edad gestacional precisa, en el momento del nacimiento del RNV o en el momento de la medición del peso fetal estimado (*Estimated Fetal Weight*, EFW). En la misma página web existe una calculadora para realizar el cálculo del EFW. De la misma manera la edad gestacional se puede calcular mediante otra calculadora que existe en la misma página web.

La BCC se puede utilizar cuando se desconoce el sexo del bebé. Cuando no tenemos otras variables, como podría ser la altura materna se puede introducir un valor estimado o promedio poblacional. En la BCC, esto se hace automáticamente cuando se omite una variable.

4.3.2. Estandarización de los percentiles mediante Z-score

Finalmente, el valor del percentil de un recién nacido con un peso específico y, en definitiva, del Z-score personalizado viene dado por:

$$Z = \frac{\text{bwt} - \text{GROW}}{\text{LocSD}}$$

Bwt= *Livebirth weight*, peso del recién nacido

LocSD= *Location Standart Deviation*, desviación estándar de la población de recién nacidos en función del lugar de nacimiento.

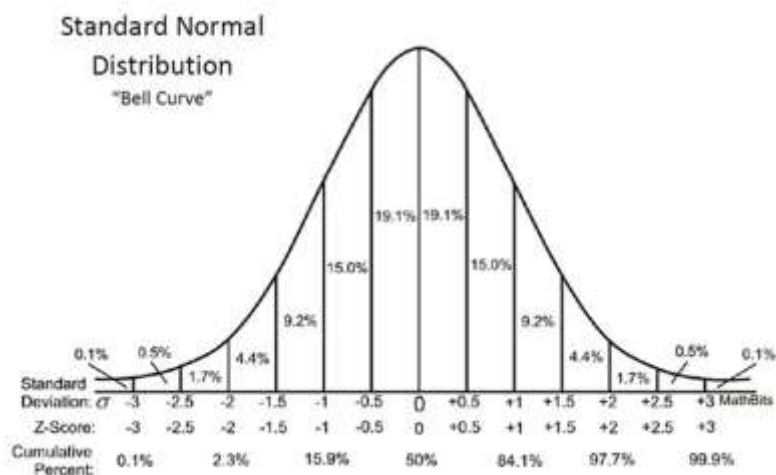


Ilustración 3 Distribución normal de los datos

Por lo que la comparación de esta medida de los diferentes niños del estudio nos da un valor estandarizado de los pesos no sesgado por ningún otro parámetro e informa sobre si el cultivo

embrionario en diferentes tensiones de oxígeno está afectando a los resultados (pesos) de los recién nacidos.

4.4. Análisis estadístico

4.4.1. Análisis estadístico por objetivos del estudio

El análisis de los datos para la tasa de RNV se realizó bajo el principio de intención de tratamiento (*Intention To Treat*, ITT), es decir, por ciclo iniciado y también por transferencia embrionaria.

Debido a la existencia de dos tipos de poblaciones en el estudio, se ha realizado un análisis de homogeneidad de diferentes parámetros de las receptoras (pacientes) para constatar que no difieren en las principales características, que podrían actuar como factores de confusión. Estos factores son características como la edad, el IMC (Índice de Masa Corporal) y otros datos pretratamiento y de cirugías durante el embarazo. Para la Edad y el IMC, aplicamos el test de *Shapiro-Wilk* para evaluar la normalidad del conjunto de datos (saber si los datos siguen una distribución normal). Posteriormente, se aplicó una prueba no paramétrica llamada *Mann-Whitney* (al comprobar que la distribución de los datos no seguía una distribución normal). Se trata de una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es la versión no paramétrica de la habitual prueba t de *Student*. Para los demás datos se aplica la prueba exacta de *Fisher* ya que se trata de variables categóricas binarias.

Como se ha comentado previamente se han añadido nuevos datos de más ciclos de ovodonación que van desde Abril del 2012 hasta Junio del 2017, estos datos no eran datos aleatorizados. Pero para comprobar que podían añadirse al estudio se realizó un análisis de homogeneidad de los datos. En el caso de las variables de Edad e IMC de las pacientes, se realiza con los mismos test que se ha comentado anteriormente y para los datos gestacionales se aplica test exacto de *Fisher* al tratarse de variables categóricas binarias.

Para el análisis de las variables categóricas binarias correspondientes a los datos gestacionales se presentan como porcentajes. Para el cálculo de los Riesgos Relativos se ha considerado como grupo de referencia o de no expuestos al grupo de embriones cultivados en tensión de oxígeno atmosférica (20%). Para evaluar la significación de estas variables se analizaron mediante la prueba exacta de *Fisher*. Las variables cuantitativas se presentaron como medias y junto con la desviación estándar, éstas se compararon mediante t de *Student*. Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0.05$ (prueba de significación).

La regresión de *Poisson*, se ha utilizado para realizar una predicción de las tasas de éxito gestacional según el número de transferencias embrionarias que se realizan. El modelo de regresión de *Poisson* es un modelo de regresión que se utiliza para datos de conteo (en el siguiente punto se amplía la explicación de la utilización de este modelo).

Para el análisis de las variables correspondientes a los RNV (neonatales) se realizaron dos grupos de estudio: los RNV que provenían de embarazos gemelares se trataron de forma independiente de los RNV de embarazos únicos, debido a las propias características de los recién nacidos. Las variables cuantitativas se presentaron como medias y la desviación estándar, éstas se compararon mediante t-

Student. Las variables categóricas se presentan en porcentajes y se analizó su significación mediante test exacto de Fisher. Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

4.4.2. Predicción de éxito de las tasas obstétricas acumuladas mediante Poisson

Como se ha comentado previamente se utilizó de un modelo de regresión de *Poisson* para calcular el éxito gestacional por número acumulado de transferencias embrionarias.

El objetivo de los modelos de regresión de *Poisson* planteados es explicar las probabilidades de éxito gestacional respecto el número de transferencias realizadas. Se considerarán las siguientes variables de éxito gestacional:

- Gestación bioquímica.
- Gestación clínica.
- Gestación evolutiva.
- Aborto.
- Aborto bioquímico.
- Aborto clínico.
- RNV (Recién Nacido Vivo).

Todas ellas con función de distribución binomial.

En el número de transferencias embrionarias se considera el fresco como primera transferencia y se van añadiendo las transferencias de preembriones desvitrificados asociados a dicho ciclo en fresco. Por tanto, el análisis realizado se establece por ciclo iniciado de cada paciente.

Así pues, los ciclos se han considerado independientes entre sí a pesar de la presencia de pacientes que han iniciado más de un ciclo. Esto se justifica:

- El número de ciclos adicionales iniciados por una misma pacientes se sitúa en el 4% del total de ciclos en fresco. Por lo que el efecto de variabilidad intrapaciente se considera despreciable respecto el total de la muestra.
- Este número de pacientes no justifica la necesidad de utilizar un modelo de regresión más complejo que nos asegure un ajuste más preciso.

4.5. Protocolos de estimulación ovárica de las donantes y preparación endometrial para las receptoras

El protocolo para la Hiperestimulación Ovárica Controlada (HOC) para las donantes de ovocitos consistió en una dosis diaria de un agonista de GnRH (Decapeptyl, 0.1 mg; Ipsen Pharma, Barcelona, Spain) en la fase lútea después de la menstruación.

La estimulación ovárica se inició con 225 IU de FSH/día de FSH recombinante (Gonal F Merck-Serono; Barcelona España o Puregon; Shering Plough Madrid España) o HMG (Menopur Ferring Pharmaceutical Madrid, España). La dosis diaria se ajustó a la respuesta ovárica de la paciente. La

estimulación se prolongó hasta que el diámetro medio de los folículos principales fue de 18 mm. Para inducir la ovulación se administró la gonadotropina coriónica humana recombinante (Ovitrelle Merk Serono) y se procedió a la recuperación del ovocito 36 h más adelante. Las donantes (anónimas) fueron emparejadas con las receptoras del ovocito según fenotipo y grupos de la sangre. Para la donación de ovocitos se utilizaron tanto ovocitos frescos como ovocitos vitrificados.

El protocolo para la preparación endometrial fue diferente dependiendo de la presencia o de la ausencia de función ovárica. Las mujeres con baja función ovárica fueron reguladas en la fase lútea con una dosis única del agonista de GnRH (Decapeptyl 3075 mg, Ipsen Pharma o Gonapetyl 3.75 Ferring). Después de la menstruación, todos los sujetos recibieron valerato de estradiol oral (VE) (Progynova, Schering Spain, Madrid) con una dosis diaria de 2 mg, que se incrementó a 6 mg. Después de un máximo de 30 días de la administración de VE, los niveles del suero E2 (Estradiol) y el grosor del endometrio fueron determinados. Si los niveles de E2 eran superiores a 150pg/ml y se confirmaba el patrón trilaminar del endometrio, se administraba la progesterona micronizada (P4) (800 mg/día, por vía vaginal; Progeffik; Laboratorios Effik) el día de la fecundación después de la donación de ovocitos.

Condiciones de cultivo de ovocitos y preembriones

Cuatro horas después de la recuperación de ovocitos, o dos horas después de la desvitrificación de los ovocitos, se inyectaron ovocitos como se ha descrito previamente mediante ICSI (Rubio, Minguez, De Los Santos, Ruiz, & Romero, 1997). El ICSI fue realizado con un microscopio con aumento 400X (1X7 Olympus[®]). Basándose en el grupo de asignación, tanto los ovocitos inyectados como los preembriones fueron cultivados en gotas de 50 μ L, bajo el aceite de Sydney FIV medio de división (Cook), que había sido previamente equilibrado durante la noche en las mezclas de gas respectivas. Posteriormente, se incubaron en los incubadores Sanyo MCI 5M, fijados en O₂ del 6% o del 20%. Para reducir al mínimo el número de aberturas de la puerta del incubador, no más coexistieron más de dos pacientes por incubador. La difusión de oxígeno a través de a través de la capa de aceite mineral y posteriormente en la gota de medio donde se encuentra el preembrión es proporcional a la concentración de oxígeno que existe en el ambiente materno. Cuando existe una concentración de 20% de O₂ en el incubador, la concentración esperada en el medio de cultivo es de 0,21 mM (Trimarchi, Liu, Porterfield, Smith, & Keefe, 2000) mientras que con un 6% de O₂ ésta sería de 60 μ M (De los Santos *et al.*, 2013). Un control de calidad externo fue realizado diariamente para las medidas del CO₂, del O₂ y de la temperatura siguiendo las directivas de estandarización ISO 9000.

4.6. Ética

El presente estudio cumple la Declaración de Helsinki (2013), cumple con todos los puntos especificados en él. Se vela por la vida, salud, dignidad, integridad, derecho de la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en la investigación (Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos). Como recoge la misma declaración, los investigadores se comprometen a seguir las normas y estándares éticos, legales y jurídicos: cumplimiento de ley RD 1090/2015 (BOE 24-XII-2015) por la que se regulan los Ensayos clínicos y que se aplica desde enero del 2016 y de la Ley de Biomedicina del 2007, Ley 14/2007 (BOE 3-VII-2007). El protocolo de investigación de este estudio fue presentado a un Comité de Ética de la Investigación (Junta de Revisión Institucional, IRB) sobre el uso de sujetos humanos en la investigación en el Instituto Valenciano de Infertilidad, para su consideración, comentario, consejo y aprobación. Este estudio es compatible con los principios éticos que se recogen en el informe Belmont. Las pacientes recibieron un Consentimiento Informado para su participación voluntaria al estudio. Se han valorado los riesgos y beneficios del estudio.

5. RESULTADOS

5.1. Resumen estudio

A continuación se puede ver un cuadro resumen de todos los datos de las pacientes que se han incluido en el estudio, este incluye tanto los datos de las pacientes del estudio previo aleatorizado como los de las pacientes añadidas posteriormente:

Resumen Tratamientos			
variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	TOTAL
Pacientes	580	676	1256
Ciclos de ovodonación	571	659	1230
Transferencia embrionaria en fresco	537	623	1160
Transferencia embrionaria postcriopreservación	471	497	968
Pacientes que repiten ciclo	32	35	67

Tabla 3 Resumen de los tratamientos del estudio

En el estudio se han incluido un total de 1256 pacientes: 580 se han incluido en el grupo de baja concentración de oxígeno (6%) y 676 en el grupo de concentración de oxígeno atmosférica (20%). De las pacientes que repiten ciclo (67 en total, 32 y 35 en el grupo del 6% y el 20% de oxígeno respectivamente), pueden haber sido aleatorizadas en el mismo grupo de estudio cuando repiten ciclo o bien haber sido aleatorizadas en el grupo contrario.

De estas pacientes un total de 1230 se han realizado ciclos de ovodonación. De éstas 571 pacientes corresponden al grupo de 6% de oxígeno y 659 del grupo de 20% de oxígeno. Esto quiere decir el número de pacientes que han iniciado un ciclo de ICSI con ovodonación.

Un total de 1160 pacientes se realizaron transferencia embrionaria en fresco, de las que 537 correspondían al grupo de 6% de oxígeno y 623 al grupo de 20% de oxígeno. Es decir, que la transferencia del preembrión tanto en estadio de 8 células (día 2-3) como de blastocisto (día 5-7) se realiza en fresco (es decir que el preembrión no ha sido criopreservado).

De las pacientes un total de 968 se realizaron transferencia embrionaria postcriopreservación, de las que 471 correspondían al grupo de 6% de oxígeno y 497 al grupo al grupo de 20% de oxígeno. La transferencia embrionaria se ha realizado una vez se ha desvitrificado los preembriones (tanto en día 2-3 como en día 5-7). La siguiente tabla muestra los datos de las pacientes correspondientes al estudio aleatorizado:

Resumen Estudio Aleatorizado			
variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	TOTAL
Ciclos de ovodonación	564	561	1125
Transferencia embrionaria en fresco	514	499	1013
Transferencia embrionaria postcriopreservación	426	367	793
Pacientes que repiten ciclo	14	17	31

Tabla 4 Resumen de los tratamientos correspondientes al Ensayo Clínico Aleatorizado (ECA)

Se debe comentar que las transferencias embrionarias postcriopreservación han aumentado respecto las publicadas en el artículo del 2013 (De los Santos *et al.*, 2013). Ya que, durante el intervalo de tiempo desde la publicación del artículo y el presente trabajo de investigación existe un número elevado de pacientes aleatorizadas que se han sometido a más transferencias embrionarias postcriopreservación.

5.2. Pruebas de homogeneidad de datos

Para poder llevar a cabo el estudio con los datos que se añadieron posteriormente para aumentar el tamaño muestral, se debieron aplicar las pruebas de homogeneidad entre los datos previos y los que se añadieron posteriormente. Se añaden un total de 105 ciclos en más de ovodonación, desde Abril del 2012 hasta Junio del 2017, de éstos se encuentran 7 se añaden al grupo de 6% de oxígeno y 98 en el grupo de 20% de oxígeno. Primero, se aplica la prueba de homogeneidad a los datos de Edad e IMC de las pacientes para poder comprobar que las pacientes que reciben los tratamientos tienen características parecidas. Se ha observado que los datos de las variables de Edad e IMC, no siguen una distribución normal que se comprueba mediante la prueba de *Kolmogórov-Smirnov* (también prueba K-S) (por ejemplo, $P=0,0055$ para los datos posteriores y $P<0,001$ para los datos previos en la variable Edad del grupo del 6% de oxígeno). Al no seguir una distribución normal se aplica la prueba no paramétrica *Mann-Whitney* para ver si existen diferencias significativas entre los datos (comprobar la homogeneidad de los datos). Como el valor de esta prueba fue superior a 0,05 significa que no se encuentran diferencias significativas entre los dos tipos de datos y que por lo tanto se puede asumir la homogeneidad de los datos (Edad e IMC de las pacientes). Como se ha comentado, los datos de la Edad y el IMC no siguen una distribución normal por eso en las tablas se ha representado la mediana y en rango intercuartílico en lugar de la media y la desviación estándar. El rango intercuartílico (RIC), es el rango (diferencia) entre el primer cuartil (o el valor de la variable donde se encuentra el 25% de los datos) y el tercer cuartil (o el valor de la variable donde se encuentra el 75% de los datos).

EDAD [O₂ 6%]				
variables	N	Mediana	RIC	K-S test
Datos posteriores	88	41	[37,8; 44]	0,006*
Datos previos	492	41	[38; 43]	< 0,001*
<i>Mann-Whitney U test</i>	p= 0,41			

Tabla 5 Homogeneidad de los datos de la variable Edad para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test

EDAD [O₂ 20%]				
variables	N	Mediana	RIC	K-S test
Datos posteriores	196	41	[38; 43]	< 0,001*
Datos previos	480	42	[38; 44]	< 0,001*
<i>Mann-Whitney U test</i>	p= 0,88			

Tabla 6 Homogeneidad de los datos de la variable Edad para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test

RESULTADOS

Se puede observar que existe tal homogeneidad de los datos, para estas variables viendo los siguientes histogramas y diagramas de cajas. Ya que, podemos observar que la mediana para cada variable (IMC y Edad) se sitúa casi de forma idéntica para los dos tipos de datos: previos y posteriores, (véase ilustraciones 4 y 5).

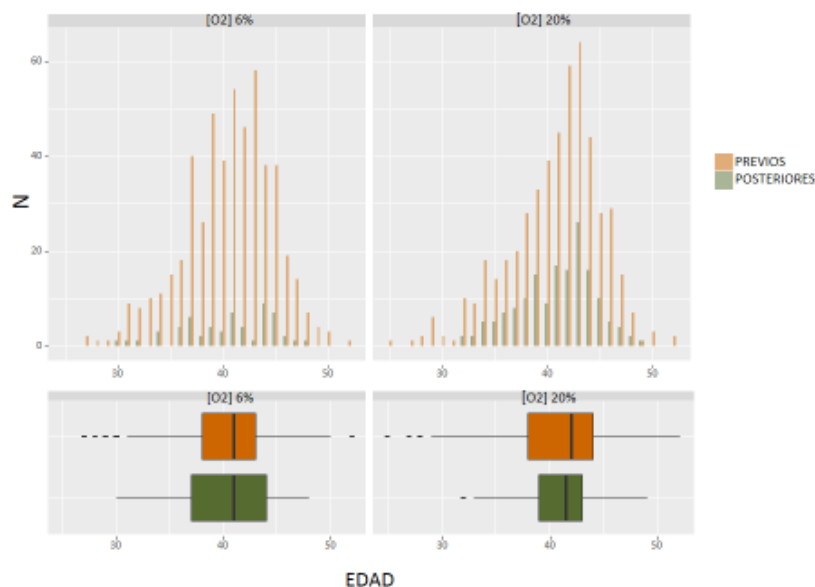


Ilustración 4 Histogramas y diagramas de caja para la distribución de la Edad para los datos previos y posteriores

IMC [O ₂ 6%]				
variables	N	Mediana	RIC	K-S test
Datos posteriores	88	23,2	[21,1; 25,7]	0,02*
Datos previos	492	22,4	[20,7; 25]	< 0,001*
<i>Mann-Whitney U test</i>	p= 0,17			

Tabla 7 Homogeneidad de los datos de la variable IMC para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test

IMC [O ₂ 20%]				
variables	N	Mediana	RIC	K-S test
Datos posteriores	196	22.7	[20,8; 25,2]	< 0,001*
Datos previos	480	23.3	[20,8; 25,6]	< 0,001*
<i>Mann-Whitney U test</i>	p= 0,31			

Tabla 8 Homogeneidad de los datos de la variable IMC para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test

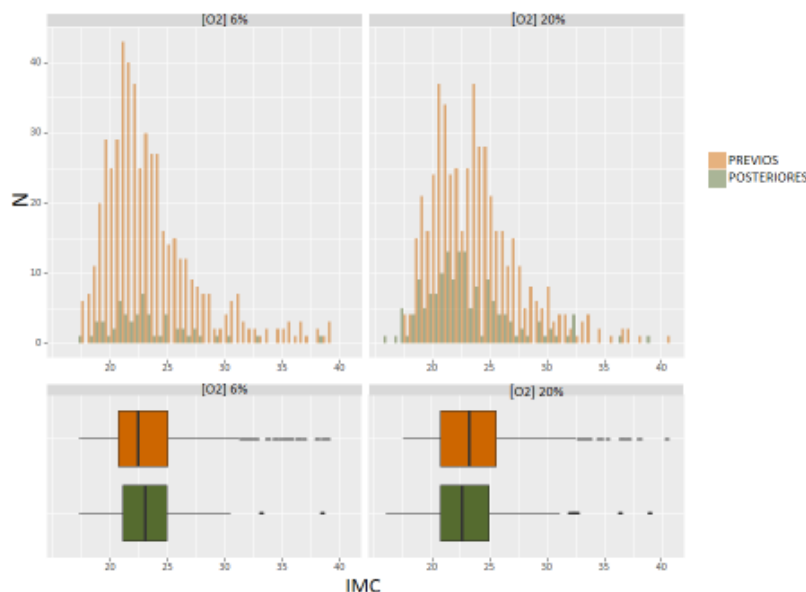


Ilustración 5 Histogramas y diagramas de caja para la distribución de la IMC para los datos previos y posteriores

Cuando se comparan los datos gestacionales u obstétricos entre los datos previos y los posteriormente añadidos se puede observar que se añaden 147 datos nuevos. De estos datos, 23 corresponden al grupo de concentración de oxígeno del 6% y 124 al grupo de concentración de oxígeno del 20%. Por ejemplo, en el caso de la variable β -hCG positiva (confirmación de gestación) en el grupo del 6% de oxígeno existen 23 datos posteriores de los que un 60,87% tiene resultado positivo para esta variable y 514 datos previos en los que existe un 61,87% de resultados positivos para la misma variable (β -HCG positiva). En las tablas, se muestran también los Riesgos Relativos (RR) con su correspondiente intervalo de confianza del 95% (IC 95%), para el cálculo de los RR se toma como referencia el grupo de datos previos.

Los Riesgos Relativos son una medida de asociación entre el grupo expuesto y el no expuesto, en este caso nosotros escogemos como grupo no expuesto o de referencia el grupo de los datos previos. Por ejemplo, en el caso de la tasa de β -HCG positiva, se ha observado que en los datos posteriores para el grupo de los datos de 6% de oxígeno hay 0,98 veces menos tasa de β -HCG positiva que en los datos previos ($60,87/61,87= 0,98$). En este caso para comprobar la homogeneidad de los datos se realiza mediante el test exacto de *Fisher*.

Como no hubieron diferencias significativas para ninguna de las variables gestacionales analizadas entre los datos previos y los posteriores, se pudieron incluir los datos posteriores a los datos previos del estudio y así aumentar el tamaño muestral y la potencia estadística del estudio (véase tablas 9-22).

β-HCG positiva [O₂ 6%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	23	14 (60,9%)	9 (39,1%)		
Datos previos	514	318 (61,9%)	196 (38,1%)	0,98 [0,7; 1,37]	1

Tabla 9 Homogeneidad de los datos de la variable β-HCG positiva para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno

β-HCG positiva [O₂ 20%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	124	79 (63,7%)	45 (36,3%)		
Datos previos	499	303 (60,7%)	196 (39,3%)	1,05 [0,9; 1,22]	0,61

Tabla 10 Homogeneidad de los datos de la variable β-HCG positiva para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica

Gestación clínica [O₂ 6%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	23	12 (52,2%)	11 (47,8%)		
Datos previos	514	276 (53,7%)	238 (46,3%)	0,97 [0,65; 1,45]	1

Tabla 11 Homogeneidad de los datos de la variable gestación clínica para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno

Gestación clínica [O₂ 20%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	124	73 (58,9%)	51 (41,1%)		
Datos previos	499	263 (52,7%)	236 (47,3%)	1,12 [0,94; 1,32]	0,23

Tabla 12 Homogeneidad de los datos de la variable gestación clínica para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica

Gestación evolutiva [O₂ 6%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	23	10 (43,5%)	13 (56,5%)		
Datos previos	514	233 (45,3%)	281 (54,7%)	0,96 [0,60; 1,54]	1

Tabla 13 Homogeneidad de los datos de la variable gestación evolutiva para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno

Gestación evolutiva [O₂ 20%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	124	57 (46,0%)	67 (54,0%)		
Datos previos	499	227 (45,5%)	272 (54,5%)	1,01 [0,82; 1,25]	1

Tabla 14 Homogeneidad de los datos de la variable gestación evolutiva para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica

Aborto [O₂ 6%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	23	4 (17,4%)	19 (82,6%)		
Datos previos	514	86 (16,7%)	428 (83,3%)	1,04 [0,42; 2,59]	1

Tabla 15 Homogeneidad de los datos de la variable aborto para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno

Aborto [O ₂ 20%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	124	22 (17,7%)	102 (82,3%)		
Datos previos	499	75 (15,0%)	424 (85,0%)	1,18 [0,77; 1,82]	0,49

Tabla 16 Homogeneidad de los datos de la variable aborto para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica

Aborto bioquímico [O ₂ 6%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	23	2 (8,7%)	21 (91,3%)		
Datos previos	514	43 (8,4%)	471 (91,6%)	1,04 [0,27; 4,03]	1

Tabla 17 Homogeneidad de los datos de la variable aborto bioquímico para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno

Aborto bioquímico [O ₂ 20%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	124	6 (4,8%)	118 (95,2%)		
Datos previos	499	41 (8,2%)	458 (91,8%)	0,59 [0,26; 1,36]	0,26

Tabla 18 Homogeneidad de los datos de la variable aborto bioquímico para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica

Aborto clínico [O ₂ 6%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	23	2 (8,7%)	21 (91,3%)		
Datos previos	514	36 (7%)	478 (93%)	1,24 [0,32; 4,84]	0,67

Tabla 19 Homogeneidad de los datos de la variable aborto clínico para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno

Aborto clínico [O ₂ 20%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	124	14 (11,3%)	110 (88,7%)		
Datos previos	499	31 (6,2%)	468 (93,8%)	1,82 [1; 3,31]	0,08

Tabla 20 Homogeneidad de los datos de la variable aborto clínico para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica

Recién Nacido Vivo (RNV) [O ₂ 6%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	23	9 (40,9%)	13 (59,1%)		
Datos previos	514	198 (41,3%)	281 (58,7%)	0,99 [0,59; 1,65]	1

Tabla 21 Homogeneidad de los datos de la variable RNV para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno

Recién Nacido Vivo (RNV) [O ₂ 20%]					
variables	N	SI	NO	RR [IC 95%]	p
Datos posteriores	124	52 (43,7%)	67 (56,3%)		
Datos previos	499	169 (38,2%)	273 (61,8%)	1,14 [0,9; 1,45]	0,29

Tabla 22 Homogeneidad de los datos de la variable RNV para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica

En cuanto a las características de las pacientes (Edad e IMC) entre ambos grupos de estudio (6% y 20% de oxígeno) se observó que los datos no seguían una distribución normal (prueba de *Kolmogórov-Smirnov*), por lo que se aplica de nuevo la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*.

Por la misma razón que se ha comentado anteriormente, en este caso también está representada la mediana y el IQR. El resultado de la prueba de *Mann-Whitney* confirmó la homogeneidad de los datos entre ambos grupos de estudio (6 y 20% de oxígeno). Como se puede ver no existen diferencias estadísticamente significativas de Edad e IMC de las pacientes entre los dos grupos de estudio, por lo que los dos grupos de pacientes son comparables entre sí en este aspecto. Se observa claramente en el diagrama de caja para ambas variables dónde la mediana de cada variable en cada grupo de estudio se sitúa casi de forma idéntica (véase ilustraciones 6 y 7).

EDAD				
variables	N	Mediana	RIC	K-S test
datos [O ₂ 6%]	589	41	[38, 44]	< 0,001*
datos [O ₂ 20%]	690	41	[38, 43]	< 0,001*
<i>Mann-Whitney U test</i>	p= 0,34			

Tabla 23 Homogeneidad de los datos de la variable Edad entre ambos grupos de estudio, K-S test: *Kolmogórov-Smirnov test*

IMC				
variables	N	Mediana	RIC	K-S test
datos [O ₂ 6%]	580	22,5	[20,8; 25.2]	< 0,001*
datos [O ₂ 20%]	679	23,1	[20,8; 25.3]	< 0,001*
<i>Mann-Whitney U test</i>	p= 0,25			

Tabla 24 Homogeneidad de los datos de la variable IMC entre ambos grupos de estudio, K-S test: *Kolmogórov-Smirnov test*

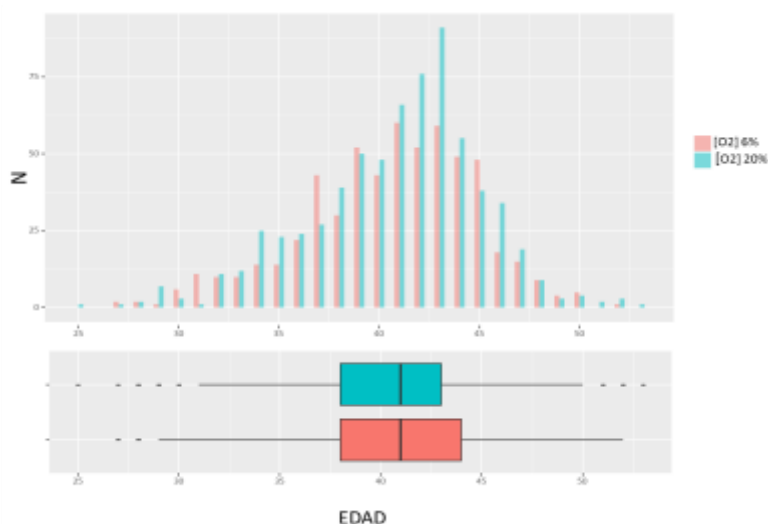


Ilustración 6 Histograma y diagramas de caja para la distribución de la Edad para los datos de ambos grupos de estudios

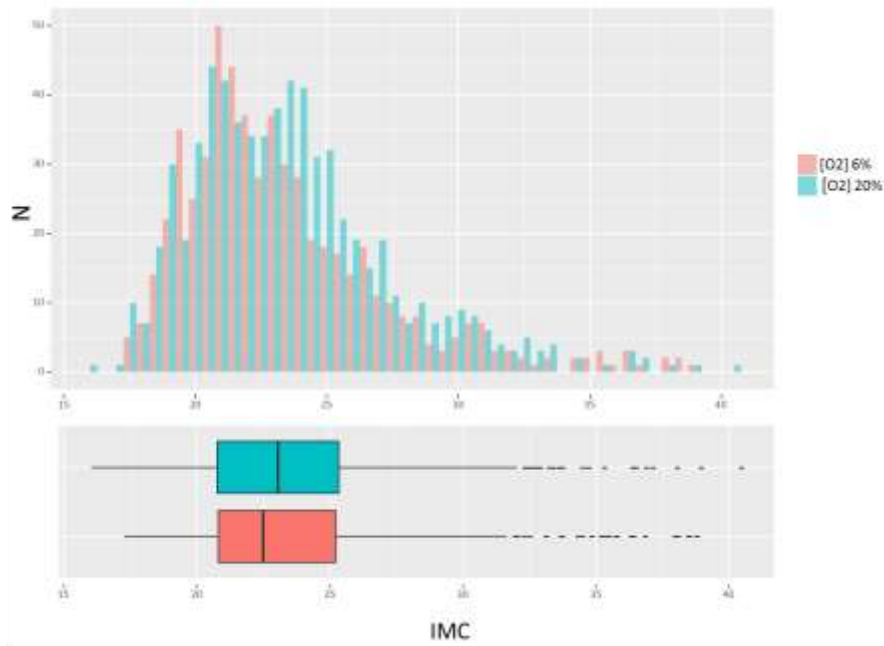


Ilustración 7 Histograma y diagramas de caja para la distribución de la IMC para los datos de ambos grupos de estudios

Para los datos pretratamiento, el análisis de homogeneidad se realiza mediante Test de *Fisher*, ya que se tratan de variables categóricas binarias. Los porcentajes están calculados sobre el número de respuestas positivas del total de respuestas para cada grupo. Por ejemplo, en el caso de número de abortos previos existen 149 respuestas válidas para la concentración de oxígeno del 6% de las cuales 48 (32,21%) de ellas son positiva (un total de 48 o un 32,21% de las pacientes de las que se tenía esta información sufrieron un aborto previo). La columna de la variable NA (no aplica) nos da el número de pacientes de las que no se dispone esta información para cada grupo, por ejemplo en el caso de abortos previos no se dispone de esta información en 440 pacientes del grupo de concentración de oxígeno del 6% y 532 pacientes del grupo del 20% de oxígeno.

También se encuentran en dicha tabla los Riesgos Relativos (RR) con su Intervalo de Confianza del 95% (IC 95%) para cada variable, para el cálculo de los RR se toma como referencia el grupo de concentración de oxígeno atmosférica (20% de O₂). Y la prueba de significación se realiza mediante test exacto de *Fisher*.

En estos datos, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la variable de partos previos dónde en el caso de la concentración de oxígeno del 6% era de un 13,24% versus a un 5,26% en la concentración de oxígeno atmosférica ($p=0,023$).

Análisis Homogeneidad variables pretratamiento					
variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	NA	RR [IC 95%]	p
Número de abortos previos	48 (32,2%)	61 (38,4%)	440 532	0,84 [0,2; 1,14]	0,28
Número de cesáreas previas	12 (8,6%)	9 (5,9%)	449 539	1,45 [0,63; 3,33]	0,50
Número de partos previos	18 (13,2%)	8 (5,3%)	453 539	2,51 [1,13; 5,6]	0,02*
Enfermedades previas	28 (20,1%)	23 (15,2%)	450 540	1,32 [0,8; 2,18]	0,28
Cirugías previas	76 (55,5%)	67 (46,2%)	452 546	1,2 [0,95; 1,51]	0,12
Medicación continuada	44 (31,9%)	40 (27,8%)	451 547	1,15 [0,8; 1,64]	0,52
Hábito de tabaco	6 (4,4%)	4 (2,7%)	452 541	1,64 [0,47; 5,7]	0,53

Tabla 25 Homogeneidad de las variables pretratamiento entre ambos grupos de estudio, NA: no aplica

5.3. Resultados de datos obstétricos

En primer lugar se realizó un análisis de algunas variables maternas pretratamiento, es decir, que alguno de los eventos (variable) que pudieran ocurrir durante las gestaciones. Este análisis se realizó para cerciorarse de que no existían diferencias entre ambos grupos de estudio, ya que pueden existir diferencias de las variables neonatales/perinatales (resultados neonatales/perinatales) de los RNV si existen diferencias entre estas variables maternas durante la gestación (variables pretratamiento maternas). Por ejemplo, está muy correlacionado el bajo peso del recién nacido con el hábito de fumar de la madre durante la gestación incluso cuando el consumo de tabaco es bajo (Berlin, Golmard, Jacob, Tanguy, & Heishman, 2017). El cálculo de los porcentajes se ha llevado a cabo como se ha mencionado anteriormente. Número de positivos sobre el número de respuestas válidas. Por ejemplo, de las 137 respuestas válidas para el hábito de tabaco en las pacientes del grupo de 6% de oxígeno, solamente un total de 6 (4,38%) eran fumadoras.

Únicamente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la concentración de proteínas en orina entre ambos grupos de estudio.

Datos maternos en gestaciones					
variables	[O ₂ 6%] Si	[O ₂ 6%] NA	[O ₂ 20%] Si	[O ₂ 20%] NA	p
Número de pacientes	580		676		
Pacientes fumadoras	6 (4,4%)	443 (76,4%)	4 (2,7%)	526 (77,8%)	0,53
Sangrado durante gestación	54 (39,7%)	444 (76,6%)	66 (44%)	526 (77,8%)	0,47
Diabetes	16 (11,8%)	444 (76,6%)	20 (13,3%)	526 (77,8%)	0,72
Ruptura membranas antes semana 37 gestación	13 (9,8%)	447 (77,1%)	12 (8,2%)	529 (78,3%)	0,68
Amenaza parto pretérmino	8 (29,6%)	553 (95,3%)	14 (51,9%)	649 (96%)	0,17
Amenaza de parto prematuro	15 (11,1%)	445 (76,7%)	18 (12,2%)	528 (78,1%)	0,85
Hipertensión	17 (12,8%)	447 (77,1%)	26 (17,8%)	530 (78,4%)	0,32
Proteínas en orina	3 (9,4%)	548 (94,5%)	10 (37%)	649 (96%)	0,01*
Patologías durante puerperio	11 (8,2%)	446 (76,9%)	17 (11,1%)	523 (77,4%)	0,43

Tabla 26 Datos de variables maternas durante las gestaciones en ambos grupos de estudio, NA: No aplica

Los resultados de los datos obstétricos o gestacionales cuando se realiza la transferencia del preembrión en fresco se calcularon mediante la prueba exacta de *Fisher* para las variables categóricas binarias y el test de *Student* para las variables cuantitativas continuas. Para el análisis de los datos gestacionales, se podría haber diferenciado según si el embarazo ha sido gemelar o único, debido a que los embarazos gemelares presentan mayor incidencia de complicaciones se podría haber distinguido, pero como la proporción de embarazos gemelares es comparable entre los dos grupos de estudio, no se ha realizado dicha diferenciación. El porcentaje de partos gemelares cuando se realizaba transferencia en fresco era de un 10,7% en el grupo 6% de oxígeno y un 12,7% en el grupo de un 20% de oxígeno ($p=0,29$), cuando la transferencia embrionaria se realizaba postcriopreservación era de un 5,2% vs a un 6,1% en el grupo de 6% y 20% de oxígeno respectivamente ($p=0,55$). Finalmente, cuando se considera ambos tipos de transferencias (datos acumulados, suma de los dos tipos de transferencias) se obtiene un 8,1% vs 9,7% en el grupo de 6% y 20% de oxígeno respectivamente ($p=0,21$). Debido a que las pruebas de significación entre la proporción de embarazos gemelares en ambos grupos de estudio no son significativas, no se ha considerado.

Para los datos gestacionales u obstétricos en los ciclos con transferencia (TE) en fresco no se observan diferencias significativas tanto para las distintas tasas de éxito gestacional como para el número de preembriones transferidos y para el número de RNV por transferencia embrionaria. En la tabla también aparece el RR con el IC del 95%. Para el cálculo de los RR se tomó como referencia el grupo de concentración de oxígeno atmosférica (20% de O₂) (véase tabla 27).

Resultados gestacionales (TE en fresco)				
variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de ciclos en fresco con transferencia embrionaria (TE)	537	623		
β-HCG positiva/TE	332 (61,8%)	384 (61,6%)	1,00 [0,0,92; 1,1]	0,95
Gestación clínica/TE	280 (52,1%)	331 (53,1%)	0,98 [0,88; 1,10]	0,74
Gestación evolutiva/TE	237 (44,1%)	282 (45,3%)	0,98 [0,86; 1,11]	0,70
Aborto/TE	87 (16,2%)	94 (15,1%)	1,08 [0,82; 1,40]	0,60
Aborto bioquímico/TE	44 (8,2%)	45 (7,2%)	1,13 [0,76; 1,69]	0,54
Aborto clínico/TE	43 (8%)	49 (7,9%)	1,02 [0,69; 1,51]	0,93
Reducción saco gestacional/TE	16 (3,3%)	15 (2,6%)	1,25 [0,63; 2,51]	0,52
RNV/TE	207 (40,8%)	223 (39,5%)	1,03 [0,89; 1,20]	0,65
RNV/Ciclo iniciado (ITT)	207 (38,3%)	223 (37,1%)	1,03 [0,89; 1,20]	0,69
Número de preembriones transferidos por TE	1,81 ± 0,54	1,83 ± 0,52		0,52
Número RNV por TE	0,48 ± 0,67	0,49 ± 0,71		0,81

Tabla 27 Resultados gestacionales provenientes de las transferencias embrionarias en fresco, ITT: Intention to Treat

RESULTADOS

No se ha hecho el análisis de subgrupos según el día de transferencia embrionaria (en día 2-3 o día 5-7 o lo que sería lo mismo, en estadio de división celular o de blastocisto), en el caso de las transferencias en fresco, por la sencilla razón de que solamente se realizaron 6 transferencias embrionarias en día 5-7 y el resto se realizaron en día 2-3. Además las tasas se calcularon teniendo en cuenta los datos faltantes o *missing* para cada variable, el número de estos datos no se incluyen ya que en todos los casos ha sido un número despreciable de valores.

A continuación, se muestran los resultados gestacionales u obstétricos que provienen de las transferencias postcriopreservación y de las acumuladas (ambos tipos de transferencias embrionarias). En estos casos sí que se ha realizado se han realizado análisis de subgrupos según el día de transferencia embrionaria (día 2-3 o día 5-7).

Para los datos gestacionales u obstétricos que se obtienen de las transferencias embrionarias de los preembriones criopreservados (TEC) y para los datos gestacionales u obstétricos acumulados, se ha utilizado los mismo métodos estadísticos que en el caso de las transferencias embrionarias con embriones frescos. Los RR se encuentran calculados utilizando como referencia el grupo del 20% de oxígeno (de la misma manera que con las transferencias en fresco).

Tanto en el caso de los resultados gestacionales postcriopreservación como en los acumulados tampoco se observan diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas (véase tabla 28 y 29).

Resultados gestacionales (transferencia postcriopreservación)				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de transferencias embrionarias postcriopreservación	471	497		
Día transferencia 2-3	262	262		
Día transferencia 5-7	209	235		
β-HCG positiva/TE	251 (53.6%)	268 (54.3%)	0.99 [0,88; 1,11]	0,85
Día transferencia 2-3	128 (49%)	134 (51,5%)	0.95 [0,80; 1,13]	0,57
Día transferencia 5-7	123 (59,4%)	134 (57,3%)	1.04 [0,89; 1,22]	0,65
Gestación clínica/TE	210 (44,9%)	224 (45,3%)	0,99 [0,86; 1,14]	0,88
Día transferencia 2-3	108 (41,4%)	116 (44,6%)	0,93 [0,76; 1.13]	0,46
Día transferencia 5-7	102 (49,3%)	108 (46,2%)	1,07 [0,88; 1,30]	0,51
Gestación evolutiva/TE	155 (33,1%)	179 (36,2%)	0,91 [0,77; 1,09]	0,31
Día transferencia 2-3	82 (31,4%)	99 (38,1%)	0,83 [0,65; 1,05]	0,11
Día transferencia 5-7	73 (35,3%)	80 (34,2%)	1,03 [0,80; 1.33]	0,81
Aborto/TE	94 (20,1%)	87 (17,6%)	1,14 [0,88; 1,48]	0,33
Día transferencia 2-3	45 (17,2%)	34 (13,1%)	1,32 [0,87; 2,00]	0,19
Día transferencia 5-7	49 (23,7%)	53 (22,7%)	1,05 [0,74; 1,47]	0,80
Aborto bioquímico/TE	39 (8,3%)	42 (8,5%)	0,98 [0,65; 1,49]	0,93
Día transferencia 2-3	19 (7,3%)	17 (6,5%)	1,12 [0,57; 2,21]	0,74
Día transferencia 5-7	20 (9,7%)	25 (10,7%)	0,90 [0,52; 1,58]	0,72
Aborto clínico/TE	55 (11,8%)	45 (9,1%)	1,29 [0,89; 1,87]	0,18
Día transferencia 2-3	26 (10%)	17 (6,5%)	1,52 [0,85; 2.74]	0,16
Día transferencia 5-7	29 (14%)	28 (12%)	1,17 [0,72; 1,90]	0,52
Reducción saco gestacional/TE	9 (2,1%)	13 (2,9%)	0,73 [0,32; 1,69]	0,46
Día transferencia 2-3	4 (1,7%)	5 (2,1%)	0,80 [0,22; 3,00]	0,74
Día transferencia 5-7	5 (2,7%)	8 (3,8%)	0,70 [0,23; 2,10]	0,52



RESULTADOS

variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	P
RNV/TE	129 (29,2%)	159 (33,5%)	0,87 [0,72; 1,06]	0,16
Día transferencia 2-3	73 (29%)	91 (36,1%)	0,80 [0,62; 1,03]	0,09
Día transferencia 5-7	56 (29,5%)	68 (30,6%)	0,96 [0,72; 1,29]	0,80
RNV/Ciclo Iniciado	129 (29%)	159 (33,1%)	0,88 [0,72; 1,06]	0,18
Día transferencia 2-3	73 (29%)	91 (36,1%)	0,80 [0,62; 1,03]	0,09
Día transferencia 5-7	56 (29,5%)	68 (30,6%)	0,96 [0,72; 1,29]	0,80
Número de preembriones transferidos por TE	1,64 ± 0,51	1,61 ± 0,55		0,52
Día transferencia 2-3	1,77 ± 0,43	1,76 ± 0,47		0,77
Día transferencia 5-7	1,49 ± 0,52	1,50 ± 0,53		0,84
Número RNV por TE	0,34 ± 0,57	0,39 ± 0,61		0,19
Día transferencia 2-3	0,35 ± 0,58	0,43 ± 0,62		0,11
Día transferencia 5-7	0,34 ± 0,57	0,36 ± 0,59		0,75

Tabla 28 Resultados gestacionales provenientes de las transferencias embrionarias postcriopreservación (TEC)

Resultados gestacionales acumulados				
variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	P
TE	1008	1120		
Día transferencia 2-3	798	878		
Día transferencia 5-7	210	242		
β-HCG positiva/TE	583 (58%)	652 (58,4%)	0,99 [0,92; 1,07]	0,87
Día transferencia 2-3	459 (57,6%)	513 (58,6%)	0,98 [0,91; 1,07]	0,69
Día transferencia 5-7	124 (59,6%)	139 (57,7%)	1,03 [0,88; 1,21]	0,68
Gestación clínica/TE	490 (48,8%)	555 (49,7%)	0,98 [0,90; 1,07]	0,67
Día transferencia 2-3	387 (48,6%)	442 (50,5%)	0,96 [0,87; 1,06]	0,44
Día transferencia 5-7	103 (49,5%)	113 (46,9%)	1,06 [0,87; 1,28]	0,58
Gestación evolutiva/TE	392 (39%)	461 (41,3%)	0,95 [0,85; 1,05]	0,29
Día transferencia 2-3	318 (39,9%)	376 (42,9%)	0,93 [0,70; 1,25]	0,21
Día transferencia 5-7	74 (35,6%)	85 (35,3%)	1,01 [0,79; 1,30]	0,95
Aborto/TE	181 (18%)	181 (16%)	1,11 [0,92; 1,34]	0,27
Día transferencia 2-3	132 (16,6%)	128 (14,6%)	1,13 [0,91; 1,42]	0,27
Día transferencia 5-7	49 (23,6%)	53 (22%)	1,07 [0,76; 1,51]	0,69
Aborto bioquímico/TE	83 (8,3%)	87 (7,8%)	1,06 [0,79; 1,42]	0,69
Día transferencia 2-3	63 (7,9%)	62 (7,1%)	1,12 [0,80; 1,57]	0,52
Día transferencia 5-7	20 (9,6%)	25 (10,4%)	0,93 [0,53; 1,62]	0,79
Aborto clínico/TE	98 (9,8%)	94 (8,4%)	1,16 [0,88; 1,52]	0,28
Día transferencia 2-3	69 (8,7%)	66 (7,5%)	1,15 [0,83; 1,59]	0,40
Día transferencia 5-7	29 (13,9%)	28 (11,6%)	1,20 [0,74; 1,95]	0,46
Reducción saco gestacional	25 (2,7%)	28 (2,7%)	1,00 [0,59; 1,70]	1
Día transferencia 2-3	20 (2,7%)	20 (2,5%)	1,11 [0,60; 2,05]	0,74
Día transferencia 5-7	5 (2,7%)	8 (3,7%)	0,72 [0,24; 2,16]	0,55
RNV/TE	336 (35,4%)	382 (36,8%)	0,96 [0,86; 1,08]	0,53
Día transferencia 2-3	279 (36,8%)	309 (38,2%)	0,96 [0,85; 1,10]	0,58
Día transferencia 5-7	57 (29,8%)	73 (31,9%)	0,94 [0,70; 1,25]	0,65



variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	P
RNV/Ciclo Iniciado	336 (34,1%)	382 (35,3%)	0,97 [0,86; 1,09]	0,56
Día transferencia 2-3	279 (36,8%)	309 (38,2%)	0,96 [0,85; 1,10]	0,58
Día transferencia 5-7	57 (29,8%)	73 (31,9%)	0,94 [0,70; 1,25]	0,65
Número de preembriones transferidos por TE	1,80 ± 0,42	1,8 ± 0,43		0,66
Día transferencia 2-3	1,88 ± 0,35	1,88 ± 0,35		0,74
Día transferencia 5-7	1,49 ± 0,52	1,52 ± 0,55		0,55
Número RNV por TE	0,44 ± 0,64	0,47 ± 0,67		0,28
Día transferencia 2-3	0,46 ± 0,65	0,49 ± 0,69		0,32
Día transferencia 5-7	0,35 ± 0,58	0,38 ± 0,61		0,57

Tabla 29 Resultados Gestacionales acumulados

5.4. Predicción de éxito de las tasas obstétricas acumuladas mediante *Poisson*

Para este análisis se genera un conjunto de datos básicos donde tenemos registrado para cada paciente, el tratamiento en fresco y sus transferencias embrionarias de congelados asociados. Para cada uno de los tratamientos se registra el éxito gestacional como una variable binomial.

El conteo acumulado de éxito gestacional por paciente y ciclo se presentaría, pues, en una tabla de la forma:

IDENTIFICADOR DE PACIENTE	Número de TE (nTE)	Número de gestaciones acumuladas (NGesAcum)
ID 001	5	3
ID 002	3	1
ID 003	2	1

El modelo de regresión que nos permite estimar la frecuencia (tasa de gestación) media viene dado por:

$$\log(\text{NGesAcum}) \sim \beta_0 + \text{offset}(\log(\text{nTE}))$$

Puesto que la función de vínculo es el logaritmo, para calcular por ejemplo la tasa media de gestación clínica debemos tomar el exponente del valor estimado (mediante la anterior ecuación):

$$\lambda = \exp(-0,73867) \cong 0,478$$

Esto quiere decir que, en promedio, la tasa de gestación clínica, independientemente del número de transferencias acumuladas es del 47,8%.

Ahora, bien, dada la frecuencia media estimada para la distribución de *Poisson* correspondiente, ahora podemos hacer cálculos estimados sobre las probabilidades en los casos en que se haga 1, 2, 3,... transferencias embrionarias.

RESULTADOS

Así, si $\text{Pois}(1|N,\lambda)$ es la probabilidad de tener una gestación en N transferencias con el valor del parámetro estimado en el modelo, entonces la probabilidad de, al menos una gestación, en N transferencias vendrá dado por:

$$\sum_{i=1}^N \text{Pois}(y_i|N, \lambda)$$

TE num1	TE num2	TE num3	TE num4	TE num5	TE num6
29,6%	54,3%	70,4%	80,7%	87,3%	91,6%

Entonces, la probabilidad de conseguir, al menos, una gestación clínica con 3 transferencias es del 70.39%.

Si consideramos los grupos en el presente trabajo: 6% de [O₂] y 20% de [O₂] y los incluimos en el modelo de regresión anterior, se obtiene:

$$\begin{aligned} 6\% [O_2] & \quad \lambda_{6\%} = \exp(-0,73867 + 0,002535) \cong 0,4789 \\ 20\% [O_2] & \quad \lambda_{20\%} = \exp(-0,739872) \cong 0,4777 \end{aligned}$$

En el modelo la categoría de referencia es el 20% de oxígeno. De modo que el riesgo relativo de 6% de oxígeno sobre 20% de oxígeno queda registrado en el estimador de la fila del 6% de [O₂]:

$$RR = \exp(0,002535) = 1,002538$$

En los siguientes gráficos se muestran las predicciones de diferentes variables gestacionales según el número de TE. En los estos gráficos se muestran las variables sin tener en cuenta el día de TE (día 2-3 o 5-7), los gráficos de las variables según el día de transferencia se encuentran en el apéndice.

Como se puede observar en los gráficos las predicciones de la variable de gestación, gestación clínica y gestación evolutiva en ambos grupos de estudio es casi idénticas (los gráficos se encuentran solapadas), esto quiere decir que se espera unas tasas de gestación casi idénticas entre ambos grupos de estudio (véase ilustraciones 8, 9 y 10). Para las variables referentes al aborto parece que se espera unas tasas ligeramente mayores en el grupo del 6% de oxígeno (véase ilustraciones 11 y 12). Finalmente para la variable de reducción embrionaria y de RNV vuelven a solaparse ambos grupos de estudio (véase ilustraciones 13 y 14).

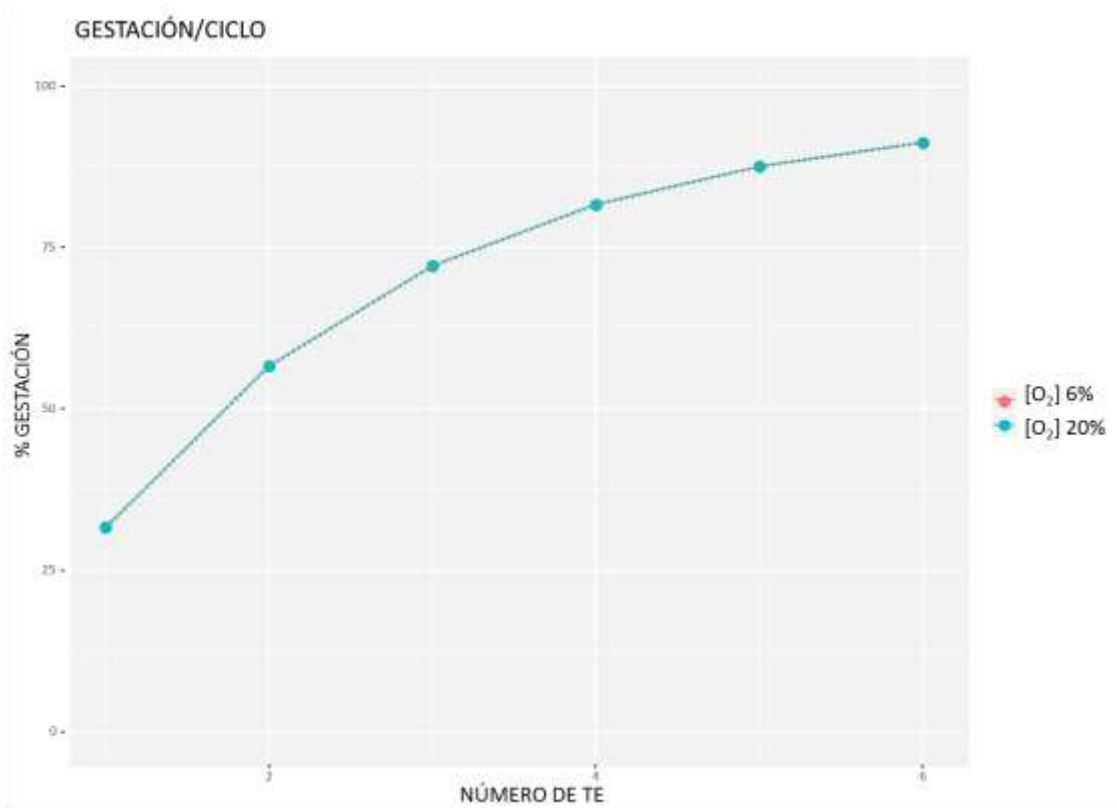


Ilustración 8 Predicción de la tasa de gestación (β -hCG positiva)/ciclo según número de TE

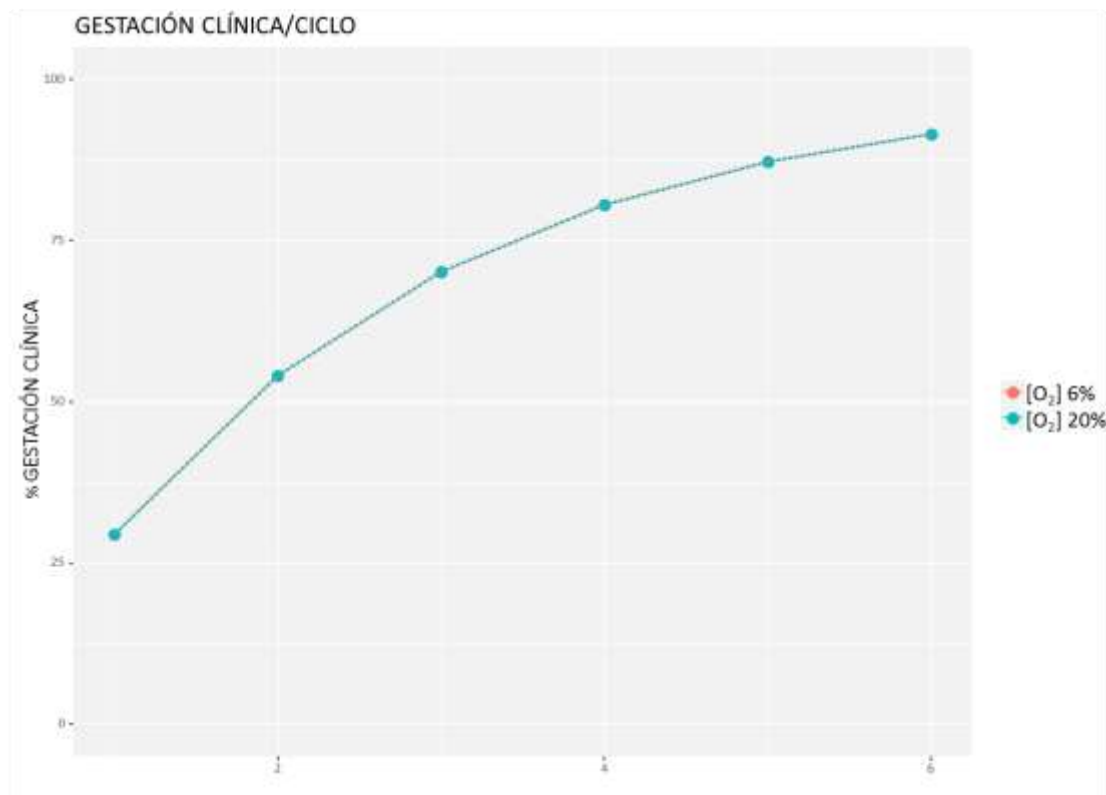


Ilustración 9 Predicción de la tasa de gestación clínica/ciclo según número de TE

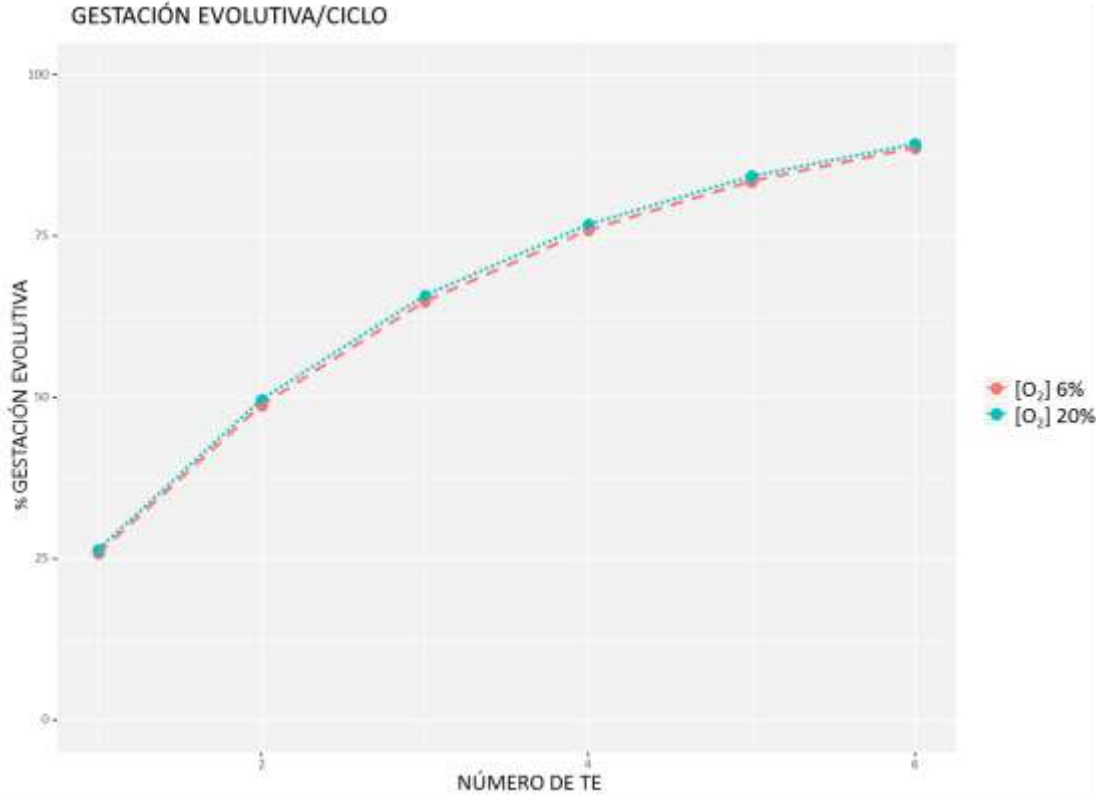


Ilustración 10 Predicción de la tasa de gestación evolutiva/ciclo según número de TE

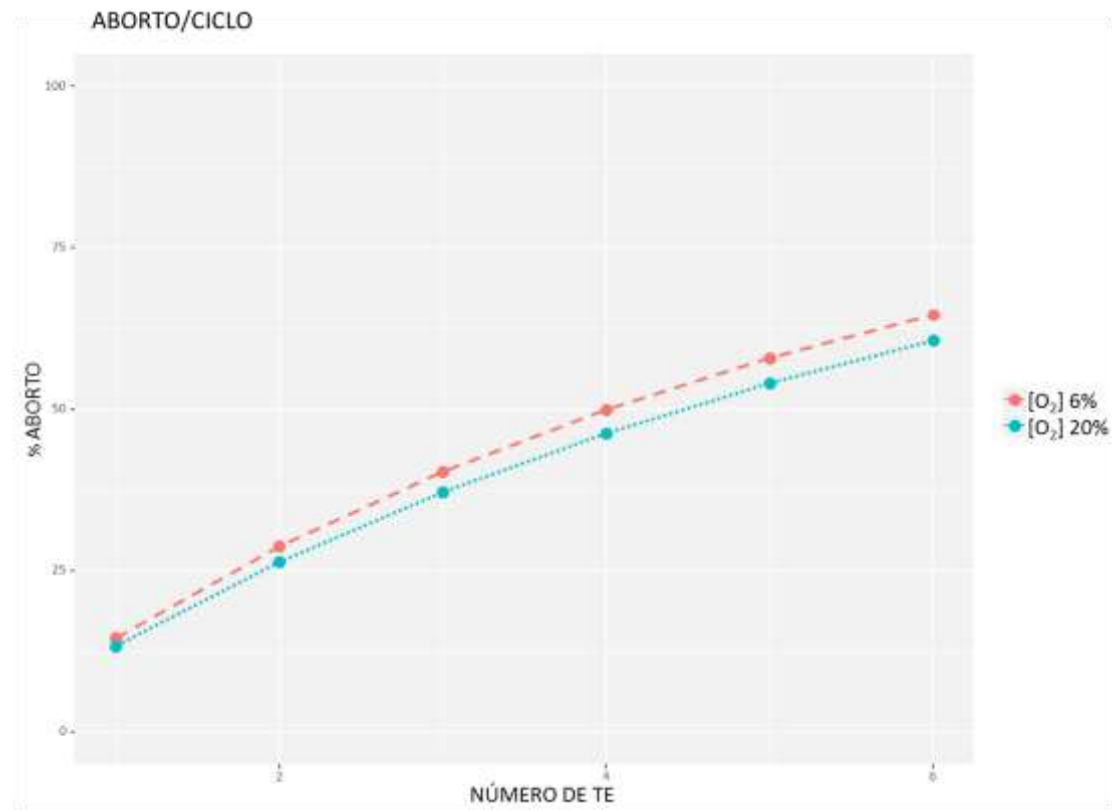


Ilustración 11 Predicción de la tasa de aborto/ciclo según número de TE

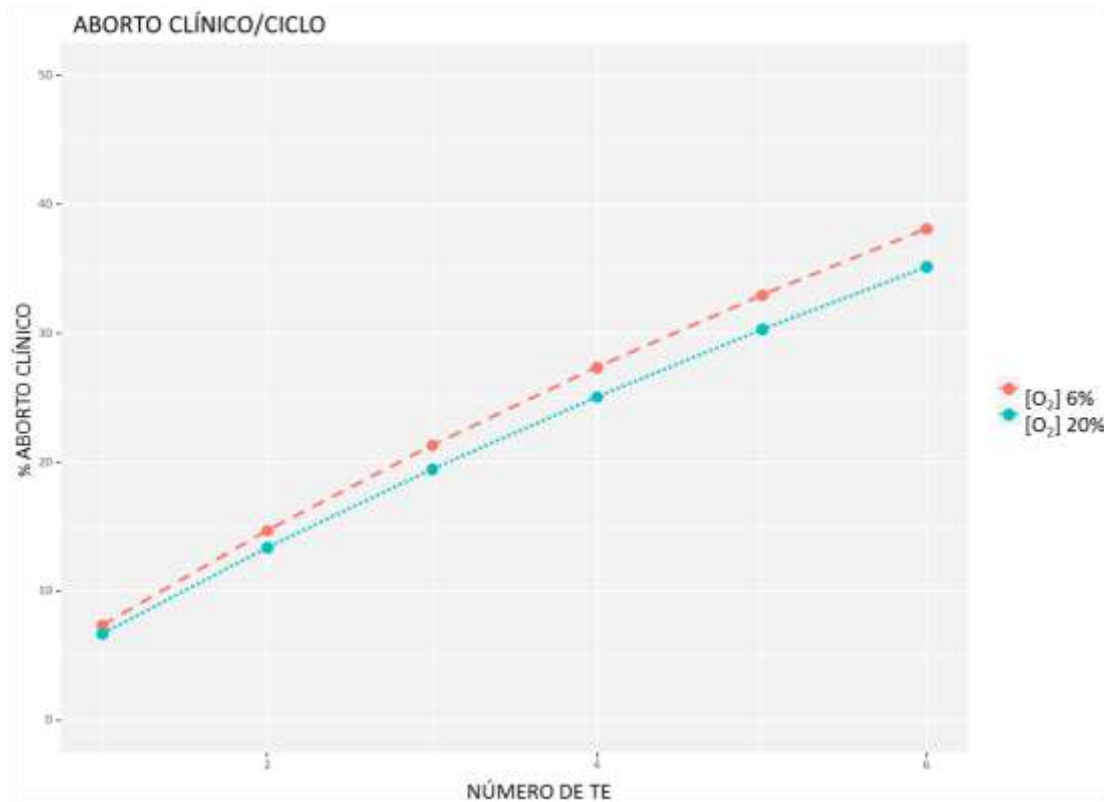


Ilustración 12 Predicción de la tasa de aborto clínico/ciclo según número de TE

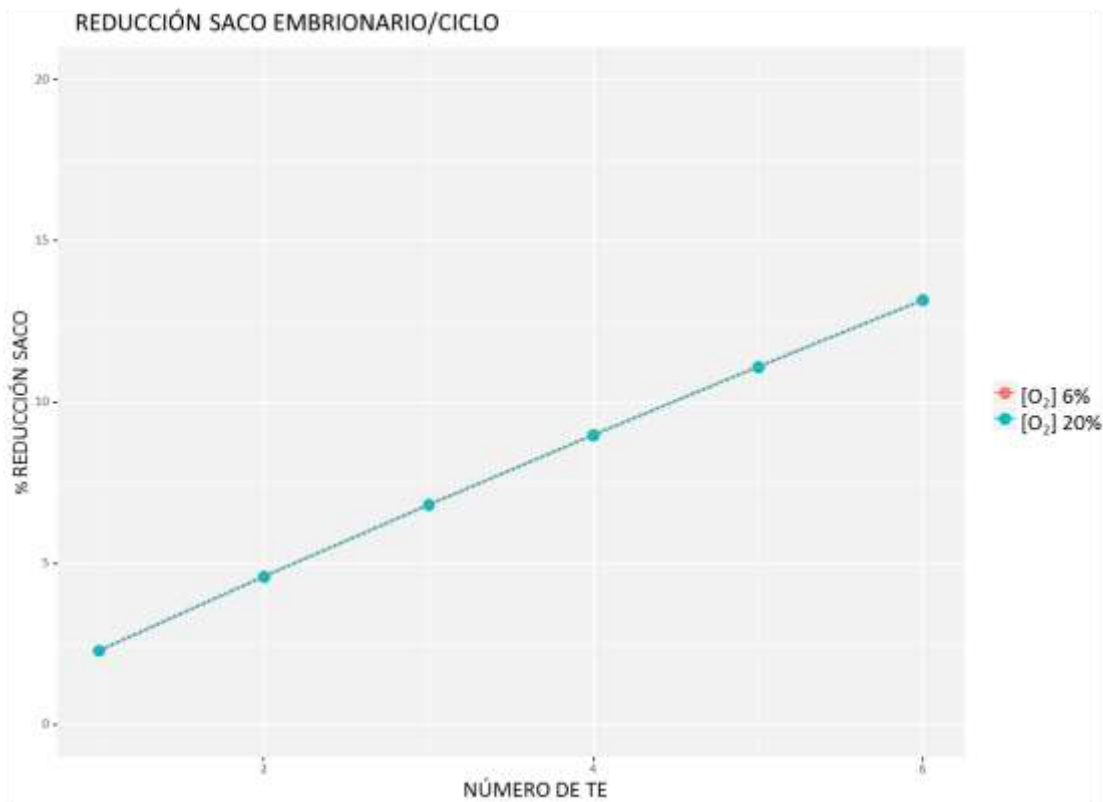


Ilustración 13 Predicción de la tasa de reducción de saco embrionario/ciclo según número de TE

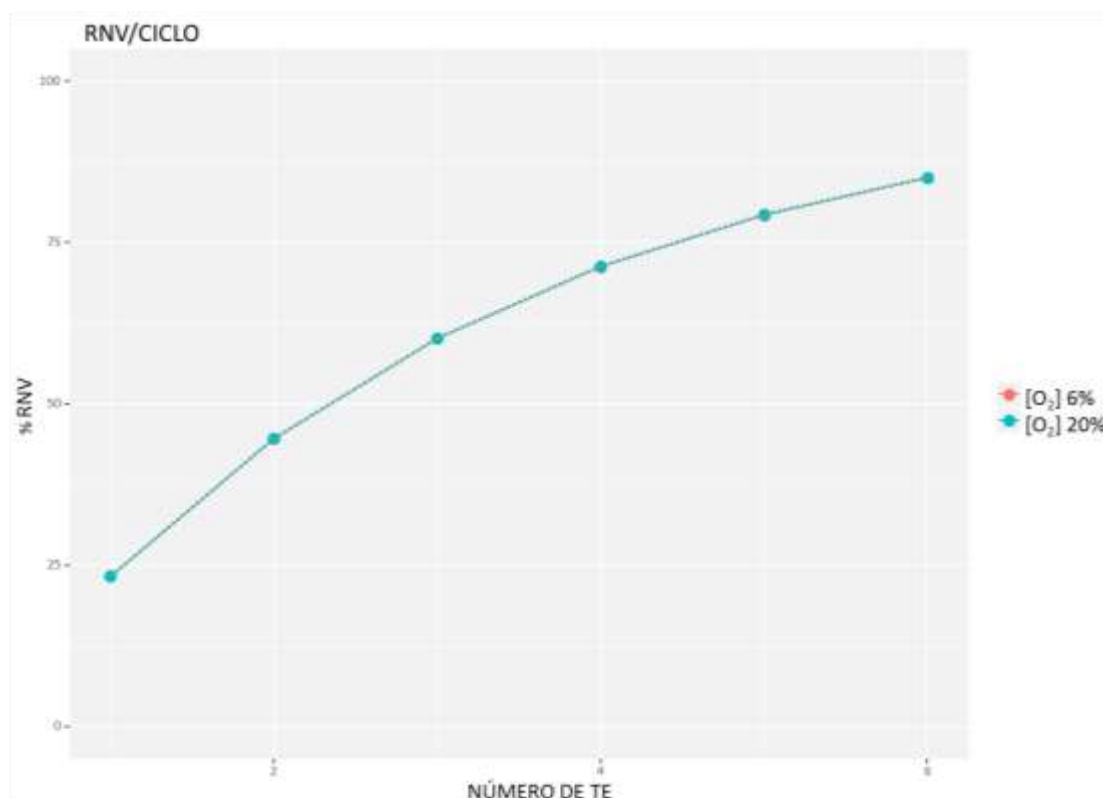


Ilustración 14 Predicción de la tasa de RNV/ciclo según número de TE

5.5. Resultados datos neonatales/perinatales de los RNV

Para el análisis de los resultados perinatales o neonatales de los RNV del estudio, se separó en dos grupos: embarazos únicos y gemelares. También se analizaron los datos según el tipo de transferencia embrionaria (TE), en fresco o criopreservados y en la totalidad (en fresco más criopreservados).

Además se realizó el análisis de los datos según el día de transferencia embrionaria, día 2-3 (que corresponde a estadio de células en el preembrión) y día 5-7 (que corresponde a estadio de blastocisto).

Para el grupo de embarazos únicos con TE en fresco no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables estudiadas. Únicamente los percentiles se acercan a dar una diferencia significativa estadísticamente hablando.

En el grupo de embarazos únicos postcriopreservación (TEC) únicamente se encuentra una diferencia estadísticamente significativa, el test de Apgar realizado 1 minuto después del parto. Cuando se analizan si tener en cuenta el día de transferencia el resultado no es estadísticamente significativo, sin embargo, si se analiza además teniendo en cuenta el día de transferencia, en el grupo de transferencia en día 2-3 el resultado sí que es significativo.

Cabe remarcar que cuando se analizan todos los resultados de las gestaciones únicas, sin tener en cuenta el tipo de transferencia embrionaria, ninguna de las variables estudiadas llega a ser estadísticamente significativa.

Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos (TE en fresco)				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV únicos	153	151		
Día transferencia 2-3	153	149		
Día transferencia 5-7	0	2		
Proporción RNV femeninas	60 (39,2%)	65 (43,1%)	0,91 [0,70; 1,19]	0,50
Día transferencia 2-3	60 (39,2%)	64 (43,0%)	0,91 [0,70; 1,20]	0,51
Día transferencia 5-7				
RNV Muy Prematuro	3 (2,0%)	2 (1,3%)	1,48 [0,25; 8,74]	0,66
Día transferencia 2-3	3 (2,0%)	2 (1,3%)	1,46 [0,25; 8,62]	0,68
Día transferencia 5-7				
RNV Prematuro	14 (9,2%)	16 (10,6%)	0,86 [0,44; 1,71]	0,68
Día transferencia 2-3	14 (9,2%)	16 (10,8%)	0,85 [0,43; 1,68]	0,64
Día transferencia 5-7				
Peso (g)	3217 ± 530	3223 ± 599		0,92
Día transferencia 2-3	3217 ± 530	3223 ± 601		0,93
Día transferencia 5-7				
Peso muy Bajo (PMB)	1 (0,7%)	2 (1,3%)	0,49 [0,05; 5,39]	0,56
Día transferencia 2-3	1 (0,7%)	2 (1,3%)	0,49 [0,04; 5,31]	0,55
Día transferencia 5-7				
Peso Bajo (PB)	8 (5,2%)	12 (8,0%)	0,66 [0,28; 1,56]	0,34
Día transferencia 2-3	8 (5,2%)	12 (8,1%)	0,65 [0,27; 1,54]	0,33
Día transferencia 5-7				
Peso Alto (PA)	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0,99 [0,06; 15,6]	0,99
Día transferencia 2-3	1 (0,7%)	1 (0,7%)	0,97 [0,06; 15,4]	0,99
Día transferencia 5-7				
Peso Bajo a Término (PBT)	4 (2,6%)	2 (1,3%)	1,97 [0,37; 10,6]	0,43
Día transferencia 2-3	4 (2,6%)	2 (1,3%)	1,95 [0,36; 10,5]	0,44
Día transferencia 5-7				
Edad Gestacional (EG)	39,1 ± 2,2	39,0 ± 2,6		0,58
Día transferencia 2-3	39,1 ± 2,2	38,9 ± 2,6		0,55
Día transferencia 5-7	NA ± NA	39,0 ± NA		NA
Percentiles	49,5 ± 29,9	56,3 ± 30,5		0,08
Día transferencia 2-3	49,5 ± 29,9	56,7 ± 30,3		0,07
Día transferencia 5-7	NA ± NA	12,2 ± NA		NA
Muy Pequeño para EG (MP)	5 (3,9%)	1 (0,8%)	4,73 [0,56; 39,9]	0,15
Día transferencia 2-3	5 (3,9%)	1 (0,8%)	4,65 [0,55; 39,2]	0,16
Día transferencia 5-7				
Pequeño para EG (P)	14 (10,9%)	8 (6,6%)	1,65 [0,72; 3,80]	0,23
Día transferencia 2-3	14 (10,9%)	8 (6,7%)	1,63 [0,71; 4,74]	0,25
Día transferencia 5-7				
Grande para EG (G)	18 (14,1%)	21 (17,4%)	0,81 [0,45; 1,45]	0,49
Día transferencia 2-3	18 (14,1%)	21 (17,7%)	0,80 [0,45; 1,42]	0,44
Día transferencia 5-7				
Muy Grande para EG (MG)	8 (6,3%)	10 (8,3%)	0,76 [0,31; 1,85]	0,54
Día transferencia 2-3	8 (6,3%)	10 (8,4%)	0,74 [0,30; 1,82]	0,52
Día transferencia 5-7				
Z-score	-0,12 ± 1,10	0,13 ± 1,00		0,06
Día transferencia 2-3	-0,12 ± 1,10	0,14 ± 1,00		0,06
Día transferencia 5-7				
Talla (cm)	50,3 ± 2,4	50,4 ± 2,8		0,85
Día transferencia 2-3	50,3+/-2,4	50,3 ± 2,8		0,99
Día transferencia 5-7	NA ± NA	52 ± NA		NA



RESULTADOS

Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Perímetro craneal (cm)	34,2 ± 1,8	34,2 ± 1,6		0,91
Día transferencia 2-3	34,2 ± 1,8	34,2 ± 1,6		1
Día transferencia 5-7	NA ± NA	32 ± NA		NA
Test Apgar 1 minuto	9,0 ± 0,8	9,0 ± 0,7		0,68
Día transferencia 2-3	9,0 ± 0,8	9,0 ± 0,7		0,68
Día transferencia 5-7	NA ± NA	9 ± NA		NA
Test Apgar 5 minutos	9,7 ± 0,7	9,7 ± 0,5		0,94
Día transferencia 2-3	9,7 ± 0,7	9,7 ± 0,5		0,90
Día transferencia 5-7	NA ± NA	10 ± NA		NA
Test Apgar 10 minutos	9,9 ± 0,4	9,7 ± 0,5		0,23
Día transferencia 2-3	9,9 ± 0,4	9,72 ± 0,5		0,23
Día transferencia 5-7				

Tabla 30 Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos (TE en fresco), NA/NaN: No aplica/Not a Number

Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos (TEC)				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV únicos	106	130		
Día transferencia 2-3	59	73		
Día transferencia 5-7	47	57		
Proporción RNV femeninas	55 (51,9%)	63 (48,5%)	1,07 [0,83; 1,38]	0,60
Día transferencia 2-3	30 (50,9%)	31 (42,5%)	1,20 [0,83; 1,73]	0,34
Día transferencia 5-7	25 (53,2%)	32 (56,1%)	0,95 [0,67; 1,35]	0,76
RNV Muy Prematuro	0 (0%)	4 (3,1%)	NaN [NaN; NaN]	0,99
Día transferencia 2-3	0 (0%)	3 (4,1%)	NaN [NaN; NaN]	0,99
Día transferencia 5-7	0 (0%)	1 (1,8%)	NaN [NaN; NaN]	1
RNV Prematuro	14 (13,2%)	12 (9,2%)	1,43 [0,69; 2,96]	0,33
Día transferencia 2-3	8 (13,6%)	9 (12,3%)	1,10 [0,45; 2,67]	0,83
Día transferencia 5-7	6 (12,8%)	3 (5,3%)	2,43 [0,64; 9,18]	0,19
Peso (g)	3220 ± 601	3158 ± 741		0,53
Día transferencia 2-3	3191 ± 576	3177 ± 768		0,92
Día transferencia 5-7	3254 ± 636	3137 ± 719		0,42
Peso muy Bajo (PMB)	1 (0,94%)	5 (3,9%)	0,25 [0,03; 2,07]	0,19
Día transferencia 2-3	0 (0%)	3 (4,1%)	NaN [NaN; NaN]	0,99
Día transferencia 5-7	1 (2,1%)	2 (3,5%)	0,61 [0,06; 6,48]	0,68
Peso Bajo (PB)	11 (10,4%)	11 (8,5%)	1,23 [0,55; 2,72]	0,62
Día transferencia 2-3	8 (13,6%)	6 (8,2%)	1,65 [0,61; 4,49]	0,33
Día transferencia 5-7	3 (6,5%)	5 (8,8%)	0,73 [0,18; 2,89]	0,65
Peso Alto (PA)	1 (0,9%)	2 (1,5%)	0,61 [0,06; 6,67]	0,69
Día transferencia 2-3	0 (0%)	1 (1,4%)	NaN [NaN; NaN]	0,99
Día transferencia 5-7	1 (2,1%)	1 (1,8%)	1,21 [0,08; 18,9]	0,89
Peso Bajo a Término (PBT)	4 (3,8%)	4 (3,1%)	1,23 [0,31; 4,79]	0,77
Día transferencia 2-3	3 (5,1%)	2 (2,7%)	1,86 [0,32; 10,7]	0,49
Día transferencia 5-7	1 (2,1%)	2 (3,5%)	0,61 [0,06; 6,48]	0,68
Edad Gestacional (EG)	38,9 ± 1,7	38,6 ± 2,7		0,38
Día transferencia 2-3	39,0 ± 1,6	38,4 ± 3,3		0,25
Día transferencia 5-7	38,8 ± 1,8	38,9 ± 1,8		0,83
Percentiles	55,5 ± 30,1	52,1 ± 31,2		0,44
Día transferencia 2-3	54,4 ± 29,9	54,5 ± 31,1		1
Día transferencia 5-7	56,8 ± 30,6	49,4 ± 31,4		0,27
Muy Pequeño para EG (MP)	4 (4,4%)	4 (4%)	1,11 [0,29; 4,31]	0,88
Día transferencia 2-3	2 (4,1%)	2 (3,8%)	1,08 [0,16; 7,39]	0,94
Día transferencia 5-7	2 (4,9%)	2 (4,3%)	1,15 [0,17; 7,78]	0,89



RESULTADOS

Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Pequeño para EG (P)	10 (11,1%)	10 (10%)	1,11 [0,49; 2,55]	0,80
Día transferencia 2-3	5 (10,2%)	4 (7,6%)	1,35 [0,39; 4,75]	0,64
Día transferencia 5-7	5 (12,2%)	6 (12,8%)	0,96 [0,31; 2,90]	0,94
Grande para EG (G)	15 (16,7%)	18 (18%)	0,93 [0,50; 1,73]	0,81
Día transferencia 2-3	6 (12,2%)	10 (18,9%)	0,65 [0,25; 1,65]	0,36
Día transferencia 5-7	9 (22%)	8 (17%)	1,29 [0,55; 3,03]	0,56
Muy Grande para EG (MG)	9 (10%)	7 (7%)	1,43 [0,55; 3,68]	0,46
Día transferencia 2-3	2 (4,1%)	4 (7,6%)	0,54 [0,10; 2,82]	0,46
Día transferencia 5-7	7 (17,1%)	3 (6,4%)	2,68 [0,74; 9,68]	0,13
Z-score	0,02 ± 1,20	-0,20 ± 1,70		0,32
Día transferencia 2-3	-0,09 ± 1,27	0,02 ± 1,55		0,70
Día transferencia 5-7	0,14 ± 1,11	-0,43 ± 1,82		0,08
Talla (cm)	49,8 ± 2,4	49,4 ± 3,7		0,39
Día transferencia 2-3	50,1 ± 2,7	49,4 ± 4,5		0,41
Día transferencia 5-7	49,6 ± 1,9	49,4 ± 2,0		0,75
Perímetro craneal (cm)	34,2 ± 1,9	34 ± 2,1		0,68
Día transferencia 2-3	34,6 ± 1,7	33,9 ± 2,4		0,24
Día transferencia 5-7	33,8 ± 2,0	34,4 ± 1,3		0,35
Test Apgar 1 minuto	9,0 ± 0,9	8,7 ± 1,5		0,21
Día transferencia 2-3	9,3 ± 0,5	8,8 ± 1,1		0,03*
Día transferencia 5-7	8,6 ± 1,1	8,5 ± 1,8		0,93
Test Apgar 5 minutos	9,7 ± 0,5	9,5 ± 0,8		0,13
Día transferencia 2-3	9,7 ± 0,5	9,6 ± 0,7		0,29
Día transferencia 5-7	9,7 ± 0,6	9,5 ± 0,9		0,30
Test Apgar 10 minutos	9,9 ± 0,4	9,9 ± 0,3		0,70
Día transferencia 2-3	9,8 ± 0,4	9,9 ± 0,4		0,88
Día transferencia 5-7	9,9 ± 0,4	9,9 ± 0,3		0,70

Tabla 31 Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos (TEC, transferencias postcriopreservación), NA/NaN: No Aplica/Not a Number

Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV únicos	259	281		
Día transferencia 2-3	212	222		
Día transferencia 5-7	47	59		
Proporción RNV femeninas	115 (44,4%)	127 (45,6%)	0,97 [0,81; 1,18]	0,79
Día transferencia 2-3	90 (42,5%)	95 (42,8%)	0,99 [0,80; 1,23]	0,94
Día transferencia 5-7	25 (53,2%)	33 (55,9%)	0,95 [0,67; 1,35]	0,78
RNV Muy Prematuro	3 (1,2%)	6 (2,1%)	0,54 [0,14; 2,15]	0,38
Día transferencia 2-3	3 (1,4%)	5 (2,3%)	0,63 [0,15; 2,60]	0,52
Día transferencia 5-7	0 (0%)	1 (1,7%)	NaN [NaN; NaN]	1
RNV Prematuro	28 (10,8%)	28 (10%)	1,09 [0,66; 1,78]	0,75
Día transferencia 2-3	22 (10,4%)	25 (11,3%)	0,92 [0,54; 1,58]	0,77
Día transferencia 5-7	6 (12,8%)	3 (5,1%)	2,51 [0,66; 9,51]	0,17
Peso (g)	3218 ± 559	3193 ± 668		0,67
Día transferencia 2-3	3209 ± 541	3208 ± 656		0,99
Día transferencia 5-7	3254 ± 636	3142 ± 711		0,43
Peso muy Bajo (PMB)	2 (0,8%)	7 (2,5%)	0,31 [0,06; 1,48]	0,14
Día transferencia 2-3	1 (0,5%)	5 (2,3%)	0,21 [0,02; 1,78]	0,15
Día transferencia 5-7	1 (2,1%)	2 (3,4%)	0,63 [0,06; 6,71]	0,70
Peso Bajo (PB)	19 (7,3%)	23 (8,2%)	0,90 [0,50; 1,61]	0,71
Día transferencia 2-3	16 (7,6%)	18 (8,1%)	0,93 [0,49; 1,78]	0,83
Día transferencia 5-7	3 (6,4%)	5 (8,5%)	0,75 [0,19; 2,99]	0,69



RESULTADOS

Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Peso Alto (PA)	2 (0,8%)	3 (1,1%)	0,72 [0,12; 4,29]	0,72
Día transferencia 2-3	1 (0,5%)	2 (0,9%)	0,52 [0,05; 5,73]	0,60
Día transferencia 5-7	1 (2,1%)	1 (1,7%)	1,26 [0,08; 19,5]	0,87
Peso Bajo a Término (PBT)	8 (3,1%)	6 (2,1%)	1,45 [0,51; 4,11]	0,49
Día transferencia 2-3	7 (3,3%)	4 (1,8%)	1,83 [0,54; 6,17]	0,33
Día transferencia 5-7	1 (2,1%)	2 (3,4%)	0,63 [0,06; 6,71]	0,70
Edad Gestacional (EG)	39,0 ± 2,0	38,8 ± 2,7		0,30
Día transferencia 2-3	39,1 ± 2,1	38,8 ± 2,8		0,22
Día transferencia 5-7	38,8 ± 1,8	39,0 ± 1,8		0,73
Percentiles	52,0 ± 30,0	54,4 ± 30,7		0,41
Día transferencia 2-3	50,9 ± 29,9	55,9 ± 30,4		0,12
Día transferencia 5-7	56,4 ± 30,6	49,1 ± 31,4		0,24
Muy Pequeño para EG (MP)	9 (4,1%)	5 (2,3%)	1,83 [0,62; 5,35]	0,28
Día transferencia 2-3	7 (4%)	3 (1,7%)	2,27 [0,60; 8,63]	0,23
Día transferencia 5-7	2 (4,9%)	2 (4,1%)	1,20 [0,18; 8,12]	0,86
Pequeño para EG (P)	24 (11,0%)	18 (8,1%)	1,35 [0,76; 2,42]	0,31
Día transferencia 2-3	19 (10,7%)	12 (7%)	1,54 [0,77; 3,07]	0,22
Día transferencia 5-7	5 (12,2%)	6 (12,2%)	1,00 [0,33; 3,02]	0,99
Grande para EG (G)	33 (15,1%)	39 (17,7%)	0,86 [0,56; 1,31]	0,48
Día transferencia 2-3	24 (13,6%)	31 (18%)	0,75 [0,46; 1,23]	0,25
Día transferencia 5-7	9 (22%)	8 (16,3%)	1,35 [0,57; 3,17]	0,50
Muy Grande para EG (MG)	17 (7,8%)	17 (7,7%)	1,01 [0,53; 1,93]	0,97
Día transferencia 2-3	10 (5,7%)	14 (8,1%)	0,69 [0,32; 1,52]	0,36
Día transferencia 5-7	7 (17,1%)	3 (6,1%)	2,79 [0,77; 10,1]	0,11
Z-score	-0,06 ± 1,14	-0,02 ± 1,37		0,73
Día transferencia 2-3	-0,11 ± 1,15	0,10 ± 1,20		0,09
Día transferencia 5-7	0,14 ± 1,11	-0,42 ± 1,80		0,08
Talla (cm)	50,1 ± 2,4	49,9 ± 3,3		0,56
Día transferencia 2-3	50,3 ± 2,5	50,0 ± 3,5		0,50
Día transferencia 5-7	49,6 ± 1,9	49,6 ± 2,2		0,86
Perímetro craneal (cm)	34,2 ± 1,8	34,1 ± 1,8		0,71
Día transferencia 2-3	34,3 ± 1,8	34,1 ± 1,9		0,46
Día transferencia 5-7	33,8 ± 2,0	34,2 ± 1,4		0,49
Test Apgar 1 minuto	9,0 ± 0,9	8,8 ± 1,1		0,21
Día transferencia 2-3	9,1 ± 0,8	8,9 ± 0,9		0,10
Día transferencia 5-7	8,6 ± 1,1	8,5 ± 1,8		0,96
Test Apgar 5 minutos	9,7 ± 0,6	9,6 ± 0,7		0,25
Día transferencia 2-3	9,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6		0,45
Día transferencia 5-7	9,7 ± 0,6	9,5 ± 0,9		0,34
Test Apgar 10 minutos	9,9 ± 0,4	9,8 ± 0,4		0,47
Día transferencia 2-3	9,9 ± 0,4	9,8 ± 0,4		0,33
Día transferencia 5-7	9,9 ± 0,4	9,9 ± 0,3		0,70

Tabla 32 Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos, NA/NaN: No aplica/ Not a Number

En los resultados de embarazos gemelares, se encuentran diferencias para la variable de Test de Apgar pasados 1 minuto del nacimiento cuando la TE se realiza en día 5-7, siendo la puntuación del test más alta en el grupo del 6% de oxígeno. Sin embargo, no es significativo cuando no se tiene en cuenta el día de transferencia embrionaria, es decir en el global de RNV que provienen de embarazos gemelares con transferencia embrionaria en fresco, que no llega a ser significativo.

RESULTADOS

Sucede lo mismo en el caso de la prematuridad de los RNV, sólo es estadísticamente significativo cuando el día de transferencia embrionaria es en estadio de células (día2-3), siendo más alto el porcentaje de prematuros en el grupo de 6% de oxígeno. No obstante, no lo es cuando consideramos el global de los RNV de embarazos gemelares con transferencia de los embriones en fresco.

Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares (TE en fresco)				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV únicos	108	142		
Día transferencia 2-3	106	136		
Día transferencia 5-7	2	6		
Proporción RNV femeninas	48 (44,4%)	69 (48,6%)	0,91 [0,70; 1,20]	0,52
Día transferencia 2-3	47 (44,3%)	67 (49,3%)	0,90 [0,68; 1,18]	0,45
Día transferencia 5-7	1 (50%)	2 (33,3%)	1,5 [0,25; 8,98]	0,68
RNV Muy Prematuro	2 (1,9%)	8 (5,6%)	0,33 [0,07; 1,52]	0,15
Día transferencia 2-3	2 (1,9%)	8 (5,9%)	0,32 [0,07; 1,48]	0,14
Día transferencia 5-7				
RNV Prematuro	62 (57,4%)	66 (46,5%)	1,24 [0,97; 1,57]	0,09
Día transferencia 2-3	62 (58,5%)	62 (45,6%)	1,28 [1,01; 1,64]	0,05*
Día transferencia 5-7	0 (0%)	4 (66,7%)	NaN [NaN; NaN]	1
Peso (g)	2374 ± 457	2391 ± 545		0,82
Día transferencia 2-3	2374 ± 457	2397 ± 551		0,75
Día transferencia 5-7	NA ± NA	2268 ± 399		NA
Peso muy Bajo (PMB)	3 (2,8%)	8 (5,6%)	0,49 [0,13; 1,82]	0,29
Día transferencia 2-3	3 (2,8%)	8 (5,9%)	0,48 [0,13; 1,77]	0,27
Día transferencia 5-7				
Peso Bajo (PB)	50 (46,3%)	70 (49,3%)	0,94 [0,72; 1,22]	0,64
Día transferencia 2-3	50 (47,2%)	65 (47,8%)	0,99 [0,76; 1,29]	0,92
Día transferencia 5-7	0 (0%)	5 (83,3%)	NaN [NaN; NaN]	1
Peso Alto (PA)				
Día transferencia 2-3				
Día transferencia 5-7				
Peso Bajo a Término (PBT)	12 (11,1%)	25 (17,6%)	0,63 [0,33; 1,20]	0,16
Día transferencia 2-3	12 (11,3%)	24 (17,7%)	0,64 [0,34; 1,22]	0,17
Día transferencia 5-7	0 (0%)	1 (16,7%)	NaN [NaN; NaN]	1
Disparidad entre pesos RNV	361 ± 287	313 ± 444		0,38
Día transferencia 2-3	361 ± 287	308 ± 452		0,35
Día transferencia 5-7	NA ± NA	410 ± 234		NA
Edad Gestacional (EG)	36,3 ± 2,1	36,2 ± 2,6		0,90
Día transferencia 2-3	36,3 ± 2,1	36,3 ± 2,6		0,94
Día transferencia 5-7	NA ± NA	35,2 ± 2,5		NA
Percentiles	29 ± 26,5	27,5 ± 23,8		0,67
Día transferencia 2-3	29 ± 26,5	27,3 ± 24,0		0,64
Día transferencia 5-7	NA ± NA	31,1 ± 22,2		NA
Muy Pequeño para EG (MP)	12 (13,8%)	9 (7,1%)	1,93 [0,85; 4,38]	0,12
Día transferencia 2-3	12 (13,8%)	8 (6,7%)	2,07 [0,88; 4,85]	0,09
Día transferencia 5-7	0 (0%)	1 (16,7%)	NaN [NaN; NaN]	1
Pequeño para EG (P)	25 (28,7%)	41 (32,5%)	0,88 [0,58; 1,34]	0,56
Día transferencia 2-3	25 (28,7%)	40 (33,3%)	0,86 [0,57; 1,31]	0,48
Día transferencia 5-7	0 (NaN%)	1 (16,7%)	NaN [NaN; NaN]	1
Grande para EG (G)	1 (1,2%)	1 (0,8%)	1,45 [0,09; 23,8]	0,79
Día transferencia 2-3	1 (1,2%)	1 (0,8%)	1,38 [0,09; 21,8]	0,82
Día transferencia 5-7				



RESULTADOS

Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Muy Grande para EG (MG)	0 (0%)	1 (0,8%)	NaN [NaN; NaN]	1
Día transferencia 2-3	0 (0%)	1 (0,8%)	NaN [NaN; NaN]	1
Día transferencia 5-7				
Z-score	-0,85 ± 0,95	-0,82 ± 0,96		0,78
Día transferencia 2-3	-0,85 ± 0,95	-0,83 ± 0,97		0,84
Día transferencia 5-7				
Talla (cm)	47,0 ± 2,8	46,4 ± 3,5		0,34
Día transferencia 2-3	47,0 ± 2,8	46,5 ± 3,5		0,39
Día transferencia 5-7	32,2 ± 2,2	32,1 ± 1,7		0,88
Perímetro craneal (cm)	32,7 ± 1,3	32,5 ± 2,1		0,63
Día transferencia 2-3	32,7 ± 1,3	32,5 ± 2,2		0,71
Día transferencia 5-7	46,1 ± 3,5	44,0 ± 5,4		0,27
Test Apgar 1 minuto	8,6 ± 1,0	8,5 ± 1,5		0,60
Día transferencia 2-3	8,6 ± 1,0	8,5 ± 1,5		0,69
Día transferencia 5-7	9,5 ± 0,5	8,0 ± 0		9,6e-05*
Test Apgar 5 minutos	9,5 ± 0,7	9,6 ± 0,7		0,42
Día transferencia 2-3	9,5 ± 0,7	9,6 ± 0,7		0,41
Día transferencia 5-7	10,0 ± 0	9,0 ± 0		NA
Test Apgar 10 minutos	9,8 ± 0,5	9,8 ± 0,6		0,68
Día transferencia 2-3	9,8 ± 0,5	9,8 ± 0,6		0,68
Día transferencia 5-7	10,0 ± 0	NaN ± NA		NA

Tabla 33 Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares (TE en fresco), NA/NaN: No aplica/Not a Number

Para el conjunto de datos de los embarazos gemelares con TE postcriopreservados se encuentran diferencias para el test de Apgar pasados 1 minuto y 5 minutos pero solamente cuando la transferencia embrionaria se produce en día 5-7.

Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares (TEC)				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV únicos	46	56		
Día transferencia 2-3	28	36		
Día transferencia 5-7	18	20		
Proporción RNV femeninas	25 (54,4%)	31 (55,4%)	0,98 [0,69; 1,40]	0,92
Día transferencia 2-3	17 (60,7%)	16 (44,4%)	1,37 [0,85; 2,19]	0,20
Día transferencia 5-7	8 (44,4%)	15 (75,0%)	0,59 [0,33; 1,05]	0,06
RNV Muy Prematuro	6 (13%)	4 (7,1%)	1,83 [0,55; 6,08]	0,32
Día transferencia 2-3	6 (21,4%)	2 (5,6%)	3,86 [0,84; 17,7]	0,07
Día transferencia 5-7	0 (0%)	2 (10%)	NaN [NaN; NaN]	1
RNV Prematuro	30 (65,2%)	38 (67,9%)	0,96 [0,73; 1,27]	0,78
Día transferencia 2-3	22 (78,6%)	28 (77,8%)	1,01 [0,78; 1,31]	0,94
Día transferencia 5-7	8 (44,4%)	10 (50%)	0,89 [0,45; 1,75]	0,73
Peso (g)	2162 ± 554	2126 ± 672		0,80
Día transferencia 2-3	1907 ± 532	2022 ± 712		0,54
Día transferencia 5-7	2445 ± 437	2436 ± 421		0,96
Peso muy Bajo (PMB)	6 (13,0%)	4 (7,1%)	1,83 [0,55; 6,08]	0,33
Día transferencia 2-3	5 (17,9%)	4 (11,1%)	1,61 [0,48; 5,44]	0,44
Día transferencia 5-7	1 (5,6%)	0 (0%)	NaN [NaN; NaN]	1
Peso Bajo (PB)	25 (54,4%)	27 (48,2%)	1,13 [0,77; 1,65]	0,54
Día transferencia 2-3	18 (64,3%)	23 (63,9%)	1,01 [0,70; 1,46]	0,97
Día transferencia 5-7	7 (38,9%)	4 (20,0%)	1,94 [0,68; 5,56]	0,21



RESULTADOS

Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Peso Alto (PA)				
Día transferencia 2-3				
Día transferencia 5-7				
Peso Bajo a Término (PBT)	3 (6,5%)	5 (8,9%)	0,73 [0,18; 2,9]	0,65
Día transferencia 2-3	0 (0%)	4 (11,1%)	NaN [NaN; NaN]	1
Día transferencia 5-7	3 (16,7%)	1 (5%)	3,33 [0,38; 29,3]	0,27
Disparidad entre pesos RNV	344 ± 309	265 ± 257		0,22
Día transferencia 2-3	329 ± 342	278 ± 276		0,56
Día transferencia 5-7	361 ± 276	228 ± 197		0,19
Edad Gestacional (EG)	35,1 ± 3,1	35,2 ± 3,1		0,92
Día transferencia 2-3	34,1 ± 3,6	35,5 ± 2,3		0,07
Día transferencia 5-7	36,6 ± 1,4	34,6 ± 4,5		0,07
Percentiles	25,9 ± -23,7	26,9 ± 25,6		0,87
Día transferencia 2-3	21,0 ± 23,7	23,8 ± 27,0		0,72
Día transferencia 5-7	30,9 ± 23,3	36,2 ± 19,1		0,55
Muy Pequeño para EG (MP)	8 (22,2%)	12 (30%)	0,74 [0,34; 1,61]	0,44
Día transferencia 2-3	4 (22,2%)	12 (40%)	0,56 [0,21; 1,46]	0,21
Día transferencia 5-7	4 (22,2%)	0 (0%)	NaN [NaN; NaN]	1
Pequeño para EG (P)	14 (38,9%)	12 (30%)	1,30 [0,69; 2,42]	0,42
Día transferencia 2-3	9 (50%)	12 (40%)	1,25 [0,66; 2,36]	0,50
Día transferencia 5-7	5 (27,8%)	0 (0%)	NaN [NaN; NaN]	1
Grande para EG (G)	0 (0%)	2 (5%)	NaN [NaN; NaN]	1
Día transferencia 2-3	0 (0%)	2 (6,7%)	NaN [NaN; NaN]	1
Día transferencia 5-7				
Muy Grande para EG (MG)				
Día transferencia 2-3				
Día transferencia 5-7				
Z-score	-1,38 ± 1,51	-1,26 ± 1,74		0,75
Día transferencia 2-3	-1,77 ± 1,81	-1,5 ± 1,94		0,59
Día transferencia 5-7	-0,93 ± 0,97	-0,58 ± 0,53		0,30
Talla (cm)	46,9 ± 2,7	44,8 ± 4,8		0,10
Día transferencia 2-3	46,2 ± 3,5	44,0 ± 5,4		0,29
Día transferencia 5-7	47,7 ± 1,4	46 ± 3,9		0,22
Perímetro craneal (cm)	32,3 ± 2,2	32,1 ± 1,7		0,88
Día transferencia 2-3	30,3 ± 1,8	32,2 ± 1,8		0,11
Día transferencia 5-7	33,6 ± 1,0	32,0 ± 1,8		0,11
Test Apgar 1 minuto	9,0 ± 0,8	8,6 ± 1,6		0,35
Día transferencia 2-3	8,3 ± 0,5	8,7 ± 1,8		0,63
Día transferencia 5-7	9,5 ± 0,5	8 ± 0		0,01*
Test Apgar 5 minutos	9,6 ± 0,9	9,5 ± 0,7		0,80
Día transferencia 2-3	8,8 ± 1,3	9,6 ± 0,7		0,13
Día transferencia 5-7	10 ± 0	9 ± 0		0,001*
Test Apgar 10 minutos	9,5 ± 1,1	9,8 ± 0,5		0,67
Día transferencia 2-3	8 ± 1,4	9,8 ± 0,5		0,07
Día transferencia 5-7				

Tabla 34 Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares (TEC, transferencias postcriopreservación), NA/NaN: No aplica/ Not a Number

Finalmente cuando se analiza las variables neonatales sin tener en cuenta el tipo de transferencia (en fresco o postcriopreservados), es decir, todo el conjunto de datos de todos los embarazos gemelares, encontramos diferencias estadísticamente significativas para la EG y el perímetro craneal cuando la transferencia embrionaria se produce en estadio de blastocisto (día 5-7), sin embargo no hay diferencias

RESULTADOS

para estas variables cuando no se tiene en cuenta el día de transferencia. Por otro lado, el test de Apgar pasados 1 minuto muestra diferencias en el grupo de TE en día 5-7 y el test de Apgar pasados 5 minutos también muestra diferencias pero esta vez en el grupo de TE en día 2-3.

Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV únicos	154	198		
Día transferencia 2-3	134	172		
Día transferencia 5-7	20	26		
Proporción RNV femeninas	73 (47,4%)	100 (50,5%)	0,94 [0,76; 1,17]	0,56
Día transferencia 2-3	64 (47,8%)	83 (48,3%)	0,99 [0,78; 1,25]	0,93
Día transferencia 5-7	9 (45%)	17 (65,4%)	0,69 [0,39; 1,20]	0,17
RNV Muy Prematuro	8 (5,2%)	12 (6,1%)	0,86 [0,36; 2,05]	0,73
Día transferencia 2-3	8 (6%)	10 (5,8%)	1,03 [0,42; 2,53]	0,95
Día transferencia 5-7	0 (0%)	2 (7,7%)	NaN [NaN; NaN]	1
RNV Prematuro	92 (59,7%)	104 (52,5%)	1,14 [0,95; 1,37]	0,18
Día transferencia 2-3	84 (62,7%)	90 (52,3%)	1,20 [0,99; 1,45]	0,07
Día transferencia 5-7	8 (40%)	14 (53,9%)	0,74 [0,39; 1,41]	0,35
Peso (g)	2310 ± 496	2327 ± 587		0,79
Día transferencia 2-3	2287 ± 504	2322 ± 603		0,61
Día transferencia 5-7	2445 ± 437	2373 ± 408		0,62
Peso muy Bajo (PMB)	9 (5,8%)	12 (6,1%)	0,96 [0,42; 2,23]	0,93
Día transferencia 2-3	8 (6%)	12 (7,0%)	0,86 [0,36; 2,03]	0,72
Día transferencia 5-7	1 (5%)	0 (0%)	NaN [NaN; NaN]	1
Peso Bajo (PB)	75 (48,7%)	97 (49,0%)	0,99 [0,80; 1,23]	0,96
Día transferencia 2-3	68 (50,8%)	88 (51,2%)	0,99 [0,79; 1,24]	0,94
Día transferencia 5-7	7 (35%)	9 (34,6%)	1,01 [0,46; 2,24]	0,98
Peso Alto (PA)				
Día transferencia 2-3				
Día transferencia 5-7				
Peso Bajo a Término (PBT)	15 (9,7%)	30 (15,2%)	0,64 [0,36; 1,15]	0,13
Día transferencia 2-3	12 (9%)	28 (16,3%)	0,55 [0,29; 1,04]	0,06
Día transferencia 5-7	3 (15%)	2 (7,7%)	1,95 [0,36; 10,6]	0,44
Disparidad entre pesos RNV	355 ± 292	302 ± 407		0,21
Día transferencia 2-3	355 ± 296	302 ± 422		0,27
Día transferencia 5-7	361 ± 276	296 ± 223		0,46
Edad Gestacional (EG)	35,9 ± 2,5	36,0 ± 2,8		0,91
Día transferencia 2-3	35,8 ± 2,6	36,1 ± 2,5		0,31
Día transferencia 5-7	36,7 ± 1,3	34,8 ± 4,0		0,05*
Percentiles	28,1 ± 25,7	27,4 ± 24,2		0,80
Día transferencia 2-3	27,6 ± 26,1	26,6 ± 24,5		0,75
Día transferencia 5-7	30,9 ± 23,3	34,3 ± 19,7		0,66
Muy Pequeño para EG (MP)	20 (16,3%)	21 (12,7%)	1,29 [0,73; 2,26]	0,39
Día transferencia 2-3	16 (15,2%)	20 (13,3%)	1,14 [0,62; 2,10]	0,67
Día transferencia 5-7	4 (22,2%)	1 (6,3%)	3,56 [0,44; 28,6]	0,22
Pequeño para EG (P)	39 (31,7%)	53 (31,9%)	0,99 [0,71; 1,40]	0,97
Día transferencia 2-3	34 (32,4%)	52 (34,7%)	0,93 [0,66; 1,33]	0,70
Día transferencia 5-7	5 (27,8%)	1 (6,3%)	4,44 [0,58; 34,1]	0,13
Grande para EG (G)	1 (0,8%)	3 (1,8%)	0,45 [0,05; 4,27]	0,49
Día transferencia 2-3	1 (1%)	3 (2%)	0,48 [0,05; 4,52]	0,52
Día transferencia 5-7				
Muy Grande para EG (MG)	0 (0%)	1 (0,5%)	NaN [NaN; NaN]	1
Día transferencia 2-3	0 (0%)	1 (0,6%)	NaN [NaN; NaN]	1
Día transferencia 5-7				



RESULTADOS

Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Z-score	-1,01 ± 1,17	-0,92 ± 1,20		0,52
Día transferencia 2-3	-1,02 ± 1,20	-0,96 ± 1,25		0,66
Día transferencia 5-7	-0,94 ± 0,97	-0,60 ± 0,62		0,25
Talla (cm)	47,0 ± 2,8	46,1 ± 3,8		0,10
Día transferencia 2-3	46,9 ± 2,9	46,1 ± 3,9		0,22
Día transferencia 5-7	47,6 ± 1,4	45,8 ± 3,5		0,12
Perímetro craneal (cm)	32,6 ± 1,5	32,4 ± 2,1		0,63
Día transferencia 2-3	32,5 ± 1,5	32,5 ± 2,1		0,94
Día transferencia 5-7	33,6 ± 1,0	31,8 ± 1,5		0,04*
Test Apgar 1 minuto	8,7 ± 1,0	8,5 ± 1,5		0,34
Día transferencia 2-3	8,6 ± 1,0	8,5 ± 1,5		0,85
Día transferencia 5-7	9,5 ± 0,5	7,8 ± 1,3		0,01*
Test Apgar 5 minutos	9,5 ± 0,7	9,6 ± 0,7		0,55
Día transferencia 2-3	9,4 ± 0,8	9,6 ± 0,7		0,001*
Día transferencia 5-7	10,0 ± 0	9,3 ± 0,5		0,06
Test Apgar 10 minutos	9,8 ± 0,7	9,8 ± 0,5		0,94
Día transferencia 2-3	9,7 ± 0,7	9,8 ± 0,5		0,72
Día transferencia 5-7				

Tabla 35 Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares, NA/NaN: No aplica/Not a Number

Por otro lado, se analizó la incidencia de malformaciones de los RNV, en este caso no se diferenció entre los tipos de TE (en fresco o en congelado), ni tampoco según el día de transferencia (día 2-3 o día 5-7) debido a la baja incidencia de malformaciones en los RNV. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las malformaciones menores ni tampoco para las mayores. Como malformaciones mayores se encontraron atresia anal, fisura palatina y craneosinostosis, como malformaciones menores se encontraron sindactilia, dilatación de uréter y riñón, pies zambos, dedos pulgares en flexión y fosita sacra.

Malformaciones congénitas en embarazos únicos				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV únicos	259	281		
Malformaciones mayores	8 (3,1%)	2 (0,7%)	1,2 [0,51; 2,83]	0,07
Malformaciones menores	2 (0,8%)	1 (0,4%)	0,6 [0,08; 4,54]	0,07

Tabla 36 Incidencia de malformaciones congénitas en embarazos únicos

Malformaciones congénitas en embarazos gemelares				
Variables	[O ₂ 6%]	[O ₂ 20%]	RR [IC 95%]	p
Número de RNV gemelares	154	198		
Malformaciones mayores	1 (0,7%)	3 (1,5%)	0,43 [0,05; 4,08]	0,63
Malformaciones menores	0	0		

Tabla 37 Incidencia de malformaciones congénitas en embarazos gemelares

Finalmente se ha analizado si el proceso de vitrificación de los embriones afecta al peso de los RNV sin tener en cuenta la concentración de oxígeno en la que fueron cultivados. Se ha podido observar que el proceso de vitrificación de los embriones no afecta al peso de los RNV de gestaciones únicas, la media de peso en el caso de los RNV que proviene de transferencias en fresco es de 3217 g y de los RNV que provienen de transferencias embrionarias postcriopreservación es de 3220 g. Sin embargo, en el caso de las gestaciones gemelares, sí que se observa una diferencia estadísticamente significativa, en el caso

RESULTADOS

de los RNV de transferencias en fresco, el peso es de 2374 g y cuando se producen postcriopreservación es de 2162g ($p=0,03$).

6. DISCUSIÓN

El entorno biológico de los gametos y preembriones femeninos humanos generados *ex vivo* tras la aplicación de las técnicas de RA, aún siendo capaz conservar su viabilidad durante su cultivo, está lejos de ser el entorno fisiológico ideal. Las concentraciones de oxígeno *in vivo* de los líquidos foliculares, trompas de Falopio y cavidades uterinas (Yedwab, Paz, Homonnai, David, & Kraicer, 1976; Fischer, Künzel, Kleinstein, & Gips, 1992), son mucho más bajas que las que se utilizan actualmente en muchos laboratorios de FIV para el cultivo embrionario, que se basan en la concentración de oxígeno atmosférico y podrían provocar un cierto grado de toxicidad para preembriones (Waldenström, Engström, Hellberg, & Nilsson, 2009). Los resultados clínicos han mejorado significativamente en los últimos años ya que se han ido incorporando diferentes mejoras al cultivo embrionario *in vitro* (Catt & Henman, 2000; Swain, 2010a; Swain, 2010b; Christianson *et al.*, 2014). La concentración de oxígeno se considera un punto crítico en los sistemas de cultivo *in vitro*. De hecho, existen estudios en ratones que han revelado que los preembriones generados con menos del 5% de oxígeno se parecen más a los preembriones desarrollados *in vivo* (Garrisi *et al.*, 1993; Rinaudo, Giritharan, Talbi, Dobson, & Schultz, 2006).

A partir de los estudios con modelos animales se asume que el uso de oxígeno atmosférico puede ser perjudicial para los preembriones en cultivo. Estos estudios han demostrado que la utilización de baja concentración de oxígeno durante el cultivo de preembriones pueden condicionar los patrones de expresión génica (metiloma), el metabolismo energético, proteoma y así como el metaboloma (Garrisi *et al.*, 1993; Swain, 2010a; Swain, 2010b; Katz-Jaffe, Linck, Schoolcraft, & Gardner, 2005; Rinaudo, Giritharan, Talbi, Dobson, & Schutlz, 2006; Kattal, Cohen, & Barmat, 2008). En el modelo de ratón, la utilización de una concentración de oxígeno del 20% durante el cultivo embrionario se disminuye de la expresión de algunas proteínas o biomarcadores de viabilidad embrionaria, mientras que los preembriones cultivados a bajas concentraciones de oxígeno muestran un perfil de expresión proteica similar a los preembriones *in vivo* (Katz-Jaffe, Linck, Schoolcraft, & Gardner, 2005).

Como se ha mencionado previamente, el efecto del oxígeno durante el cultivo de los preembriones también se ha relacionado con el metabolismo embrionario. Como se desprende de los estudios que lo correlacionan con el aumento del consumo de aminoácidos y de piruvato y una disminución de consumo de glucosa y aminoácidos durante las etapas postcompatación (Wale & Gardner, 2012). Estos dos metabolitos son requeridos por los embriones humanos y de ratón en la etapas inmediatamente previas a la implantación, esto podría explicar el posible efecto negativo de la implantación del preembrión cuando se expone a elevadas concentraciones de oxígeno comparándolo con las concentraciones de oxígeno fisiológicas (Mantikou, Bontekoe, *et al.*, 2013; Nastri *et al.*, 2016; Bagheri *et al.*, 2018).

Otro posible efecto de la tensión de oxígeno atmosférica es el posible impacto sobre la reprogramación genética del preembrión. Existen una serie de cambios dinámicos en la metilación del genoma del preembrión que resultan ser esenciales para la regulación génica y la orquestación de

diversos procesos del desarrollo embrionario (Wu & Zhang, 2010). En la familia de proteínas Tet, formada por diez proteínas distintas, existen tres de ellas que están implicadas en la desmetilación del ADN (Tahiliani *et al.*, 2009). Algunos estudios, han sugerido que existe evidencia clara de que la pérdida de metilación del ADN del genoma paterno es atribuible a la oxidación mediada por las proteínas Tet. Como se ha mencionado, estas proteínas contribuyen a cambios dinámicos en la metilación del ADN y por lo tanto de la expresión génica (Dawlaty *et al.*, 2013; Skiles *et al.*, 2018).

Con respecto a los resultados clínicos, se ha observado que la utilización de un cultivo embrionario con baja concentración de oxígeno muestra beneficios, especialmente cuando se utilizan preembriones en estadio de blastocisto (Mantikou, Bontekoe, *et al.*, 2013; Nastri *et al.*, 2016). En 2016 se publicó una metaanálisis que concluía que la baja concentración de oxígeno mejoraba la tasa de RNV, de gestación evolutiva y clínica en comparación con la concentración de oxígeno atmosférico. Aunque este metaanálisis comentaba que esta ligera diferencia podría deberse a las propia heterogeneidad de los estudios que se incluyeron, algunas de estas limitaciones serían el uso de incubadores distintos (se utilizaron modelos más actuales en el caso del cultivo en baja concentración de O₂), la falta de enmascaramiento de los estudios, la falta de rigor en la secuencia de aleatorización, entre otras (Nastri *et al.*, 2016).

Aun así y con todo ello, está bastante admitido que las condiciones de cultivo óptima para los preembriones humanos, al menos en lo que a cultivo prolongado se refiere, debería estar basadas en baja tensión de oxígeno.

Las últimas mejoras en el cultivo van encaminadas a tratar de aclarar si la mayor reducción en la presión parcial de oxígeno en cultivo, en este caso al 2% podría ser incluso más beneficios. De hecho, estudios más recientes estudiando este aspecto y han observado que incluso pequeñas variaciones de oxígeno durante el cultivo (de 5% a 2%), tiene un impacto en las concentraciones relativas de aminoácidos y metabolitos implicados en la homeostasis redox en esta etapa. Demostrando la influencia del oxígeno en el metabolismo embrionario o en los procesos de adhesión durante la implantación (MUC-1) (Kaser *et al.*, 2018), así como sobre algunos genes de implicados en la invasibilidad y pluripotencia. También enzimas antioxidantes y de apoptosis del blastocisto de manera diferencial, que mejoran la implantación del preembrión en esta etapa de desarrollo (Ma, Chen, & Tzeng, 2017; Bagheri *et al.*, 2018).

Los resultados clínicos, aunque todavía preliminares, sugieren que el rendimiento y la calidad de los blastocistos pueden ser superiores cuando la tensión de O₂ se reduce del 5% al 2% el día 3 (Kaser, Bogale, Sarda, Farland, & Racowsky, 2016), aunque el recuento de células en etapa de blastocito fue menor en el 2%. Cabe decir que esta fue una de las primeras aproximaciones de este tipo de estudios y se usaron preembriones de descarte (preembriones no aptos por calidad para su transferencia). Es por esta razón, que se realizó la exposición de manera secuencial al oxígeno (5% de los días 1 a 3, luego 2% de los días 3 a 5).

Los estudios sobre el efecto a largo plazo del uso de oxígeno atmosférico son escasos, la recopilación de este tipo de datos es importante, ya que existen preocupaciones sobre las posibles consecuencias a largo plazo de cualquier tipo de cambio que podamos introducir durante el preembrión

humano en cultivo *in vitro*, como se ha sugerido para el uso de medios de cultivo o algunos de sus componentes (Zandstra, Van Montfoort, & Dumoulin, 2015; Marianowski, Dąbrowski, Zyguła, Wielgoś, & Szymusik, 2016; Thompson *et al.*, 2016; Chen & Heilbronn, 2017).

En este trabajo, se ha tratado de observar si el uso de la concentración de oxígeno del 6% tiene algún efecto sobre las posibles complicaciones durante el embarazo y los resultados perinatales de los RNV. Hasta donde se ha investigado, este es el primer estudio que analiza la información relevante de los resultados clínicos a largo plazo en dos concentraciones diferentes de oxígeno.

En el presente estudio no se han observado diferencias entre ambos grupos de estudio en cuanto a complicaciones durante la gestación. Son conocidas las posibles complicaciones durante la gestación dónde se encuentra implicada la placenta. Ejemplo de ello serían la preeclampsia, el bajo peso de los RNV, el desprendimiento de placenta o la pérdida tardía del feto (Maheshwari, Kalampokas, Davidson, & Bhattacharya, 2013; Bidarimath & Tayade, 2017; Kingdom, Audette, Hobson, Windrim, & Morgen, 2018; Sultana, Maiti, Dedman, & Smith, 2018). Por otro lado también se conoce la implicación del oxígeno en el desarrollo y la función placentaria (Menon, 2014), de hecho se ha observado que carácter invasivo de las células trofoblásticas en cultivo aumenta bajo un ambiente de hipoxia (Udayashankar *et al.*, 2011). Tratando de extrapolar esta condición a los cultivos embrionarios e hipotetizando que las condiciones a las que se somete el el preembrión *in vitro* pudieran relacionarse con las complicaciones de la gestación; podemos concluir que, en nuestro caso, el cultivo con con baja concentración de oxígeno no tuvo una influencia sobre dicho tipo de complicaciones derivadas de la placenta. La posible causa de la ausencia efecto, podría deberse a que en estadio de células el preembrión aún no presenta células del trofoectodermo, que en este caso serían las células diana a las condiciones de oxígeno. En este sentido sería muy interesante la realización de futuras investigaciones encaminadas a abordar el impacto de la baja y alta concentración de oxígeno en la etapa de blastocisto cuando los pasos iniciales de diferenciación de trofoblasto ya han comenzado a pesar de que la activación del genoma embrionario y los cambios de metabolismo se inician en etapa de preembrión precompactado (Devreker & Englert, 2000; Stokes, Abeydeera, & Leese, 2005; Ménézo, Dale, & Cohen, 2010).

Además del cálculo de las tasas de RNV por ciclo, se desarrolló un modelo de regresión con carácter predictivo mediante regresión de *Poisson*. Mediante este modelo podemos saber para cada grupo de estudio (6% y 20% de oxígeno) cuál es la probabilidad (en %) de obtener una gestación, una gestación clínica, una gestación evolutiva y así para todas la variables obstétricas, según el número de transferencias embrionarias que se realizan. Los modelos predictivos para las diferentes variables obstétricas nos ha mostrado que no difieren demasiado entre ambos grupos y en algunos casos (algún resultado o variable obstétrica) los modelos predictivos están solapados, es decir que las probabilidades son idénticas. Por lo que, se puede concluir que las probabilidades de éxito de los tratamientos de FIV no serán distintos según si los embriones se han cultivado en 6% o 20% de oxígeno.

Las variables antropométricas, como el perímetro craneal, el peso y la estatura en niños; están desbalanceadas entre otros parámetros, en función del sexo y la edad gestacional (EG), así como otros parámetros que afectan la normalidad de los datos antropométricos son la etnia, el IMC de la madre o la

paridad, e incluso, la renta familiar. La comparabilidad de medidas antropométricas de un niño con sus semejantes permite identificar problemas de nutrición u hormonales. En niños recién nacidos puede ser una alerta de malformación o fallo gestacional.

La designación de un niño con retraso del crecimiento implica algunos medios de comparación con un niño de "referencia" de la misma edad y sexo. Por lo tanto, en términos prácticos, los valores antropométricos deben compararse entre individuos o poblaciones en relación con un conjunto aceptable de valores de referencia. Esta necesidad ha hecho de la elección de una población de referencia para el crecimiento ("Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee.," 1995).

En el presente trabajo no se encuentran diferencias en las tasas de RNV entre ambos grupos de estudio. Tampoco se encuentran diferencias estadísticamente diferentes, a nivel de resultados perinatales entre ambos grupos de estudio, que se han analizado según la multiplicidad de las gestaciones (recién nacidos únicos o gemelos). En algunos estudios, se ha observado que cuando según el número de preembriones transferidos el peso del recién nacido resultante de la gestación se ve afectado (Grady, Alavi, Vale, Khandwala, & McDonald, 2012; Pinborg *et al.*, 2013). En este estudio, no se ha considerado como factor de confusión para el ajuste de los modelos matemáticos, aunque podemos observar en los resultados que tampoco existen diferencias estadísticamente significativas en el número de preembriones transferidos en ambos grupos.

El peso del RNV, ha sido históricamente utilizado como un indicador de salud neonatal. Se ha documentado de forma extensa, que los resultados neonatales después de la utilización de las TRA son peores que cuando la descendencia se concibe de forma espontánea (Pinborg *et al.*, 2013; Henningsen & Pinborg, 2014; Gu *et al.*, 2016; Qin, Liu, Sheng, Wang, & Gao, 2016). El peso del RNV parece ser sensiblemente inferior después de las TRA, aunque existen diferencias entre las mismas TRA. Por ejemplo, los resultados perinatales de los niños nacidos de preembriones postcriopreservados parecen ser similares que cuando la transferencia embrionaria se realiza en fresco, aunque muestran un peso medio superior que los que se transfieren en fresco (Maas, Galkina, Thornton, Penzias, & Sakkas, 2016).

Los datos que se presentan en este trabajo, muestran que en los RNV únicos no existe un efecto de la concentración de oxígeno ni del procedimiento de congelación sobre el peso de los RNV procedentes de gestaciones únicas. Lo cual, está desacuerdo con los datos previos publicados donde se compara la transferencia en fresco vs la transferencia postcriopreservación (Pinborg *et al.*, 2013; Maas, Galkina, Thornton, Penzias, & Sakkas, 2016). Incluso, existe otro estudio del 2014, donde se concluye que la transferencia de preembriones postcriopreservados provoca que haya mayor incidencia el síndrome de descendencia gigante (*Large Offspring Syndrome*, LOS) y macrosomía en humanos (Pinborg *et al.*, 2014). Además, también se ha observado una mayor incidencia de desórdenes relacionados con la hipertensión durante la gestación cuando se realizan transferencias de preembriones postcriopreservados comparándolo con transferencias de preembriones en fresco (Opdahl *et al.*, 2015). Por otro lado, existen estudios que relacionan la estimulación ovárica mediante hormonas con la disminución del peso de los

RNV cuando se comparan con RNV donde la madre ha optado por un ciclo natural de FIV (sin estimulación ovárica) (Mak *et al.*, 2016).

En cuanto a la incidencia de malformaciones, tampoco se puede concluir si realmente existe un efecto de la concentración de oxígeno ya que la muestra que se obtiene en el presente estudio es muy pequeña. Además, dependiendo del grupo analizado, transferencia en fresco o desvitrificados dan resultados opuestos por un lado en transferencias de embriones en fresco la utilización de baja tensión de oxígeno incrementaría los casos de malformaciones, mientras que este efecto desaparecería si el preembrión se vitrificara, inclinándose, de hecho, la incidencia al grupo en el que se utilizó concentración de oxígeno atmosférico.

Existen algunas variables, que según el grupo de RNV analizados resultan estadísticamente significativas aunque no podemos decir que estas diferencias se deban al efecto de la concentración de oxígeno. Ya que, para poder llegar a esa conclusión deberían encontrarse diferencias en todos los grupos analizados o en casi todos ellos, y eso no es así. Un claro ejemplo es la puntuación del test de Apgar pasado un minuto del nacimiento, en el grupo de RNV de embarazos únicos con transferencia de embriones postcriopreservados, únicamente en día 2-3 de transferencia y en el grupo de RNV de embarazos gemelares con transferencia en fresco, cuando la transferencia de blastocistos, día 5-7.

Esta diferencia solamente se encuentra en estos dos grupos ya que no existen diferencias cuando se considera todo en conjunto sin tener en cuenta el día de transferencia, por lo que podemos decir que esto seguramente es debido a un tamaño muestral reducido de RNV en ambos grupos.

Es importante comentar las limitaciones del estudio, entre ellas la no inclusión en el análisis estadístico de variables paternas, entre ellas la edad, que pudieran condicionar algunos de los resultados. Así como, el sesgo de información debido a la forma de recogida de los informes/aparatología/protocolos de los hospitales/clínicas donde se recogerán los datos perinatales/neonatales. Otras limitaciones son de tipo metodológico relacionadas con la dificultad de mantener baja tensión de oxígeno en procesos diferentes del cultivo embrionario. Esto es, durante la obtención de los ovocitos, la valoración de la fecundación o durante la realización del ICSI, o tras la descongelación de los embriones y su cultivo hasta la transferencia). Finalmente, se desprende del cálculo para el estudio de los resultados neonatales, que la casuística es limitada, así lo revela el cálculo de la potencia estadística referente a la tasa de RNV que se ha realizado en el apartado de material y métodos donde se observa que la potencia estadística es baja y que se debería plantear un nuevo estudio donde se añadieran más datos y así aumentar el tamaño muestral.

A pesar de las limitaciones, sería injusto no hablar también de sus fortalezas, a nuestro juicio éstas estriban en la aleatoriedad de las muestras que componen el grueso del estudio y en la homogeneidad de los datos analizados, que aumentan ligeramente su potencia. En cuanto, a la validez externa podemos decir que es útil para el cultivo de los embriones hasta día 3 y para casos de recepción de ovocitos que representan una gran cantidad de ciclos en muchos centros de RA. Las donantes de ovocitos siempre son muy similares entre ellas (características del estado de salud) en todos los centros, ya que tienen que cumplir unos criterios estrictos. Actualmente la donación de ovocitos es una práctica

muy habitual en los centros de reproducción asistida por lo que la aplicabilidad del estudio también es alta.

Por otro lado, hasta la fecha este es el único estudio que analiza las variables obstétricas y perinatales de los niños que nacieron de preembriones que fueron cultivados en alta y baja tensión de oxígeno y además pone de manifiesto que el cultivo en condiciones de presión de oxígeno atmosférica no afecta de forma negativa a los cultivos ni a la salud a corto plazo de los niños nacidos con el consiguiente efecto sobre los análisis de coste-beneficio en el entorno del laboratorio de FIV.

7. CONCLUSIONES

Al final de este trabajo de investigación para la realización de la presente tesis doctoral, se puede concluir finalmente que:

- A pesar de la potencia limitada del estudio este trabajo representa una de las primeras publicaciones abordando las variables obstétricas y perinatales/neonatales en recién nacidos vivos que proceden de embriones que han sido cultivados en dos condiciones diferentes de presiones parciales de oxígeno.
- Ni la tasa de nacido vivo por ciclo ni la tasa de parto se ha visto mejoradas cuando se utiliza baja concentración de oxígeno durante el cultivo embrionario en estadios temprano de desarrollo.
- Así mismo las tasas acumuladas de gestación y RNV por ciclo, tampoco parecen verse influenciadas por la concentración de oxígeno durante el cultivo.
- En general, los resultados obstétricos y perinatales/neonatales no parecen estar influenciados por la tensión de oxígeno durante el cultivo embrionario hasta día 3 de desarrollo.
- La criopreservación embrionaria, a pesar de dar lugar a una menor tasa de recién nacido vivo con respecto a los ciclos en fresco, ya que por lo general se trata de embriones de peor fenotipo, no parece condicionar los resultados obstétricos y perinatales/neonatales de los preembriones que han sido cultivados en alta o baja tensión de oxígeno.
- Específicamente con respecto al peso de los RNV utilizado históricamente como marcador de la salud neonatal, las concentraciones de oxígeno durante el cultivo no parecen haber tenido un efecto en éste tanto en los RNV procedentes de las gestaciones únicas como de las gestaciones gemelares.
- La falta de control del factor masculino como la edad, o hábitos de salud podría ser un sesgo en los resultados, sin embargo la naturaleza aleatoria del estudio de la mayoría de los casos estudiados podría estar compensando este sesgo.
- Se necesitan más estudios en un futuro que nos permitan confirmar los resultados obtenidos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, P. A., & Bolton, V. N. (1995). The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* (Cambridge, England), 3(4), 357–365.
- Bagheri, D., Kazemi, P., Sarmadi, F., Shamsara, M., Hashemi, E., Daliri Joupari, M., & Dashtizad, M. (2018, September). Low oxygen tension promotes invasive ability and embryo implantation rate. *Reproductive Biology*, pp. 295–300.
- Baird, D. T., Bhattacharya, S., Devroey, P., Diedrich, K., Evers, J. L. H., Fauser, B. C. J. M., ... Veiga, A. (2013). Failures (with some successes) of assisted reproduction and gamete donation programs. *Human Reproduction Update*, 19(4), 354–365.
- Barak, Y., Goldman, S., Gonen, Y., Nevo, Z., Bartoov, B., & Kogosowski, A. (1998). Does glucose affect fertilization, development and pregnancy rates of human in-vitro fertilized oocytes? *Human Reproduction* (Oxford, England), 13 Suppl 4, 203–211.
- Barnes, F. L., Crombie, A., Gardner, D. K., Kausche, A., Lacham-Kaplan, O., Suikkari, A. M., ... Trounson, A. O. (1995). Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Human Reproduction* (Oxford, England), 10(12), 3243–3247.
- Bavister, B. D. (1992). Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Human Reproduction* (Oxford, England), 7(10), 1339–1341.
- Bavister, B. D. (1999). Glucose and culture of human embryos. *Fertility and Sterility*, 72(2), 233–234.
- Bellver, J., De los Santos, M. J., Alamá, P., Castelló, D., Privitera, L., Galliano, D., ... Domínguez, F. (2015). Day-3 embryo metabolomics in the spent culture media is altered in obese women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 103(6), 1407–1415.e1.
- Berlin, I., Golmard, J.-L., Jacob, N., Tanguy, M.-L., & Heishman, S. J. (2017). Cigarette Smoking During Pregnancy: Do Complete Abstinence and Low Level Cigarette Smoking Have Similar Impact on Birth Weight? *Nicotine & Tobacco Research*, 19(5), 518–524.
- Bidarimath, M., & Tayade, C. (2017). Pregnancy and spontaneous fetal loss: A pig perspective. *Molecular Reproduction and Development*, 84(9), 856–869.
- Biggers, J. D., Gwatkin, R. B., & Brinster, R. L. (1962). Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature*, 194, 747–749.
- Biggers, J. D. (1998). Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *The International Journal of Developmental Biology*, 42(7), 879–884.
- Biggers, J. D. (2000). Ethical issues and the commercialization of embryo culture media. *Reproductive Biomedicine Online*, 1(3), 74–76.
- Bongso, A., Ng, S. C., Sathanathan, H., Ng, P. L., Rauff, M., & Ratnam, S. S. (1989). Establishment of human ampullary cell cultures. *Human Reproduction* (Oxford, England), 4(5), 486–494.
- Bongso, A., Ng, S. C., Fong, C. Y., Mok, H., Ng, P. L., & Ratnam, S. S. (1991). Cocultures in human assisted reproduction. Support of embryos in vitro and their specificity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 626, 438–444.
- Bongso, T. A., Fong, C. Y., Ng, S. C., & Ratnam, S. S. (1992). Human ampullary co-cultures for blastocyst transfer in assisted reproduction. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 21(4), 571–575.
- Bongso, A., & Tan, S. (2005). Human blastocyst culture and derivation of embryonic stem cell lines. *Stem Cell Reviews*, 1(2), 87–98.
- Bontekoe, S., Mantikou, E., van Wely, M., Seshadri, S., Repping, S., & Mastenbroek, S. (2012). Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7), CD008950.
- Booth, P. J., Holm, P., & Callesen, H. (2005). The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology*, 63(7), 2040–2052.
- Booth, P. J., Watson, T. J., & Leese, H. J. (2007). Prediction of porcine blastocyst formation using morphological, kinetic, and amino acid depletion and appearance criteria determined during the early cleavage of in vitro-produced embryos. *Biology of Reproduction*, 77(5), 765–779.
- Borland, R. M., Biggers, J. D., Lechene, C. P., & Taymor, M. L. (1980). Elemental composition of fluid in the

- human Fallopian tube. *Journal of Reproduction and Fertility*, 58(2), 479–482.
- Brinster, R. L. (1963). A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Experimental Cell Research*, 32, 205–208.
- Brinster, R. L. (1965a). Studies on the development of mouse embryos in vitro. III. The effect of fixed-nitrogen source. *The Journal of Experimental Zoology*, 158, 69–77.
- Brinster, R. L. (1965b). Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolality and hydrogen ion concentration. *The Journal of Experimental Zoology*, 158, 49–57.
- Brinster, R. L. (1965c). Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. *The journal of experimental zoology*, 158, 59–68.
- Brison, D. R., Hollywood, K., Arnesen, R., & Goodacre, R. (2007). Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(3), 296–302.
- Byatt-Smith, J. G., Leese, H. J., & Gosden, R. G. (1991). An investigation by mathematical modelling of whether mouse and human preimplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxygen by diffusion. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 6(1), 52–57.
- Catt, J. W., & Henman, M. (2000). Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15 Suppl 2, 199–206.
- Ceelen, M., & Vermeiden, J. P. (2001). Health of human and livestock conceived by assisted reproduction. *Twin Research : The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, 4(5), 412–416.
- Ceelen, M., van Weissenbruch, M. M., Vermeiden, J. P. W., van Leeuwen, F. E., & Delemarre-van de Waal, H. A. (2008). Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1662–1673.
- Ceelen, M., van Weissenbruch, M. M., Prein, J., Smit, J. J., Vermeiden, J. P. W., Spreeuwenberg, M., ... Delemarre-van de Waal, H. A. (2009). Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8-18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents. *Human Reproduction*, 24(11), 2788–2795.
- Cha, K. Y., Han, S. Y., Chung, H. M., Choi, D. H., Lim, J. M., Lee, W. S., ... Yoon, T. K. (2000). Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 73(5), 978–983.
- Chambers, G. M., Lee, E., Hoang, V. P., Hansen, M., Bower, C., & Sullivan, E. A. (2014). Hospital utilization, costs and mortality rates during the first 5 years of life: a population study of ART and non-ART singletons. *Human Reproduction*, 29(3), 601–610.
- Chan, P. J., Seraj, I. M., Kalugdan, T. H., & King, A. (1995). Blastocysts exhibit preferential uptake of DNA fragments from the E6-E7 conserved region of the human papillomavirus. *Gynecologic Oncology*, 58(2), 194–197.
- Chatot, C. L., Ziomek, C. A., Bavister, B. D., Lewis, J. L., & Torres, I. (1989). An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86(2), 679–688.
- Chen, F. C., & Li, W. H. (2001). Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees. *American Journal of Human Genetics*, 68(2), 444–456.
- Chen, M., Wu, L., Zhao, J., Wu, F., Davies, M. J., Wittert, G. A., ... Heilbronn, L. K. (2014). Altered Glucose Metabolism in Mouse and Humans Conceived by IVF. *Diabetes*, 63(10), 3189–3198.
- Chen, M., & Heilbronn, L. K. (2017). The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART). *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(04), 388–402.
- Christianson, M. S., Zhao, Y., Shoham, G., Granot, I., Safran, A., Khafagy, A., ... Shoham, Z. (2014). Embryo catheter loading and embryo culture techniques: results of a worldwide Web-based survey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(8), 1029–1036.
- Chronopoulou, E., & Harper, J. C. (2015). IVF culture media: past, present and future. *Human Reproduction Update*, 21(1), 39–55.
- Cimadomo, D., Scarica, C., Maggiulli, R., Orlando, G., Soscia, D., Albricci, L., ... Rienzi, L. (2018). Continuous embryo culture elicits higher blastulation but similar cumulative delivery rates than sequential: a large prospective study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(7), 1329–1338.
- Clark, A. R., Stokes, Y. M., Lane, M., & Thompson, J. G. (2006). Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction (Cambridge,*

- England), 131(6), 999–1006.
- Coates, A., Rutherford, A. J., Hunter, H., & Leese, H. J. (1999). Glucose-free medium in human in vitro fertilization and embryo transfer: a large-scale, prospective, randomized clinical trial. *Fertility and Sterility*, 72(2), 229–232.
- Conaghan, J., Handyside, A. H., Winston, R. M., & Leese, H. J. (1993). Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(1), 87–95.
- Conaghan, J., Hardy, K., Handyside, A. H., Winston, R. M., & Leese, H. J. (1993). Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 10(1), 21–30.
- Corrêa, G. A., Rumpf, R., Mundim, T. C. D., Franco, M. M., & Dode, M. A. N. (2008). Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 104(2–4), 132–142.
- Davies, M. J., Moore, V. M., Willson, K. J., Van Essen, P., Priest, K., Scott, H., ... Chan, A. (2012). Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects. *New England Journal of Medicine*, 366(19), 1803–1813.
- Davis, D. L. (1985). Culture and storage of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 33, 115–124.
- Dawlaty, M. M., Breiling, A., Le, T., Raddatz, G., Barrasa, M. I., Cheng, A. W., ... Jaenisch, R. (2013). Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development. *Developmental Cell*, 24(3), 310–323.
- De los Santos, M. J., Mercader, A., Francés, A., Portolés, E., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (1996). Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biology of Reproduction*, 54(3), 563–574.
- De los Santos, M. J., Gámiz, P., Albert, C., Galán, A., Vitoria, T., Pérez, S., ... Remohí, J. (2013). Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles. *Fertility and Sterility*, 100(2), 402–407.
- De los Santos, M. J., Gámiz, P., De los Santos, J. M., Romero, J. L., Prados, N., Alonso, C., ... Dominguez, F. (2015). The Metabolomic Profile of Spent Culture Media from Day-3 Human Embryos Cultured under Low Oxygen Tension. *PLOS ONE*, 10(11), e0142724.
- De Silva, M. (1998). Culturing human embryos with and without glucose. *Fertility and Sterility*, 69(5), 970–971.
- De Vos, A., Van De Velde, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (2003). Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 79(1), 42–48.
- Desai, N., Abdelhafez, F., Bedaiwy, M. A., & Goldfarb, J. (2008). Live births in poor prognosis IVF patients using a novel non-contact human endometrial co-culture system. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(6), 869–874.
- Devreker, F., & Englert, Y. (2000). In vitro development and metabolism of the human embryo up to the blastocyst stage. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 92(1), 51–56.
- Devroey, P., Silber, S., Nagy, Z., Liu, J., Tournaye, H., Joris, H., ... Van Steirteghem, A. (1995). Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(4), 903–906.
- Dieamant, F., Petersen, C. G., Mauri, A. L., Comar, V., Mattila, M., Vagnini, L. D., ... Franco Júnior, J. G. (2017). Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assisted Reproduction*, 21(3), 240–246.
- Domínguez, F., Castelló, D., Remohí, J., Simón, C., & Cobo, A. (2013). Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertility and Sterility*, 99(2), 565–572.e3.
- Dumoulin, J. C., Land, J. A., Van Montfoort, A. P., Nelissen, E. C., Coonen, E., Derhaag, J. G., ... Evers, J. L. (2010). Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Human Reproduction*, 25(3), 605–612.
- Dunning, K. R., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2014). Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and α -oxidation. *Reproduction*, 148(1), R15–R27.
- Dyer, S., Chambers, G. M., de Mouzon, J., Nygren, K. G., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., ... Adamson, G. D. (2016). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world

- report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Human Reproduction* (Oxford, England), 31(7), 1588–1609.
- Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Jesacher, K., & Tews, G. (2001). A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(12), 623–628.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Yaman, C., Pfeleger, U., & Tews, G. (2002). First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Human Reproduction* (Oxford, England), 17(9), 2415–2418.
- Edwards, J. L., Ealy, A. D., & Hansen, P. J. (1995). Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology*, 44(3), 329–337.
- Edwards, L. J., Batt, P. A., Gandolfi, F., & Gardner, D. K. (1997). Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: Changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 46(2), 146–154.
- El Mouatassim, S., Guérin, P., & Ménéz, Y. (1999). Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction*, 5(8), 720–725.
- Farquhar, C., Rishworth, J. R., Brown, J., Nelen, W. L., & Marjoribanks, J. (2015). Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7), CD010537.
- Feuer, S. K., & Rinaudo, P. F. (2017). Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of in vitro fertilization (IVF) in the mouse. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(4), 403–410.
- Finnström, O., Källén, B., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.-G., & Olausson, P. O. (2011). Maternal and child outcome after in vitro fertilization - a review of 25 years of population-based data from Sweden. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 90(5), 494–500.
- Fischer, B., Künzel, W., Kleinstein, J., & Gips, H. (1992). Oxygen tension in follicular fluid falls with follicle maturation. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 43(1), 39–43.
- Gardner, D. K., & Leese, H. J. (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(1), 361–368.
- Gardner, D. K., Lane, M., Calderon, I., & Leeton, J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility*, 65(2), 349–353.
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1996). Alleviation of the “2-cell block” and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reproduction* (Oxford, England), 11(12), 2703–2712.
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction* (Oxford, England), 13 Suppl 3, 148–59; discussion 160.
- Gardner, D. K. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, 49(1), 83–102.
- Gardner, D. K., Lane, M. W., & Lane, M. (2000). EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Molecular Reproduction and Development*, 57(3), 256–261.
- Gardosi, J., Chang, A., Kalyan, B., Sahota, D., & Symonds, E. M. (1992). Customised antenatal growth charts. *Lancet* (London, England), 339(8788), 283–287.
- Gardosi, J., Mongelli, M., Wilcox, M., & Chang, A. (1995). An adjustable fetal weight standard. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 6(3), 168–174.
- Garrisi, G. J., Chin, A. J., Dolan, P. M., Nagler, H. M., Vasquez-Levin, M., Navot, D., & Gordon, J. W. (1993). Analysis of factors contributing to success in a program of micromanipulation-assisted fertilization. *Fertility and Sterility*, 59(2), 366–374.
- Gosden, R. G., & Byatt-Smith, J. G. (1986). Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. *Human Reproduction* (Oxford, England), 1(2), 65–68.
- Grady, R., Alavi, N., Vale, R., Khandwala, M., & McDonald, S. D. (2012). Elective single embryo transfer and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 97(2), 324–

- 331.e8.
- Gu, F., Deng, M., Gao, J., Wang, Z., Ding, C., Xu, Y., & Zhou, C. (2016). The effects of embryo culture media on the birthweight of singletons via fresh or frozen-thawed embryo transfer: a large-scale retrospective study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 16(1), 270.
- Hadlock, F. P., Harrist, R. B., & Martinez-Poyer, J. (1991). In utero analysis of fetal growth: a sonographic weight standard. *Radiology*, 181(1), 129–133.
- Hamilton, B. H., & McManus, B. (2012). The effects of insurance mandates on choices and outcomes in infertility treatment markets. *Health Economics*, 21(8), 994–1016.
- Hansen, M., Kurinczuk, J. J., Milne, E., de Klerk, N., & Bower, C. (2013). Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(4), 330–353.
- Hardarson, T., Ahlstrom, A., Rogberg, L., Botros, L., Hillensjo, T., Westlander, G., ... Wikland, M. (2012). Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Human Reproduction*, 27(1), 89–96.
- Hardy, K., Hooper, M. A., Handyside, A. H., Rutherford, A. J., Winston, R. M., & Leese, H. J. (1989). Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 4(2), 188–191.
- Hart, R., & Norman, R. J. (2013a). The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I--General health outcomes. *Human Reproduction Update*, 19(3), 232–243.
- Hart, R., & Norman, R. J. (2013b). The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment. Part II--Mental health and development outcomes. *Human Reproduction Update*, 19(3), 244–250.
- Hassan-Ali, H., Hisham-Saleh, A., El-Gezeiry, D., Baghdady, I., Ismaeil, I., & Mandelbaum, J. (1998). Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(12), 3425–3430.
- He, M., Zhao, L., & Powell, W. B. (2010). Optimal control of dosage decisions in controlled ovarian hyperstimulation. *Annals of Operations Research*, 178(1), 223–245.
- Henningsen, A.-K. A., & Pinborg, A. (2014). Birth and perinatal outcomes and complications for babies conceived following ART. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 19(4), 234–238.
- Hu, Y., Maxson, W., Hoffman, D., Ory, S., Eager, S., Dupre, J., & WorriLOW, K. (1998). Co-culture with assisted hatching of human embryos using Buffalo rat liver cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(1), 165–168.
- Ilic, D., Genbacev, O., & Krtolica, A. (2007). Derivation of hESC from intact blastocysts. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, Chapter 1, Unit 1A.2.
- In, J. G.-C. R., & 1994, undefined. (n.d.). Prediction of birth weight and fetal weight gain. BUTTERWORTH-HEINEMANN.
- Jauniaux, E., Ben-Ami, I., & Maymon, R. (2013). Do assisted-reproduction twin pregnancies require additional antenatal care? *Reproductive Biomedicine Online*, 26(2), 107–119.
- Jo, T. (1975). [Uptake of ¹⁴C-thymidine into preimplantation rabbit blastocoelic fluid and DNA synthesis in vitro]. *Nihon Funin Gakkai Zasshi*, 20(2), 50–61.
- Johnson, M. H., & Nasr-Esfahani, M. H. (1994). Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 16(1), 31–38.
- Jones, G. M., Trounson, A. O., Lolatgis, N., & Wood, C. (1998). Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 70(6), 1022–1029.
- Källén, B., Finnström, O., Lindam, A., Nilsson, E., Nygren, K.-G., & Olausson, P. O. (2010). Blastocyst versus cleavage stage transfer in in vitro fertilization: differences in neonatal outcome? *Fertility and Sterility*, 94(5), 1680–1683.
- Kaser, D. J., Bogale, B., Sarda, V., Farland, L. V., & Racowsky, C. (2016). Randomized controlled trial of low (5%) vs. ultralow (2%) oxygen tension for in vitro development of human embryos. *Fertility and Sterility*, 106(3), e4.
- Kaser, D. J., Bogale, B., Sarda, V., Farland, L. V., Williams, P. L., & Racowsky, C. (2018). Randomized controlled trial of low (5%) versus ultralow (2%) oxygen for extended culture using bipronucleate and tripronucleate human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility*, 109(6), 1030–1037.e2.
- Kattal, N., Cohen, J., & Barmat, L. I. (2008). Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis.

- Fertility and Sterility, 90(4), 1069–1076.
- Katz-Jaffe, M. G., Linck, D. W., Schoolcraft, W. B., & Gardner, D. K. (2005). A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 130(6), 899–905.
- Kind, K. L., Collett, R. A., Harvey, A. J., & Thompson, J. G. (2005). Oxygen-regulated expression of GLUT-1, GLUT-3, and VEGF in the mouse blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*, 70(1), 37–44.
- Kingdom, J. C., Audette, M. C., Hobson, S. R., Windrim, R. C., & Morgen, E. (2018). A placenta clinic approach to the diagnosis and management of fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(2), S803–S817.
- Kirkegaard, K., Svane, A. S. P., Nielsen, J. S., Hindkjær, J. J., Nielsen, N. C., & Ingerslev, H. J. (2014). Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of Day 3 and 5 embryo culture medium does not predict pregnancy outcome in good prognosis patients: a prospective cohort study on single transferred embryos. *Human Reproduction*, 29(11), 2413–2420.
- Kleijkers, S. H. M., van Montfoort, A. P. A., Smits, L. J. M., Viechtbauer, W., Roseboom, T. J., Nelissen, E. C. M., ... Dumoulin, J. C. M. (2014). IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(4), 661–669.
- Kleijkers, S. H. M., Eijssen, L. M. T., Coonen, E., Derhaag, J. G., Mantikou, E., Jonker, M. J., ... van Montfoort, A. P. A. (2015). Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media. *Human Reproduction*, 30(10), 2303–2311.
- Kleijkers, S. H. M., Mantikou, E., Slappendel, E., Consten, D., van Echten-Arends, J., Wetzels, A. M., ... Mastenbroek, S. (2016). Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(10), 2219–2230.
- Kumar, P., Verma, A., Kumar, M., De, S., Kumar, R., & Datta, T. K. (2015). Expression pattern of glucose metabolism genes correlate with development rate of buffalo oocytes and embryos in vitro under low oxygen condition. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(3), 471–478.
- Kwan, I., Bhattacharya, S., Kang, A., & Woolner, A. (2014). Monitoring of stimulated cycles in assisted reproduction (IVF and ICSI). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8), CD005289.
- Lane, M., & Gardner, D. K. (1997). Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1), 153–164.
- Lane, M., & Gardner, D. K. (1998). Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 991–997.
- Lane, M., & Gardner, D. K. (2000a). Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction*, 62(1), 16–22.
- Lane, M., & Gardner, D. K. (2000b). Regulation of ionic homeostasis by mammalian embryos. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18(2), 195–204.
- Lane, M., & Gardner, D. K. (2003). Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1109–1117.
- Laufer, N., Tarlatzis, B. C., DeCherney, A. H., Masters, J. T., Haseltine, F. P., MacLusky, N., & Naftolin, F. (1984). Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 42(3), 366–372.
- Lawitts, J. A., & Biggers, J. D. (1991). Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. *Biology of Reproduction*, 45(2), 245–251.
- Lawitts, J. A., & Biggers, J. D. (1993). Culture of preimplantation embryos. *Methods in Enzymology*, 225, 153–164.
- Leese, H. J., Hooper, M. A., Edwards, R. G., & Ashwood-Smith, M. J. (1986). Uptake of pyruvate by early human embryos determined by a non-invasive technique. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 1(3), 181–182.
- Leese, H. J. (1995). Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Human Reproduction Update*, 1(1), 63–72.
- Leese, H. J. (1998). Human embryo culture: back to nature. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15(8), 466–468.
- Leese, H. J. (2002). Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability.

- BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 24(9), 845–849.
- Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A. M., Kingston, M., ... Boland, M. P. (2003). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction (Cambridge, England)*, 126(3), 337–346.
- López-Pelayo, I., Gutiérrez-Romero, J. M., Armada, A. I. M., Calero-Ruiz, M. M., & Acevedo-Yagüe, P. J. M. de. (2018). Comparison of two commercial embryo culture media (SAGE-1 step single medium vs. G1-PLUSTM/G2-PLUSTM sequential media): Influence on in vitro fertilization outcomes and human embryo quality. *JBRA Assisted Reproduction*, 22(2), 128–133.
- Lorenzen, E., Follmann, F., Jungersen, G., & Agerholm, J. S. (2015). A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Veterinary Research*, 46(1), 116.
- Luna, M., Duke, M., Copperman, A., Grunfeld, L., Sandler, B., & Barritt, J. (2007). Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertility and Sterility*, 87(3), 519–523.
- Ma, Y.-Y., Chen, H.-W., & Tzeng, C.-R. (2017). Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *Journal of Ovarian Research*, 10(1), 47.
- Maas, K., Galkina, E., Thornton, K., Penzias, A. S., & Sakkas, D. (2016). No change in live birthweight of IVF singleton deliveries over an 18-year period despite significant clinical and laboratory changes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(9), 1987–1996.
- Macklon, N. S., Pieters, M. H. E. C., Hassan, M. A., Jeucken, P. H. M., Eijkemans, M. J. C., & Fauser, B. C. J. M. (2002). A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in vitro human blastocyst development. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(10), 2700–2705.
- Maheshwari, A., Kalampokas, T., Davidson, J., & Bhattacharya, S. (2013). Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 100(6), 1615–1621.e10.
- Mahsoudi, B., Li, A., & O'Neill, C. (2007). Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. *Biology of Reproduction*, 77(5), 889–896.
- Mak, W., Kondapalli, L. A., Celia, G., Gordon, J., DiMattina, M., & Payson, M. (2016). Natural cycle IVF reduces the risk of low birthweight infants compared with conventional stimulated IVF. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(4), 789–794.
- Mantikou, E., Bontekoe, S., van Wely, M., Seshadri, S., Repping, S., & Mastenbroek, S. (2013). Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Human Reproduction Update*, 19(3), 209–209.
- Mantikou, E., Youssef, M. A. F. M., van Wely, M., van der Veen, F., Al-Inany, H. G., Repping, S., & Mastenbroek, S. (2013). Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 19(3), 210–220.
- Mantikou, E., Jonker, M. J., Wong, K. M., van Montfoort, A. P. A., de Jong, M., Breit, T. M., ... Mastenbroek, S. (2016). Factors affecting the gene expression of in vitro cultured human preimplantation embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(2), 298–311.
- Marianowski, P., Dąbrowski, F. A., Zyguła, A., Wielgoś, M., & Szymusik, I. (2016). Do We Pay Enough Attention to Culture Conditions in Context of Perinatal Outcome after In Vitro Fertilization? Up-to-Date Literature Review. *BioMed Research International*, 2016, 1–6.
- Market-Velker, B. A., Fernandes, A. D., & Mann, M. R. W. (2010). Side-by-Side Comparison of Five Commercial Media Systems in a Mouse Model: Suboptimal In Vitro Culture Interferes with Imprint Maintenance. *Biology of Reproduction*, 83(6), 938–950.
- Martin, K. L. (2000). Nutritional and metabolic requirements of early cleavage stage embryos and blastocysts. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 3(4), 247–254.
- Matorras, R., Ruiz, J. I., Mendoza, R., Ruiz, N., Sanjurjo, P., & Rodriguez-Escudero, F. J. (1998). Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(8), 2227–2230.
- Ménézo, Y. (1976). [Synthetic medium for gamete survival and maturation and for culture of fertilized eggs]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances de l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles*, 282(22), 1967–1970.
- Ménézo, Y., Testart, J., & Perrone, D. (1984). Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early

- embryo culture, and transfer. *Fertility and Sterility*, 42(5), 750–755.
- Ménézo, Y., Dale, B., & Cohen, M. (2010). DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, 18(04), 357–365.
- Menon, R. (2014). Oxidative Stress Damage as a Detrimental Factor in Preterm Birth Pathology. *Frontiers in Immunology*, 5, 567.
- Mercader, A., Garcia-Velasco, J. A., Escudero, E., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (2003). Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertility and Sterility*, 80(5), 1162–1168.
- Mercader, A., Valbuena, D., & Simón, C. (2006). Human Embryo Culture. In *Methods in enzymology* (Vol. 420, pp. 3–18).
- Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. A. M., & Dieleman, S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), 651–674.
- Michalas, S., Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Deligeoroglou, E., & Aravantinos, D. (1996). A flexible protocol for the induction of recipient endometrial cycles in an oocyte donation programme. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 11(5), 1063–1066.
- Milki, A. A., Jun, S. H., Hinckley, M. D., Behr, B., Giudice, L. C., & Westphal, L. M. (2003). Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertility and Sterility*, 79(3), 503–506.
- Mongelli, M., & Gardosi, J. (1996). Gestation-adjusted projection of estimated fetal weight. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 75(1), 28–31.
- Morgan, K., Wiemer, K., Steuerwald, N., Hoffman, D., Maxson, W., & Godke, R. (1995). Use of videocinematography to assess morphological qualities of conventionally cultured and cocultured embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(9), 2371–2376.
- Morin, N. C., Wirth, F. H., Johnson, D. H., Frank, L. M., Presburg, H. J., Van de Water, V. L., ... Mills, J. L. (1989). Congenital malformations and psychosocial development in children conceived by in vitro fertilization. *The Journal of Pediatrics*, 115(2), 222–227.
- Mortimer, D. (1986). Elaboration of a new culture medium for physiological studies on human sperm motility and capacitation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 1(4), 247–250.
- Mulder, C. L., Serrano, J. B., Catsburg, L. A. E., Roseboom, T. J., Repping, S., & van Pelt, A. M. M. (2018). A practical blueprint to systematically study life-long health consequences of novel medically assisted reproductive treatments. *Human Reproduction*, 33(5), 784–792.
- Nadal-Desbarats, L., Veau, S., Blasco, H., Emond, P., Royere, D., Andres, C. R., & Guérif, F. (2013). Is NMR metabolic profiling of spent embryo culture media useful to assist in vitro human embryo selection? *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 26(2), 193–202.
- Nastri, C. O., Nóbrega, B. N., Teixeira, D. M., Amorim, J., Diniz, L. M. M., Barbosa, M. W. P., ... Martins, W. P. (2016). Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 106(1), 95–104.e17.
- Nelissen, E. C., Van Montfoort, A. P., Coonen, E., Derhaag, J. G., Geraedts, J. P., Smits, L. J., ... Dumoulin, J. C. (2012). Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(7), 1966–1976.
- Nelissen, E. C. M., Van Montfoort, A. P. A., Smits, L. J. M., Menheere, P. P. C. A., Evers, J. L. H., Coonen, E., ... Dumoulin, J. C. M. (2013). IVF culture medium affects human intrauterine growth as early as the second trimester of pregnancy. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(8), 2067–2074.
- Ng, K. Y. B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N., & Cheong, Y. (2018). In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 24(1), 15–34.
- Noda, Y., Goto, Y., Umaoka, Y., Shiotani, M., Nakayama, T., & Mori, T. (1994). Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertility and Sterility*, 62(5), 1022–1027.
- Opdahl, S., Henningsen, A. A., Tiitinen, A., Bergh, C., Pinborg, A., Romundstad, P. R., ... Romundstad, L. B. (2015). Risk of hypertensive disorders in pregnancies following assisted reproductive technology: a cohort study from the CoNARTaS group. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 30(7), 1724–1731.
- Orrenius, S., Burkitt, M. J., Kass, G. E., Dypbukt, J. M., & Nicotera, P. (1992). Calcium ions and oxidative cell injury. *Annals of Neurology*, 32 Suppl, S33-42.
- Orrenius, S., McCabe, M. J., & Nicotera, P. (1992). Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and

- programmed cell death. *Toxicology Letters*, 64–65 Spec No, 357–364.
- Ottosen, L. D. M., Hindkjaer, J., Husth, M., Petersen, D. E., Kirk, J., & Ingerslev, H. J. (2006). Observations on intrauterine oxygen tension measured by fibre-optic microsensors. *Reproductive Biomedicine Online*, 13(3), 380–385.
- Ottosen, L. D. M., Hindkjaer, J., & Ingerslev, J. (2007). Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(2–3), 99–103.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet (London, England)*, 340(8810), 17–18.
- Parikh, F. R., Nadkarni, S. G., Naik, N. J., Naik, D. J., & Uttamchandani, S. A. (2006). Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 86(4), 839–847.
- Pickering, S. J., Braude, P. R., Johnson, M. H., Cant, A., & Currie, J. (1990). Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertility and Sterility*, 54(1), 102–108.
- Pinborg, A., Wennerholm, U. B., Romundstad, L. B., Loft, A., Aittomaki, K., Soderstrom-Anttila, V., ... Bergh, C. (2013). Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 19(2), 87–104.
- Pinborg, A., Henningsen, A. A., Loft, A., Malchau, S. S., Forman, J., & Andersen, A. N. (2014). Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Human Reproduction*, 29(3), 618–627.
- Podsiadly, B. T., Woolcott, R. J., Stanger, J. D., & Stevenson, K. (1996). Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 11(6), 1306–1308.
- Porcu, E., Fabbri, R., Seracchioli, R., Ciotti, P. M., Magrini, O., & Flamigni, C. (1997). Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertility and Sterility*, 68(4), 724–726.
- Preis, K. A., Seidel, G. E., & Gardner, D. K. (2007). Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 893–903.
- Prichard, J. F., Thibodeaux, J. K., Pool, S. H., Blakewood, E. G., Ménézo, Y., & Godke, R. A. (1992). In-vitro co-culture of early stage caprine embryos with oviduct and uterine epithelial cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 7(4), 553–557.
- Pucci, O., Qualls, C., Battisti-Charbonney, A., Balaban, D. Y., Fisher, J. A., Duffin, J., & Appenzeller, O. (2012). Human skin hypoxia modulates cerebrovascular and autonomic functions. *PLoS One*, 7(10), e47116.
- Qin, J., Liu, X., Sheng, X., Wang, H., & Gao, S. (2016). Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: a meta-analysis of cohort studies. *Fertility and Sterility*, 105(1), 73–85.e6.
- Quinn, P., Kerin, J. F., & Warnes, G. M. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility*, 44(4), 493–498.
- Quinn, P. (1995a). Cumulus cell co-culture--efficacy? *Fertility and Sterility*, 63(4), 937–938.
- Quinn, P. (1995b). Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12(2), 97–105.
- Quinn, P., & Margalit, R. (1996). Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 13(1), 9–14.
- Quinn, P. (1998). Glucose and phosphate--important or unimportant in culture media for embryos? *Fertility and Sterility*, 70(4), 782–783.
- Quinn, P., & Horstman, F. C. (1998). Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro? *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13 Suppl 4, 173–183.
- Quinn, P. (2012). Culture systems: sequential. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 912, 211–230.
- Reed, M. L., Hamic, A., Thompson, D. J., & Caperton, C. L. (2009). Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertility*

- and Sterility, 92(5), 1783–1786.
- Rexhaj, E., Paoloni-Giacobino, A., Rimoldi, S. F., Fuster, D. G., Anderegg, M., Somm, E., ... Scherrer, U. (2013). Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. *Journal of Clinical Investigation*, 123(12), 5052–5060.
- Rieger, D., Grisart, B., Semple, E., Van Langendonck, A., Betteridge, K. J., & Dessy, F. (1995). Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 105(1), 91–98.
- Rimm, A. A., Katayama, A. C., Diaz, M., & Katayama, K. P. (2004). A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 21(12), 437–443.
- Rinaudo, P. F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A. T., & Schultz, R. M. (2006). Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertility and Sterility*, 86(4 Suppl), 1252–1265, 1265.e1-36.
- Robinson, C. M., Neary, R., Levendale, A., Watson, C. J., & Baugh, J. A. (2012). Hypoxia-induced DNA hypermethylation in human pulmonary fibroblasts is associated with Thy-1 promoter methylation and the development of a pro-fibrotic phenotype. *Respiratory Research*, 13(1), 74.
- Rock, J., & Menkin, M. F. (1944). In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Science (New York, N.Y.)*, 100(2588), 105–107.
- Ross, A. C., & Gardner, E. M. (1994). The function of vitamin A in cellular growth and differentiation, and its roles during pregnancy and lactation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 352, 187–200.
- Rubio, C., Simón, C., Mercader, A., Garcia-Velasco, J., Remohí, J., & Pellicer, A. (2000). Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15 Suppl 6, 31–38.
- Rubio, C., Minguez, Y., De Los Santos, M. J., Ruiz, A., & Romero, J. (1997). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 2, f1.
- Rumbold, A. R., Moore, V. M., Whitrow, M. J., Oswald, T. K., Moran, L. J., Fernandez, R. C., ... Davies, M. J. (2017). The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: a systematic review. *Human Reproduction*, 32(7), 1489–1507.
- Sánchez-Ribas, I., Riqueros, M., Vime, P., Puchades-Carrasco, L., Jönsson, T., Pineda-Lucena, A., ... Simón, C. (2012). Differential metabolic profiling of non-pure trisomy 21 human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1157–1164.e2.
- Santulli, G., Borrás, C., Bousquet, J., Calzà, L., Cano, A., Illario, M., ... Iaccarino, G. (2015). Models for preclinical studies in aging-related disorders: One is not for all. *Translational Medicine @ UniSa*, 13, 4–12.
- Sathananthan, A., Trounson, A., & Wood, C. (1986). *Atlas of Fine Structure of Human Sperm Penetration, Eggs and Embryos Cultured*.
- Schoysman, R., Vanderzwalmen, P., Nijs, M., Segal, L., Segal-Bertin, G., Geerts, L., ... Schoysman, D. (1993). Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet (London, England)*, 342(8881), 1237.
- Scott, L. A., & Smith, S. (1998). The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 1003–1013.
- Seli, E., Bruce, C., Botros, L., Henson, M., Roos, P., Judge, K., ... Sakkas, D. (2011). Receiver operating characteristic (ROC) analysis of day 5 morphology grading and metabolomic Viability Score on predicting implantation outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(2), 137–144.
- Sermon, K., Seneca, S., Vanderfaeillie, A., Lissens, W., Joris, H., Vandervorst, M., ... Liebaers, I. (1999). Preimplantation diagnosis for fragile X syndrome based on the detection of the non-expanded paternal and maternal CGG. *Prenatal Diagnosis*, 19(13), 1223–1230.
- Shahzad, S., Bertrand, K., Minhas, K., & Coomber, B. L. (2007). Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics*, 2(2), 119–125.
- Shalgi, R., Kraicer, P. F., & Soferman, N. (1972). Gases and electrolytes of human follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, 28(3), 335–340.
- Sherman, M. I., & Salomon, D. S. (1975). The relationships between the early mouse embryo and its environment. The ... Symposium. *Society for Developmental Biology. Symposium*, (33), 277–309.
- Shigenaga, M. K., Aboujaoude, E. N., Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by

- high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods in Enzymology*, 234, 16–33.
- Simón, C., Mercader, A., Garcia-Velasco, J., Nikas, G., Moreno, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (1999). Coculture of Human Embryos with Autologous Human Endometrial Epithelial Cells in Patients with Implantation Failure 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(8), 2638–2646.
- Singh, R., & Sinclair, K. D. (2007). Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S56-62.
- Skiles, W. M., Kester, A., Pryor, J. H., Westhusin, M. E., Golding, M. C., & Long, C. R. (2018). Oxygen-induced alterations in the expression of chromatin modifying enzymes and the transcriptional regulation of imprinted genes. *Gene Expression Patterns*, 28, 1–11.
- Squirrell, J. M., Lane, M., & Bavister, B. D. (2001). Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos. *Biology of Reproduction*, 64(6), 1845–1854.
- Steeves, T. E., & Gardner, D. K. (1999). Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Molecular Reproduction and Development*, 54(1), 92–101.
- Stephoe, P. C., & Edwards, R. G. (1970). Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet (London, England)*, 1(7649), 683–689.
- Stephoe, P. C., Edwards, R. G., & Purdy, J. M. (1971). Human blastocysts grown in culture. *Nature*, 229(5280), 132–133.
- Stokes, P. J., Abeydeera, L. R., & Leese, H. J. (2005). Development of porcine embryos in vivo and in vitro; evidence for embryo “cross talk” in vitro. *Developmental Biology*, 284(1), 62–71.
- Sultana, Z., Maiti, K., Dedman, L., & Smith, R. (2018). Is there a role for placental senescence in the genesis of obstetric complications and fetal growth restriction? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(2), S762–S773.
- Summers, M. C., & Biggers, J. D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update*, 9(6), 557–582.
- Sunde, A., Brison, D., Dumoulin, J., Harper, J., Lundin, K., Magli, M. C., ... Veiga, A. (2016). Time to take human embryo culture seriously: Table I. *Human Reproduction*, 31(10), 2174–2182.
- Swain, J. E. (2010a). Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reproductive Biomedicine Online*, 21(1), 6–16.
- Swain, J. E. (2010b). Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(1), 6–16.
- Swain, J. E. (2012). Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Human Reproduction Update*, 18(3), 333–339.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 930–935.
- Tarín, J. J. (1996). Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Molecular Human Reproduction*, 2(10), 717–724.
- Tarlatzis, B. C., Qublan, H. S., Sanopoulou, T., Zepiridis, L., Grimbizis, G., & Bontis, J. (2002). Increase in the monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 77(1), 196–198.
- Thibodeaux, J. K., Myers, M. W., Goodeaux, L. L., Ménézo, Y., Roussel, J. D., Broussard, J. R., & Godke, R. A. (1992). Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. *Reproduction, Fertility, and Development*, 4(5), 573–583.
- Thompson, J. G., Sherman, A. N. M., Allen, N. W., McGowan, L. T., & Tervit, H. R. (1998). Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 50(2), 139–145.
- Thompson, J. G. (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 263–275.
- Thompson, J., Davies, M., Pool, T., Rienzi, L., Nagy, P. Z., Hardarson, T., ... Gardner, D. (2016). Birthweight and the effects of culture media. *Human Reproduction*, 32(3), 717–718.
- Tournaye, H., Devroey, P., Liu, J., Nagy, Z., Lissens, W., & Van Steirteghem, A. (1994). Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertility and Sterility*, 61(6),

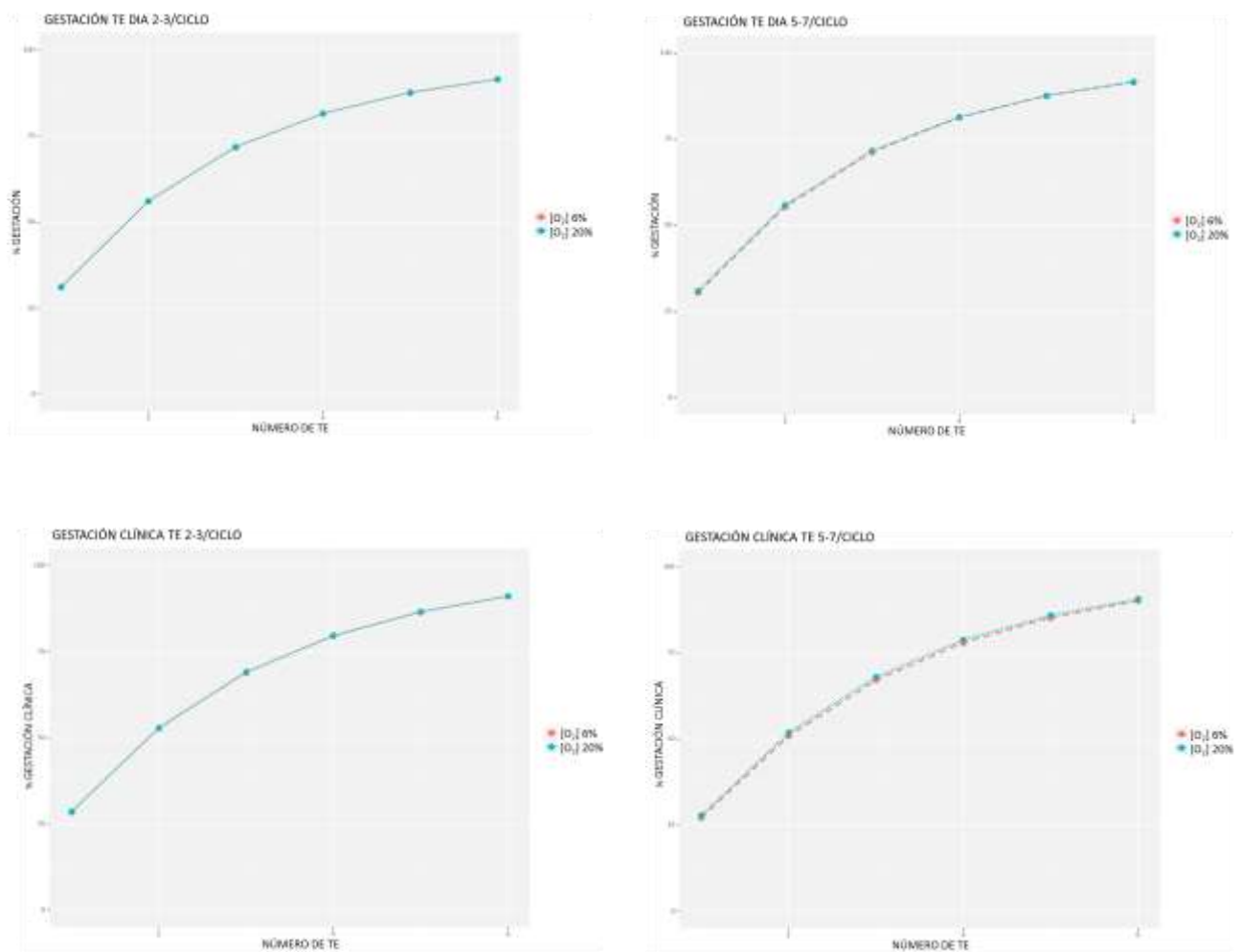
- 1045–1051.
- Trimarchi, J. R., Liu, L., Porterfield, D. M., Smith, P. J., & Keefe, D. L. (2000). A non-invasive method for measuring preimplantation embryo physiology. *Zygote (Cambridge, England)*, 8(1), 15–24.
- Tucker, M. J., Kort, H. I., Toledo, A. A., Morton, P. C., Wright, G., Ingargiola, P. E., & Sweitzer, C. L. (1995). Effect of coculture on subsequent survival and implantation of cryopreserved human embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12(10), 689–692.
- Udayashankar, R., Baker, D., Tuckerman, E., Laird, S., Li, T. C., & Moore, H. D. (2011). Characterization of invasive trophoblasts generated from human embryonic stem cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(2), 398–406.
- Vajta, G., Rienzi, L., Cobo, A., & Yovich, J. (2010). Embryo culture: can we perform better than nature? *Reproductive Biomedicine Online*, 20(4), 453–469.
- Van Blerkom, J., Antczak, M., & Schrader, R. (1997). The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 12(5), 1047–1055.
- Van Rumste, M. M. E., Evers, J. L. H., & Farquhar, C. M. (2004). ICSI versus conventional techniques for oocyte insemination during IVF in patients with non-male factor subfertility: a Cochrane review. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(2), 223–227.
- Van Steirteghem, A. C., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Janssenswillen, C., Tournaye, H., ... Devroey, P. (1993). Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 8(7), 1055–1060.
- Van Steirteghem, A. C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., ... Devroey, P. (1993). High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 8(7), 1061–1066.
- Van Steirteghem, A., Nagy, Z., Liu, J., Joris, H., Verheyen, G., Smits, J., ... Devroey, P. (1994). Intracytoplasmic sperm injection. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 8(1), 85–93.
- Veeck, L. L. (1988). Oocyte assessment and biological performance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541, 259–274.
- Vergouw, C. G., Kieslinger, D. C., Kosteljik, E. H., Botros, L. L., Schats, R., Hompes, P. G., ... Lambalk, C. B. (2012). Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*, 27(8), 2304–2311.
- Vodička, P., Smetana, K., Dvořánková, B., Emerick, T., Xu, Y. Z., Ourednik, J., ... Motlík, J. (2005). The Miniature Pig as an Animal Model in Biomedical Research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049(1), 161–171.
- Waldenström, U., Engström, A.-B., Hellberg, D., & Nilsson, S. (2009). Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 91(6), 2461–2465.
- Wale, P. L., & Gardner, D. K. (2012). Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biology of Reproduction*, 87(1), 24, 1–8.
- Wang, W. H., Meng, L., Hackett, R. J., Odenbourg, R., & Keefe, D. L. (2001). Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(11), 2374–2378.
- Waterston, R. H., Lander, E. S., & Sulston, J. E. (2002). On the sequencing of the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3712–3716.
- Wen, J., Jiang, J., Ding, C., Dai, J., Liu, Y., Xia, Y., ... Hu, Z. (2012). Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 97(6), 1331-7.e1-4.
- Wiemer, K. E., Cohen, J., Amborski, G. F., Wright, G., Wiker, S., Munyakazi, L., & Godke, R. A. (1989). In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 4(5), 595–600.
- Wilcox, M. A., Newton, C. S., & Johnson, I. R. (1995). Paternal influences on birthweight. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 74(1), 15–18.
- Wu, S. C., & Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), 607–620.

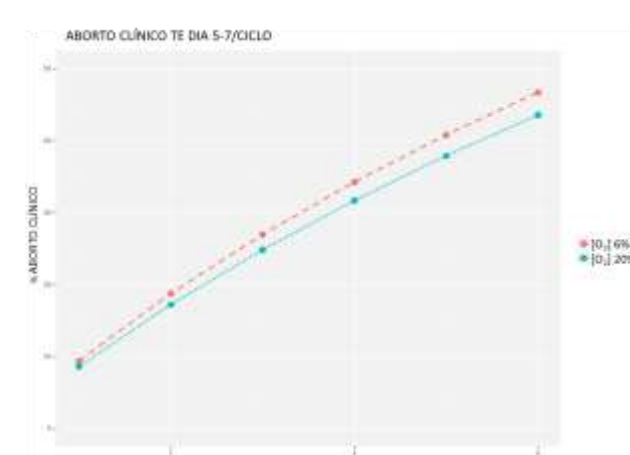
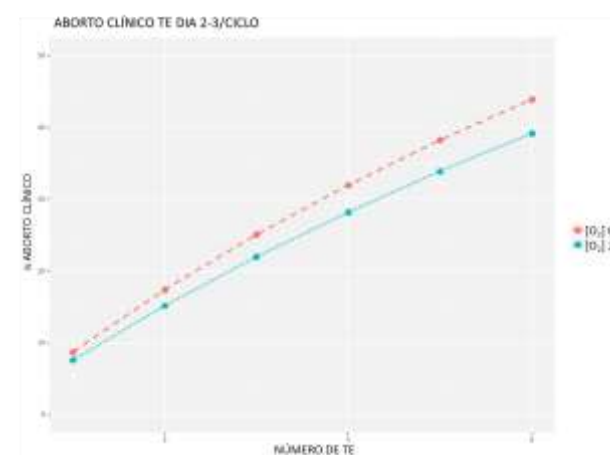
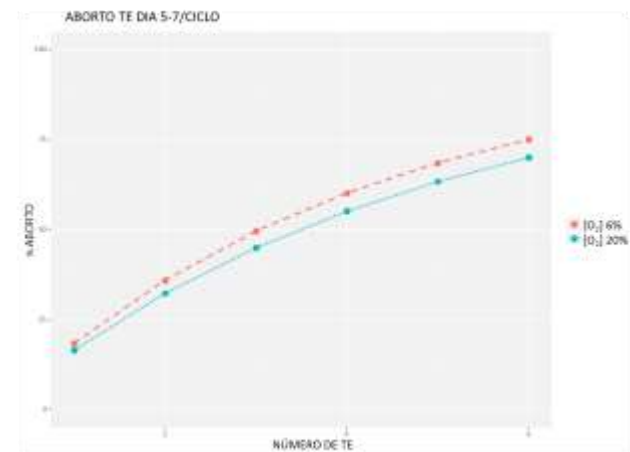
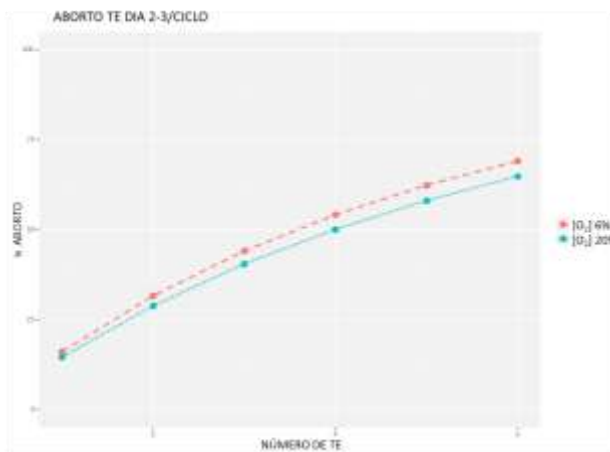
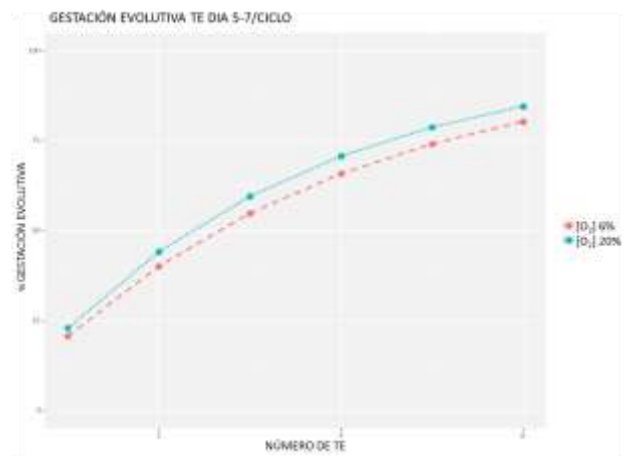
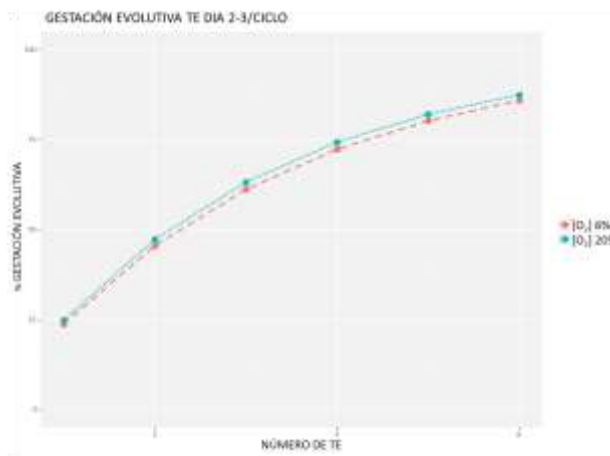
- Xia, P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 12(8), 1750–1755.
- Yang, H. W., Hwang, K. J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K. W., & Oh, K. S. (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 998–1002.
- Yedwab, G. A., Paz, G., Homonnai, T. Z., David, M. P., & Kraicer, P. F. (1976). The temperature, pH, and partial pressure of oxygen in the cervix and uterus of women and uterus of rats during the cycle. *Fertility and Sterility*, 27(3), 304–309.
- Youssef, M. M., Mantikou, E., van Wely, M., Van der Veen, F., Al-Inany, H. G., Repping, S., & Mastenbroek, S. (2015). Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11), CD007876.
- Zandstra, H., Van Montfoort, A. P. A., & Dumoulin, J. C. M. (2015). Does the type of culture medium used influence birthweight of children born after IVF? *Human Reproduction*, 30(11), 2693–2693.
- Zhu, J., Lin, S., Li, M., Chen, L., Lian, Y., Liu, P., & Qiao, J. (2014). Effect of in vitro culture period on birthweight of singleton newborns. *Human Reproduction*, 29(3), 448–454.

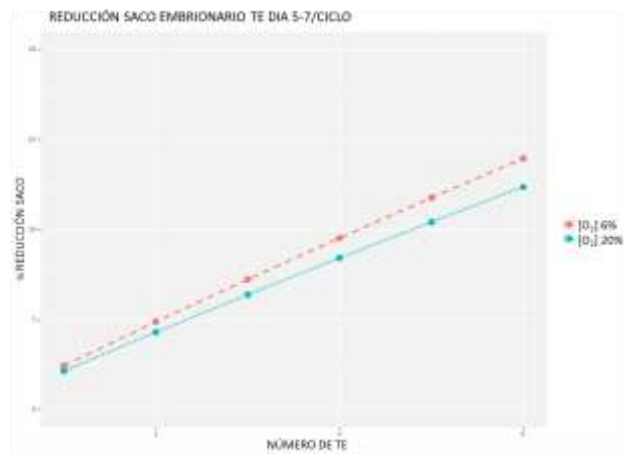
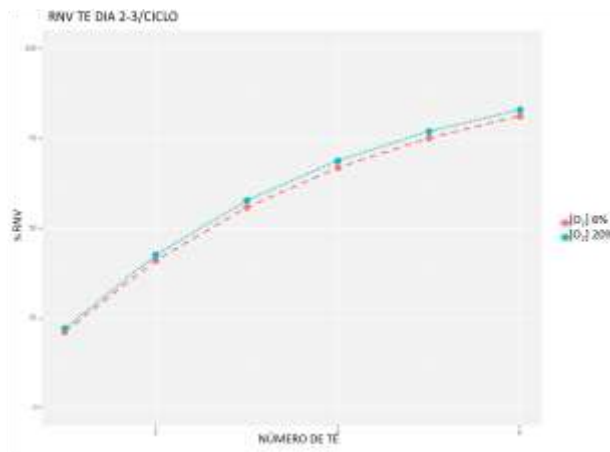
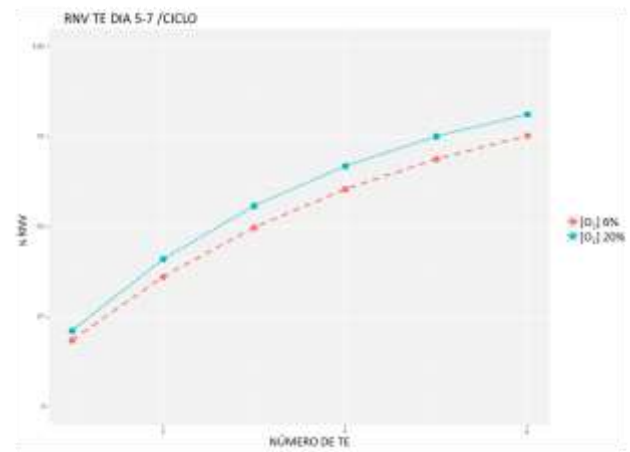
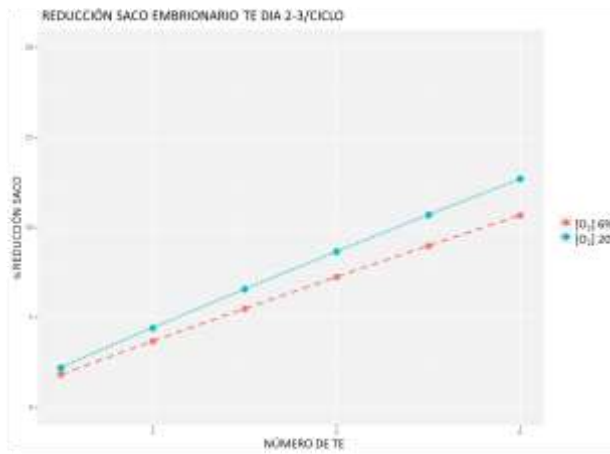
9. APÉNDICES

Predicción de éxito de las tasas obstétricas acumuladas mediante Poisson

En este anexo se muestran el resto de gráficos de la predicción de éxito de tasas obstétricas mediante regresión de *Poisson*. Se trata de las mismas tasas presentadas en el apartado de resultados pero divididas según el día de transferencia embrionaria (TE).







Índice de Ilustraciones y tablas

Ilustración 1 Diagrama de la capacidad de regular el pH por parte de ovocitos y preembriones tempranos pHe: pH externo, pHi: pH interno..... 24

Ilustración 2 Comparativa entre ratón y humano de las etapas de vida y los patologías asociadas Nota: Tomada de Mulder et al., (2017) 32

Ilustración 3 Distribución normal de los datos 43

Ilustración 4 Histogramas y diagramas de caja para la distribución de la Edad para los datos previos y posteriores..... 50

Ilustración 5 Histogramas y diagramas de caja para la distribución de la IMC para los datos previos y posteriores..... 51

Ilustración 6 Histograma y diagramas de caja para la distribución de la Edad para los datos de ambos grupos de estudios 54

Ilustración 7 Histograma y diagramas de caja para la distribución de la IMC para los datos de ambos grupos de estudios 55

Ilustración 8 Predicción de la tasa de gestación (β -hCG positiva)/ciclo según número de TE.. 62

Ilustración 9 Predicción de la tasa de gestación clínica/ciclo según número de TE..... 62

Ilustración 10 Predicción de la tasa de gestación evolutiva/ciclo según número de TE..... 63

Ilustración 11 Predicción de la tasa de aborto/ciclo según número de TE 63

Ilustración 12 Predicción de la tasa de aborto clínico/ciclo según número de TE..... 64

Ilustración 13 Predicción de la tasa de reducción de saco embrionario/ciclo según número de TE..... 64

Ilustración 14 Predicción de la tasa de RNV/ciclo según número de TE 65

Tabla 1 Ventajas y desventajas de cultivos monofásico y secuencial..... 20

Tabla 2 Estudios sobre el efecto de la luz sobre preembriones de mamíferos Nota: Tomada de Ottosen et al., (2007) 23

Tabla 3 Resumen de los tratamientos del estudio..... 48

Tabla 4 Resumen de los tratamientos correspondientes al Ensayo Clínico Aleatorizado (ECA). 48

Tabla 5 Homogeneidad de los datos de la variable Edad para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test..... 49

Tabla 6 Homogeneidad de los datos de la variable Edad para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test 49

Tabla 7 Homogeneidad de los datos de la variable IMC para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test..... 50

Tabla 8 Homogeneidad de los datos de la variable IMC para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test 50

Tabla 9 Homogeneidad de los datos de la variable β -HCG positiva para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno..... 52

Tabla 10 Homogeneidad de los datos de la variable β -HCG positiva para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica..... 52

Tabla 11 Homogeneidad de los datos de la variable gestación clínica para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno..... 52

Tabla 12 Homogeneidad de los datos de la variable gestación clínica para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica..... 52

Tabla 13 Homogeneidad de los datos de la variable gestación evolutiva para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno..... 52

Tabla 14 Homogeneidad de los datos de la variable gestación evolutiva para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica.....	52
Tabla 15 Homogeneidad de los datos de la variable aborto para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno	52
Tabla 16 Homogeneidad de los datos de la variable aborto para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica	53
Tabla 17 Homogeneidad de los datos de la variable aborto bioquímico para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno	53
Tabla 18 Homogeneidad de los datos de la variable aborto bioquímico para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica.....	53
Tabla 19 Homogeneidad de los datos de la variable aborto clínico para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno	53
Tabla 20 Homogeneidad de los datos de la variable aborto clínico para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica.....	53
Tabla 21 Homogeneidad de los datos de la variable RNV para los datos previos y posteriores en baja tensión de oxígeno	53
Tabla 22 Homogeneidad de los datos de la variable RNV para los datos previos y posteriores en tensión de oxígeno atmosférica	53
Tabla 23 Homogeneidad de los datos de la variable Edad entre ambos grupos de estudio, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test	54
Tabla 24 Homogeneidad de los datos de la variable IMC entre ambos grupos de estudio, K-S test: Kolmogórov-Smirnov test	54
Tabla 25 Homogeneidad de las variables pretratamiento entre ambos grupos de estudio, NA: no aplica	56
Tabla 26 Datos de variables maternas durante las gestaciones en ambos grupos de estudio, NA: No aplica.....	56
Tabla 27 Resultados gestacionales provenientes de las transferencias embrionarias en fresco	57
Tabla 28 Resultados gestacionales provenientes de las transferencias embrionarias postcriopreservación (TEC)	59
Tabla 29 Resultados Gestacionales acumulados.....	60
Tabla 30 Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos (TE en fresco), NA/NaN: No aplica/Not a Number.....	67
Tabla 31 Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos (TEC, transferencias postcriopreservación), NA/NaN: No Aplica/Not a Number	68
Tabla 32 Resultados neonatales/perinatales embarazos únicos, NA/NaN: No aplica/ Not a Number	69
Tabla 33 Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares (TE en fresco), NA/NaN: No aplica/Not a Number.....	71
Tabla 34 Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares (TEC, transferencias postcriopreservación), NA/NaN: No aplica/ Not a Number.....	72
Tabla 35 Resultados neonatales/perinatales embarazos gemelares, NA/NaN: No aplica/Not a Number	74
Tabla 36 Incidencia de malformaciones congénitas en embarazos únicos	74
Tabla 37 Incidencia de malformaciones congénitas en embarazos gemelares	74

Índice de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AA	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMH	Siglas en inglés de <i>Anti-Mullerian Hormone</i>
APA	Siglas en inglés de <i>American Psychological Association</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
BCC	Siglas en inglés de <i>Bulk centile calculator</i>
BOE	Boletín Oficial del Estado
BSA	Siglas en inglés de <i>Bovine Serum Albumin</i>
CI	Coficiente Intelectual
CO ₂	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
CV	Coficiente de Varianza
DE	Desviación Estándar
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional
E2	Estradiol
EC	Ensayo Clínico
ECA	Ensayo Clínico Aleatorizado
EDTA	Siglas en inglés de <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EG	Edad Gestacional
ERIC	Siglas en inglés de <i>Education Resources Information Center</i>
FC	Factor de Crecimiento
FIV	Fecundación <i>in Vitro</i>
FSH	Siglas en inglés de <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
G	Grande
GA	Siglas en inglés de <i>Gestational Age</i>
GnRH	Siglas en inglés <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
GROW	Siglas en inglés <i>Gestation Related Optimal Weight</i>
hCG	Siglas en inglés de Gonadotrofina Coriónica humana
HOC	Hiperestimulación Ovárica Controlada
HSP	Siglas en inglés de <i>Heat Shock Proteins</i>
HTF	Siglas en inglés de <i>Human Tubal Fluid</i>
IAC	Inseminación Artificial de Cónyuge
IAD	Inseminación Artificial de Donante

IAI	Inseminación Artificial Intrauterina
IC	Intervalo de Confianza
ICM	Siglas en inglés de <i>Inner Cell Mass</i>
ICMART	Siglas en inglés de <i>International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies</i>
ICSI	Siglas en inglés de <i>Intracytoplasmatic Sperm Injection</i>
IGF	Siglas en inglés de <i>Insulin Growth Factor</i>
IMC	Índice de Masa Corporal
ISO	Siglas en inglés de <i>International Organization for Standardization</i>
ITT	Siglas en inglés de <i>Intention To Treat</i>
KSOM	Siglas en inglés de <i>Simplex Optimization Medium with Potassium</i>
LB	Siglas en inglés de <i>Live Birth</i>
LBR	Siglas en inglés de <i>Live Birth Rate</i>
LOS	Siglas en inglés de <i>Large Offspring Syndrome</i>
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MAR	Siglas en inglés de <i>Medically Assisted Reproduction</i>
MCI	Masa Celular Interna
MG	Muy Grande
MIV	Maduración de ovocitos <i>in Vitro</i>
MP	Muy Pequeño
MS	Siglas en inglés de <i>Mass Spectrometry</i>
N ₂	Nitrógeno
O ₂	Oxígeno
OHSS	Siglas en inglés de <i>Ovarian Hyperstimulation Syndrome</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Pequeño
PA	Peso Alto
PB	Peso Bajo
PBT	Peso Bajo a Término
PCA	Siglas en inglés de <i>Principal Components Analysis</i>
PCO ₂	Presión Parcial de Dióxido de Carbono
PCT	Proteínas de Choque Térmico
PEG	Pequeño para Edad Gestacional
pHe	pH externo
pHi	pH interno
PMB	Peso Muy Bajo

PO ₂	Presión Parcial de Oxígeno
RCT	Siglas en inglés de <i>Randomized Controlled Trial</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNV	Recién Nacidos Vivos
RA	Reproducción Asistida
RIC	Rango Intercuartílico
ROS	Siglas en inglés de <i>Reactive Oxygen Species</i>
RR	Riesgo Relativo
SCI	Sistema de Captura de Imágenes
SET	Siglas en inglés de <i>Single Embryo Transfer</i>
SHO	Síndrome de Hiperestimulación Ovárica
SOM	Siglas en inglés de <i>Simplex Optimization Medium</i>
TA	Tasa de aborto
TE	Transferencia embrionaria
TEC	Transferencia embrionaria postcriopreservación
TED	Transferencia embrionaria doble
TG	Tasa de gestación
TI	Tasa de Implantación
TP	Tasa de Parto
TPG	Tasa Parto Gemelar
TMP	Tasa Muerte Perinatal
TPM	Tasa Parto Múltiple
TRA	Técnicas de Reproducción asistida
TOW	Siglas en inglés de <i>Term Optimal Weight</i>
TUE	Transferencia de un único preembrión
UPLC-MS	Siglas en inglés de <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
VG	Vesícula Germinal
WHO	Siglas en inglés de <i>World Health Organization</i>
ZP	Zona Pelúcida

Glosario

Término	Definición
Ácidos nucleicos	Grandes polímeros formados por nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen dos tipos básicos, el ADN y el ARN.
Acrosoma	Compartimento de la cabeza del espermatozoide situado en el extremo que contiene enzimas hidrolíticas, principalmente la hialuronidasa (hidroliza el ácido hialurónico). Esta enzima permite la separación de las células del cúmulo que rodean al ovocito. También contiene acrosina, que se encarga de hidrolizar los enlaces de las glicoproteínas de la zona pelúcida del ovocito y permite la entrada del espermatozoide ayudado por el movimiento del flagelo.
Agonista	Sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una acción determinada en la célula generalmente similar a la producida por una sustancia fisiológica. Un agonista parcial activa al receptor pero no causa tanto efecto fisiológico como un agonista completo.
Albúmina	Proteína plasmática cuya función más importante es el mantenimiento de la presión osmótica y la capacidad de transporte de hormonas, y otros metabolitos
Aleatorización	También llamada randomización es un procedimiento para la asignación, en los ensayos clínicos, de pacientes (unidades de tratamiento) a tratamientos. Consiste en al azar a los participantes en un ensayo a dos o más grupos de tratamiento o de control. La aleatorización es una de las formas de evitar los sesgos de selección; su propósito es posibilitar las comparaciones en los grupos de asignación de los tratamientos.
Aminoácidos	Molécula orgánica con un grupo amino (-NH ₂) y un grupo carboxilo (-COOH). En el proceso de traducción llevado a cabo por los ribosomas se unen aminoácidos que posteriormente darán lugar a las proteínas
Anoxia	Falta casi total del oxígeno en un tejido, la cantidad de oxígeno de las células del organismo no es satisfecha.
Antagonista	Sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular antagonista y provoca el efecto contrario de un agonista, es decir que no se produce la acción celular y además bloquea el receptor de manera que ya no se puede unir un agonista.
Apoptosis	Vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar crecimientos celulares anómalos. Está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

ATP	El trifosfato de adenosina (adenosín trifosfato, del inglés <i>adenosine triphosphate</i> , ATP o TFA) es un nucleótido fundamental en la obtención de energía celular. Es la principal fuente de energía para la mayoría de las funciones celulares. Es generado por la respiración celular y consumido por muchas enzimas en la catálisis de numerosos procesos químicos.
Biomarcadores	Sustancia utilizada como indicador de un estado biológico. Debe poder medirse objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso biológico normal, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico.
Blastocisto	Fase del desarrollo del preembrión de los mamíferos, equivalente a la blástula, que constituye una estructura celular compleja derivada de la mórula; está formada por una masa celular interna (MCI) que origina el preembrión (y algunos tejidos extraembrionarios) y de una capa periférica de células llamadas células del trofoblasto que darán lugar a los tejidos extraembrionarios.
Carbohidratos	Biomoléculas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Las funciones son brindar energía inmediata y estructural. La glucosa y el glucógeno son las formas biológicas primarias de almacenamiento y consumo de energía.
Cavidades celómicas	Cavidades que se forma en el preembrión, existen tres cavidades celómicas: la cavidad peritoneal (contiene los órganos abdominales: estómago, hígado, páncreas, intestino delgado, etc.), la cavidad pleural (contiene los pulmones) y la cavidad pericárdica (rodea al corazón).
Células de cúmulo	Células que forman el <i>cumulus oophorus</i> también conocido como <i>discus proligerus</i> , <i>discus oophorus</i> o <i>discus ovigerous</i> , es un clúster de células que rodean al ovocito tanto en el folículo ovárico como después de la ovulación. En el folículo antral este cúmulo puede ser visto como una extensión de la capa granulosa. Esta capa rodea al folículo luego de la ovulación con el nombre de corona radiata y debe ser atravesada por los espermatozoides para que tenga lugar la fecundación.
Células de la granulosa	Células somáticas provenientes del cordón sexual. En el folículo ovárico primario y, posteriormente, en el desarrollo del folículo (foliculogénesis), las células de la granulosa avanzan para formar el <i>cumulus oophorus</i> . Producen esteroides sexuales, así como múltiples factores de crecimiento que tienen el objetivo interactuar con el ovocito durante su desarrollo.

Células de espermatogénesis	Células que intervienen durante la espermatogénesis es un proceso que se lleva a cabo en los testículos de los hombres (gónadas), en su interior se encuentran los túbulos seminíferos en el epitelio de éstos se asientan las células germinativas o espermatogonias. Este proceso también comprende la gametogénesis masculina caracterizada por la maduración final de los espermatozoides, que se produce en el epidídimo. Son células que pueden presentar una dotación haploide o diploide.
Células de trofoblasto	Forman la capa externa del blastocisto, que rodean la cavidad del blastocisto (blastocele), que provee nutrientes al preembrión y que dará lugar a algunos tejidos extraembrionarios como la placenta.
Ciclo autólogo	Ciclo de reproducción asistida dónde se utilizan los gametos o preembriones propios de la pareja.
Ciclo heterólogo	Ciclo de reproducción asistida dónde se utilizan los gametos o preembriones procedentes de donación.
Ciego	Se oculta a uno o varias partes de una investigación (investigador, personal médico, paciente) la información sobre a qué grupo de estudio pertenece un determinado sujeto.
Citoesqueleto	Entramado tridimensional de proteínas que provee soporte interno en las células, organiza las estructuras internas e interviene en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular. Se trata de una estructura dinámica que mantiene la forma de la célula, facilita la movilidad celular (usando estructuras como los cilios y los flagelos), y desempeña un importante papel tanto en el tráfico intracelular (por ejemplo, los movimientos de vesículas y orgánulos) y en la división celular.
Citoplasma	Estructura celular cuya apariencia es viscosa, localizada entre de la membrana plasmática y la membrana nuclear. En él se encuentran localizados ciertos orgánulos como mitocondrias, aparato de Golgi, Retículo endoplásmico, ribosomas, etc.
Compactación	Proceso mediante el que el preembrión después de sucesivas divisiones celulares alcanza el estadio de mórula. Es fundamental para que las células establezcan conexiones entre ellas.
Cocultivo de células somáticas	Tipo de cultivo embrionario dónde el preembrión tiene como soporte una capa de células somáticas. Estas células ayudan al desarrollo del preembrión en dos sentidos, aportando los nutrientes necesarios y eliminando las sustancias de desecho que provocan toxicidad para el preembrión. Se han realizado diversos tipos de cocultivo como puede ser el de fibroblastos.

Coefficiente de varianza	Se utiliza en estadística, cuando se desea hacer referencia a la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable. Cuánto más elevado es el valor del coeficiente de variación mayor heterogeneidad de los valores de la variable.
Concepción espontánea	Concepción o fecundación que se da sin que intervengan técnicas de reproducción asistida.
Consentimiento informado	En la asistencia sanitaria el Consentimiento Informado debe entenderse como un proceso de comunicación e información entre el profesional sanitario y la persona atendida; proceso que culmina con la aceptación o negación por parte del paciente competente de un procedimiento diagnóstico o terapéutico, después de conocer los riesgos, beneficios y alternativas, para poder implicarse libremente en la decisión.
Corona radiata	Estructura de células que rodea a un ovocito secundario y posteriormente al ovocito maduro. Se trata de varias células foliculares que están unidas a la zona pelúcida.
Corpúsculo polar	Células que contienen el material genético sobrante del ovocito. El ovocito en metafase II debe mostrar el primer corpúsculo polar y una vez se realiza la fecundación se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar.
Criopreservación de preembriones	Proceso que se usa para congelar uno o más preembriones y conservarlos para su uso en el futuro.
Criopreservación de gametos	Congelación de gametos masculinos (espermatozoide) o femeninos (ovocito) para su futura utilización.
Cromátidas	Es cada una de las dos unidades longitudinales del cromosoma ya duplicado, y está unida a su cromátida hermana por el centrómero.
Cromatografía líquida	Es una técnica analítica de separación que permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la adsorción selectiva de los constituyentes de una mezcla y no debe confundirse con una técnica cuantitativa o cualitativa de análisis.
Cultivo embrionario monofásico	Cultivo embrionario en el cual se utiliza el mismo medio de cultivo para todas las etapas embrionarias que el preembrión se encuentra en cultivo in vitro.
Cultivo embrionario prolongado	Cultivo embrionario in vitro hasta estadio de blastocisto.
Cultivo embrionario secuencial	Los preembriones se cultivan en medios de cultivo diferentes, puesto que los requerimientos nutricionales del preembrión varían y por tanto es importante ajustar las condiciones del medio en el que están desarrollándose.
Denudación o decumulación ovocitaria	Proceso por el que los ovocitos son desprovistos de las células del cúmulo que los rodean. Este proceso se lleva a cabo antes de la fecundación en los procesos de ICSI y postfecundación en casos de fecundación in vitro convencional.

Desviación estándar	Medida de dispersión más común, que indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la media. Mientras mayor sea la desviación estándar, mayor será la dispersión de los datos.
Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP)	Estudio del material genético del preembrión antes de transferirlo al útero para detectar si hay alguna alteración genética concreta. Este estudio se realiza cuando los preembriones se encuentran o bien en la fase de 6-8 células (día 3 de desarrollo), o bien en estadio de blastocisto (día 5 de desarrollo). Se realiza una biopsia de las células de los preembriones y se descartan los que no son viables, sólo los preembriones sanos que transferirán al útero.
Diploide	Que presenta en su núcleo dos juegos de cromosomas homólogos, células 2n.
Divergencia genética	La separación del patrimonio genético de la población de las piscinas de genes de otras poblaciones debido a la deriva genética, mutación y selección. La divergencia continua puede llevar a la especiación.
Donación de Ovocitos	La donación de ovocitos u ovodonación es el proceso por el que una mujer dona ovocitos a otra (receptora) con el propósito de usarlos en alguna técnica de reproducción asistida.
Eclampsia	Enfermedad grave caracterizada por aparición de convulsiones o coma durante el embarazo en una mujer después de la vigésima semana de gestación, el parto o en las primeras horas del puerperio sin tener relación con afecciones neurológicas.
Edad gestacional	Término más común usado durante la gestación o embarazo para describir qué tan avanzado está éste, normalmente una gestación debe estar comprendida entre las 38 y las 42 semanas.
Endometrio	Mucosa que recubre el interior del útero, consiste en un epitelio simple cilíndrico con o sin cilios, glándulas y un estroma. Es rico en tejido conjuntivo y está altamente vascularizado. Su función es la de alojar blastocisto después de la fecundación, permitiendo su implantación.
Endosalpinx	Mucosa con pliegues y cilios que tapiza el interior de las trompas de Falopio y que se encarga del transporte y sustento del preembrión en su recorrido por las mismas hasta llegar al útero para implantarse.
Ensayo clínico (EC)	Un ensayo clínico (EC) es una evaluación experimental de un producto, sustancia, medicamento, biológico, vacunas, técnica diagnóstica o terapéutica que pretende valorar su eficacia y seguridad. Es un diseño que permite comparar el efecto y el valor de una o más intervenciones, comparando el grupo de estudio al grupo control.

Ensayo clínico aleatorizado (ECA)	En inglés, <i>Randomized Controlled Trial</i> (RCT) El ensayo clínico aleatorizado (ECA) o el ensayo clínico controlado (ECC) corresponde a un diseño analítico. Las condiciones de estudio son controladas por los investigadores (carácter experimental) y de tipo prospectivo (temporalidad del estudio).
Epidímino	Tubo estrecho y alargado, situado en la parte posterior del testículo que conecta los conductos deferentes a cada testículo. Formado por el conjunto de conductos seminíferos.
Education Resources Information Center (ERIC)	Es la mayor base de datos especializada en educación disponible en línea. Está financiada por el <i>Institute of Education Sciences</i> del departamento de Educación de Estados Unidos.
Espacio perivitelino	Espacio que queda entre el ovocito y la zona pelúcida que lo envuelve, de un grosor aproximado de entre 0,2 y 0,4 micras.
Espectrometría de masas	Técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica (incluyendo biopolímeros y macromoléculas naturales o artificiales) y obtener información cualitativa o cuantitativa. Posibilita la obtención de la masa molecular del compuesto analizado así como obtener información estructural del mismo, o simplemente detectar su presencia y/o cuantificar su concentración.
Estadios embrionarios	Etapas del desarrollo embrionario.
Estradiol	Es una hormona esteroide sexual femenina. El estradiol es abreviado E ₂ ya que tiene dos grupos hidroxilos en su estructura molecular. El estradiol es el estrógeno predominante durante los años reproductivos tanto en los niveles séricos absolutos como también en la actividad estrogénica. El estradiol también está presente en los hombres, siendo producida como un metabolito activo de la testosterona por la enzima aromatasa.
Estudios aleatorizados	Estudio dónde se lleva a cabo la aleatorización de los sujetos a un grupo control o experimental de manera randomizada o aleatorizada (al azar).
Estudios multicéntricos	Estudios en los que intervienen más de un centro de investigación o sanitario.
Estudios observacionales	Estudios de carácter estadístico y demográfico, ya sean de tipo sociológico o biológico (estudios epidemiológicos) en los que no hay intervención por parte del investigador, y éste se limita a medir las variables que define en el estudio. Un estudio observacional puede ser descriptivo o analítico.
Estudios observacionales longitudinales	Se desarrollan durante un período definido de tiempo y suponen trabajar con dos bloques de información relativos a la misma población, la existente al comienzo del período en estudio y la existente al final de ese período.

Estudios prospectivos	Estudio longitudinal en el tiempo que se diseña y comienza a realizarse en el presente, pero los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo, en el futuro.
Estudios retrospectivos	Estudio longitudinal en el tiempo que se analiza en el presente, pero con datos del pasado. Su inicio es posterior a los hechos estudiados.
Factor de confusión	Una variable o factor que distorsiona la medida de la asociación entre otras dos variables.
Factor de crecimiento	En inglés <i>Growth Factor</i> (GF), son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular, capaces de actuar incluso a concentraciones muy bajas. La función principal es la del control externo del ciclo celular.
Fase lútea	Esta fase también se llama progestativa, porque son secretadas cantidades importantes de progesterona. Tiene una duración constante de 14 ± 2 días. Después de la ovulación la estructura folicular que se mantiene en el ovario se convierte en una glándula conocida como cuerpo lúteo, que tiene una duración de unos 14 días, cuando los niveles de progesterona y estrógeno descienden y se produce la menstruación.
Fenotipo	Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.
Fecundación In Vitro (FIV)	La Fecundación in Vitro es una técnica de laboratorio que permite la fecundación de un ovocito con un espermatozoide fuera del útero. Existen 4 posibles modalidades de FIV: la FIV con ovocitos propios y semen de la pareja, la FIV con ovocitos propios y semen de donante, la FIV con ovocitos de donante y semen de la pareja y la FIV con ovocitos de donante y semen de donante.
Fibroblastos	Tipo celular característico y más abundante del tejido conectivo, su función principal es la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular de dicho tipo de tejido.
Filamentos de actina	Constituyen uno de los componentes del citoesqueleto. Suelen ser más abundantes cerca de la membrana plasmática, pero su distribución y organización intracelular depende mucho del tipo celular. Los filamentos de actina realizan infinidad de funciones (división celular, movimiento, endocitosis, fagocitosis, soporte celular, etc.).
Fluido celómico	Fluido lubricante que se encuentra en las cavidades celómicas que se forman en la etapa embrionaria.

<p>Folículos antrales</p>	<p>Estos folículos secundarios tienen más de una capa de células de granulosa, y sobre estas células se observan células de la teca. El folículo antral, crece hasta alcanzar un diámetro de unas 150 micras y presenta una cavidad entre las células granulósicas, que está llena de líquido folicular. Esta estructura, llamada antro, terminará rodeando completamente al ovocito hasta la ovulación.</p>
<p>Folículos preovulatorios</p>	<p>También llamado folículo de Graaf, folículo terciario, folículo maduro, folículo antral tardío o folículo preovulatorio, es la etapa final del proceso de foliculogénesis. El ovocito que se encuentra en el interior será expulsado al ovario en el momento de la ovulación hacia trompa de Falopio para encontrarse con el espermatozoide y ser fecundado.</p>
<p>Folículos primordiales</p>	<p>Son aquellos que presentan el ovocito rodeado de una monocapa celular, constituida en lo general por 4 a 8 células de la granulosa de forma fusiforme. Se forman a partir de la octava semana de gestación.</p>
<p>Fosfolípidos</p>	<p>Son un tipo de lípidos anfipáticos compuestos por una molécula de alcohol (glicerol o de esfingosina), a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otras moléculas, que generalmente contienen nitrógeno, como colina, serina o etanolamina y muchas veces posee una carga eléctrica. Todas las membranas plasmáticas activas de las células poseen una bicapa de fosfolípidos.</p>
<p>Fragmentación ADN</p>	<p>Estas alteraciones en el material genético del espermatozoide que pueden incluir anomalías en la condensación de la cromatina y en la integridad de la molécula del ADN cuando presenta rupturas tanto de doble como de simple cadena y también anomalías cromosómicas, demostradas por una correlación entre las alteraciones en la organización del material genómico del ADN.</p>
<p>Fragmentación preembrión</p>	<p>Los preembriones con mucha fragmentación presentan una mayor tasa de anomalías cromosómicas, principalmente mosaicismo. La presencia de fragmentos disminuyen la tasa implantación baja cuando se transfieren preembriones con más de un 10-20% de fragmentación en día 2 de desarrollo.</p>
<p>Gameto</p>	<p>Células sexuales haploides de los organismos pluricelulares originadas por meiosis a partir de las células germinales.</p>
<p>Gemelos monozigóticos</p>	<p>Gemelos que provienen de un mismo cigoto. Se refiere a la bipartición celular de un cigoto, que da origen a dos preembriones distintos por lo que da lugar a gemelos genéticamente idénticos.</p>

Glicoproteínas	Son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Destacan entre otras funciones la estructural y el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glicocáliz).
Glucosa	Es un monosacárido con fórmula molecular, se trata de una hexosa, ya que contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula (es un grupo aldehído). Se trata del sustrato preferido del embrión a partir del día 3 de desarrollo embrionario.
Gonadotropina coriónica Humana (hCG)	La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoproteica producida en el embarazo, fabricada por el preembrión en desarrollo poco después de la concepción y más tarde por el sinciotrofoblasto (parte de la placenta). Su función es evitar la desintegración del cuerpo lúteo del ovario y, por ende, mantener la producción de progesterona, fundamental para la gestación.
Hidrosalpinx	Es una alteración en la que una o las dos trompas de Falopio de la mujer se encuentran bloqueadas y dilatadas debido a una acumulación de líquido en su interior, generalmente como consecuencia de una infección previa. Provoca el bloqueo en las trompas de Falopio por lo que impide la fecundación y de la misma manera imposibilita el traslado del ovocito fecundado por la trompa por lo que aumenta el riesgo de embarazo ectópico.
Hiperestimulación ovárica controlada (HOC)	Consiste en la administración de hormonas y tiene como objetivo reclutar múltiples folículos para incrementar el número de ovocitos disponibles y con ello las posibilidades de embarazo en un ciclo de estimulación.
Hormona Anti-Mulleriana	Glicoproteína dimérica que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller en el preembrión masculino. En la embriogénesis femenina es la encargada del desarrollo de la vagina, el útero, el cérvix, y los oviductos. No se detecta en las mujeres hasta la pubertad, es expresada por células granulosa en el ovario durante la edad reproductiva y controla la formación de los folículos primarios inhibiendo el excesivo reclutamiento folicular por el FSH. Útil para medir algunas funciones ováricas como la reserva ovárica.
Hormona estimuladora de los folículos (FSH)	Hormona miembro de la familia de las hormonas glicoproteicas, se sintetiza en las células de la pituitaria, las gonadotropas. Los receptores de FSH se localizan en las células de Sertoli de los testículos y las células de la granulosa del ovario. En la mujer, la FSH regula la fase folicular de la ovulación.

<p>Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)</p>	<p>Hormona liberada por neuronas del hipotálamo en el sistema de vasos sanguíneos hacia la hipófisis. Es un decapeptido que estimula la liberación de gonadotropinas (hormona luteinizante, LH, y foliculoestimulante, FSH) por parte de la adenohipófisis</p>
<p>Hormona luteinizante (LH)</p>	<p>Es una hormona gonadotrópica de naturaleza glicoproteica que, al igual que la FSH, es producida por el lóbulo anterior de la hipófisis o glándula pituitaria. En el hombre es la hormona que regula la secreción de testosterona, actuando sobre las células de Leydig en los testículos; y en la mujer controla la maduración de los folículos, la ovulación, la iniciación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. La LH estimula la ovulación femenina y la producción de testosterona masculina.</p>
<p>Huso meiótico</p>	<p>También llamado huso acromático es la estructura subcelular que se forma durante la división celular, tanto en las mitosis como en las meiosis. El huso acromático está formado por centenares de microtúbulos de tubulina (dímero de proteína).</p>
<p>ICSI (Inyección intracitoplasmática de espermatozoides)</p>	<p>La Fecundación in Vitro con ICSI es una técnica de reproducción asistida que permite inseminar un ovocito mediante la microinyección en su interior de un solo espermatozoide.</p>
<p>Incubador de preembriones</p>	<p>Aparatología necesaria para el mantenimiento de los preembriones durante el cultivo embrionario. Reproduce las condiciones del tracto reproductivo materno in vitro.</p>
<p>Incubadores con tecnología SCI o Time-Lapse</p>	<p>Incubadores que pueden tomar imágenes digitales de los preembriones a intervalos de tiempo frecuentes. Estos sistemas permiten evaluar la calidad de los preembriones sin extraerlos físicamente del incubador.</p>
<p>Inseminación Artificial Intrauterina (IAI)</p>	<p>Técnica de reproducción asistida que consiste en colocar en el útero los espermatozoides seleccionados previamente de una muestra de semen. Pueden ser de la pareja (IAC) o de un banco de semen (IAD).</p>
<p>Intervalo de confianza (IC)</p>	<p>En estadística, se llama intervalo de confianza a un par o varios pares de números entre los cuales se estima que estará cierto valor desconocido con una determinada probabilidad de acierto. Se calcula a partir de datos de una muestra, y el valor desconocido es un parámetro poblacional. La probabilidad de éxito en la estimación se representa con $1 - \alpha$ (nivel de confianza) donde α es el llamado error aleatorio (nivel de significación), medida de las posibilidades de fallar en la estimación mediante tal intervalo. Un intervalo más amplio tendrá más probabilidad de acierto (mayor nivel de confianza), mientras que para un intervalo más pequeño, que ofrece una estimación más precisa, aumenta su probabilidad de error.</p>

Iones	Es una partícula cargada eléctricamente constituida por un átomo o molécula que no es eléctricamente neutro. La ionización se produce cuando a partir de un estado neutro de un átomo o partícula se ganan, se han ganado o perdido electrones. Los iones cargados negativamente (existen más electrones que protones) y los cargados positivamente se conocen como cationes.
ISO (<i>International Organization for Standardization</i>)	Las normas ISO son documentos que especifican requerimientos que pueden ser empleados en organizaciones para garantizar que los productos y/o servicios ofrecidos por dichas organizaciones cumplen con su objetivo. Hasta el momento existen publicadas alrededor de 19.500 normas internacionales que se pueden obtener desde la página oficial de ISO.
Lactato	Forma ionizada del ácido láctico, es un compuesto químico que desempeña importantes roles en varios procesos bioquímicos.
Macrosomía	Se trata del desarrollo o tamaño excesivo del cuerpo, como en el caso de un recién nacido con un peso por arriba del promedio.
Maduración in vitro de ovocitos (MIV)	La maduración in vitro de ovocitos consiste en la aspiración de ovocitos inmaduros y que maduren in vitro en el laboratorio. Es ofrecida principalmente a pacientes con alto riesgo de desarrollar un síndrome de hiperestimulación ovárica, especialmente pacientes con síndrome de ovario poliquístico o a pacientes oncológicas.
MART (<i>Medically treated AR</i>):	Sinónimo de Técnicas de reproducción asistida (TRA).
Masa Celular Interna (MCI)	En inglés <i>Inner Cell Mass</i> (ICM), cuando se forma la blástula o blastocisto, éste se compone de una capa de células (trofoblasto) que rodean la cavidad (blastocele) y MCI que es un conglomerado de células que se encuentra en un extremo (polo embrionario). Las células de la MCI darán lugar al feto y otras estructuras extraembrionarias como el amnios, saco vitelino y alantoides.
Maternidad Subrogada	La gestación subrogada, maternidad subrogada, gestación por sustitución, vientre de alquiler o subrogación es la práctica por la que una mujer gesta un hijo para otra persona o pareja.
Media	En matemáticas y estadística una media o promedio es una medida de tendencia central. Este cálculo representa por sí solo a todo un conjunto de medidas. La mayoría de veces hablamos simplemente de media para referirnos a la media aritmética.

Mediana	En el ámbito de la estadística, la mediana representa el valor de la variable de posición central en un conjunto de datos ordenados. Cuando una serie de datos no sigue una distribución normal se calcula la mediana en lugar de la media aritmética.
Medio de cultivo	Los medios de cultivo para la FIV y para las etapas iniciales del desarrollo embrionario son aquellas sustancias complejas que proveen de nutrientes y otras sustancias básicas al ovocito, cigoto y preembrión para su desarrollo in vitro. Por lo general son medios de casas comerciales que no suelen estar descritos a nivel cualitativo y cuantitativo.
Meiosis	Es un tipo de división celular implicada en la producción de los gametos por disminuir la carga cromosómica de éstos de células diploides a haploides. Proceso en el que una célula diploide (2n) experimenta dos divisiones sucesivas para generar cuatro células haploides (n).
Metaanálisis	Conjunto de herramientas estadísticas, que son útiles para sintetizar los datos de una colección de estudios.
Metabolito	Es cualquier molécula utilizada, capaz o producida durante el metabolismo.
Metaboloma	Representa la colección de todos los metabolitos en una célula, tejido, órgano u organismo que son producto de los procesos celulares.
Metabolómica	Es el estudio científico de los procesos químicos que involucran metabolitos. Es el "estudio sistemático de las huellas únicas que dejan los procesos celulares específicos en su paso", es decir, el estudio del perfil de los metabolitos.
Metafase I (MI)	La metafase es la segunda fase de la mitosis y de la meiosis que se sitúa después de la profase, se desintegra la envoltura nuclear y aparecen los microtúbulos del huso acromático (también llamado meiótico o mitótico) que provoca el alineamiento equilibrado de los cromosomas debido a las fuerzas iguales y opuestas que se generan por los cinetocoros hermanos. Modificaciones epigenéticas: Modificaciones que sufre el ADN para que sea expresado de manera diferencial en los distintos tipos celulares o en distintas situaciones del desarrollo o de requerimiento fisiológico (expresión génica).
Metafase II (MII)	Segunda metafase de la meiosis donde los cromosomas se acomodan en la placa ecuatorial al igual que en la metafase I (mitosis). En la metafase I las cromátidas se disponen en haces de cuatro (tétrada) y en la metafase II lo hacen en grupos de dos (como en la metafase mitótica).
Metiloma	Reúne todas las modificaciones químicas llamadas metilación de nuestro ADN. Las metilaciones sirven para regular la expresión de los genes.

Miosalpinx	Capa muscular de la trompa de Falopio constituida por un plano externo de fibras musculares longitudinales y otro interno más espeso formado por células circulares.
Mitocondrias	Orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular (respiración celular). Sintetizan ATP a partir de otros sustratos (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos).
Modelo animal	Un modelo animal es una especie no humana que se usa en investigación médica porque puede extrapolar aspectos de una enfermedad humana. Los modelos animales permiten obtener información sobre una patología y cómo prevenirla, diagnosticarla y tratarla. Usando animales, los investigadores pueden realizar experimentos que serían impracticables o no éticos si se hicieran en humanos.
Mórula	Es una masa de células que se da como consecuencia de la segmentación del cigoto. Da lugar a una estructura que se compone de 12 a 16 células. La mórula aún conserva la zona pelúcida y la corona radiada del ovocito.
Nucleósidos	Molécula monomérica orgánica que forma parte de los ácidos nucleicos. Resultan de la unión covalente entre una base nitrogenada con una pentosa que puede ser ribosa o desoxirribosa.
Nucleótidos	Combinación de un nucleósido con un grupo fosfórico (ácido fosfórico) mediante determinadas quinasas de la célula, produciendo nucleótidos, que son los componentes moleculares básicos del ADN y el ARN.
Obstrucción tubárica	Problema de fertilidad que se produce cuando las trompas de Falopio están tapadas y por tanto no permiten el paso a su través. Hablamos de obstrucción unilateral cuando se produce solo en una trompa y bilateral si ocurre en ambas.
Organelas citoplasmáticas	También llamados orgánulos, organelos o elementos celulares Son las diferentes estructuras suspendidas en el citoplasma de una célula eucariota, que tienen una forma y unas funciones especializadas bien definidas y diferenciadas.
Osmolaridad	Medida para expresar la concentración total (medida en osmoles/litro) de sustancias en disoluciones usadas en medicina. También llamada concentración osmótica mide la concentración de solutos.
Patrón expresión génica	Es la medida de la actividad (de la expresión génica) de miles de genes simultáneamente, para crear una imagen global de la función celular.
Percentil	Medida de posición usada en estadística que indica, una vez ordenados los datos de menor a mayor, el valor de la variable por debajo del cual se encuentra un porcentaje dado de observaciones en un grupo de observaciones.

Piruvato	Se trata anión del ácido pirúvico. Es una pequeña molécula, de tan solo 3 carbonos, que resulta ser el eje central del metabolismo celular de todos los seres vivos.
Placa metafásica	Estructura celular que se encuentra en el plano ecuatorial de la célula, se forma alineamiento equilibrado de los cromosomas en la línea media del huso que se debe a las fuerzas iguales y opuestas que se generan por los cinetocoros hermanos. Está formada por los microtúbulos que encuentran a los cinetocoros en la prometafase y los centrosomas situados en los dos polos de la célula. Este alineamiento equilibrado se debe a las fuerzas opuestas de la misma magnitud que se generan en los cinetocoros hermanos. Los brazos cromosómicos tienden a quedar apuntando hacia la periferia de la célula y a colocarse perpendicularmente a las fibras del huso. Los cinetocoros que no estén anclados generan una señal que activa el punto de control de la división celular.
Plasma seminal	Mezcla de secreciones que se originan principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias masculinas que sirve como vehículo de los espermatozoides. Tiene función protectora de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo femenino ya que modula la respuesta inflamatoria y sus proteínas protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los leucocitos polimorfonucleados (PMN) presentes en el útero, también actúa en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos y finalmente participa de manera importante en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y de modificación de la superficie de membrana espermática.
Preembrión	Término que se aplica desde la fecundación, formación del cigoto hasta el final de la octava semana de desarrollo embrionario. A partir de la octava semana, el preembrión pasa a denominarse feto.
Preembrión preimplantatorio	Preembrión que aún no ha implantado en el endometrio para dar lugar a la gestación.
Preembrión postcompactado	Preembrión que ha sufrido el proceso de compactación embrionaria.

<p>Preemclapsia</p>	<p>Complicación médica más común y peligrosa de la gestación que se asocia a hipertensión inducida durante el embarazo y está asociada a elevados niveles de proteína en la orina (proteinuria) también se producen edemas en las extremidades. Puede haber varias etiologías para la preeclampsia aunque es posible que exista un componente en la placenta que cause disfunción endotelial en los vasos sanguíneos maternos de mujeres susceptibles. El signo más notorio de la enfermedad es una elevada presión arterial y el único tratamiento es el parto, siendo la inducción del parto o la cesárea los procedimientos más comunes. Puede aparecer hasta seis semanas posparto.</p>
<p>Procesos anabólicos</p>	<p>Son procesos metabólicos de construcción, en los que se obtienen moléculas grandes a partir de otras más pequeñas por lo que se consume energía.</p>
<p>Proteoma</p>	<p>Es la totalidad de proteínas expresadas en una célula particular bajo condiciones de medioambiente y etapa de desarrollo (o ciclo celular) específicas.</p>
<p>Profase I</p>	<p>La Profase I de la primera división meiótica es la etapa más compleja del proceso. El ovocito entra en meiosis antes del nacimiento, deteniéndose en la profase I hasta la entrada en la pubertad. Los ovocitos primarios no avanzan su división meiótica más allá de la fase de diploteno I, completándola finalmente en la etapa postpuberal.</p>
<p>Progesterona</p>	<p>Es una hormona esteroide involucrada en el ciclo menstrual femenino, el embarazo (promueve la gestación) y la embriogénesis, tanto en los seres humanos como en otras especies. La progesterona pertenece a una clase de hormonas llamadas progestágenos, y es el principal progestágeno humano de origen natural. Su fuente principal son el ovario (cuerpo lúteo) y la placenta, aunque también puede sintetizarse en las glándulas adrenales y en el hígado.</p>
<p>Pronúcleos</p>	<p>Es el núcleo de los gametos. Posee la mitad del número de cromosomas de los núcleos de las otras células no reproductivas (dotación haploide). Durante la fecundación, los pronúcleos de un ovocito y un espermatozoide se fusionan para crear el núcleo único del cigoto.</p>
<p>Proteínas de Choque Térmico (PCT)</p>	<p>En inglés <i>Heat Shock Proteins</i> (HSP): Son un conjunto de proteínas que producen las células tanto de organismos unicelulares como pluricelulares, cuando se encuentran en un medio ambiente que le provoca cualquier tipo de estrés.</p>

Prueba de significación	Las pruebas de significación estadística sirven para comparar variables entre distintas muestras. Si la distribución de la muestra es normal se aplican los llamados tests paramétricos. Si la distribución no puede asumirse normal se aplican las pruebas no paramétricas. Hay que tener siempre en cuenta que los tests paramétricos son más potentes y dan más información que los no paramétricos, por lo que, si pueden usarse, se prefieren.
PsycINFO®	Es una base de datos de resúmenes de literatura en el campo de la psicología. Es producido por la <i>American Psychological Association</i> (APA) y distribuido en APA PsycNET de la asociación y a través de proveedores externos.
Pubmed Central®	Es un motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE de citaciones y resúmenes de artículos de investigación biomédica. Ofrecido por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos.
Quelantes	También llamado secuestrante, o antagonista de metales pesados, es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados. A estos complejos se los conoce como quelatos, palabra que proviene de la palabra griega chele que significa "garra".
Receptora	En medicina reproductiva es la paciente que recibe ovocitos que provienen de una donante. Se fecundaran estos ovocitos con espermatozoides de su pareja o también de donante y los preembriones generados se transfieren a la paciente receptora para que implanten y den lugar a una gestación.
Recién Nacidos Vivos (RNV)	Niños recién nacidos vivos obtenidos de gestaciones.
Reducción Fetal	Supone la interrupción selectiva del desarrollo de uno o varios fetos en el primer trimestre de un embarazo múltiple de alto riesgo (trillizos, cuatrillizos o más). Es una práctica que se ha desarrollado con el auge de las técnicas de reproducción asistida.
Regresión lineal:	En estadística la regresión lineal o ajuste lineal es un modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre una variable dependiente Y , las variables independientes X_i y un término aleatorio ϵ .
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	Fenómeno físico basado en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos. También son los métodos científicos que exploran este fenómeno para estudiar moléculas (espectroscopia de RMN), macromoléculas (RMN biomolecular), así como tejidos y organismos completos (imagen por resonancia magnética).

Retículo endoplasmático	Orgánulo distribuido por todo el citoplasma de una célula eucariota, la cual se representa como un complejo sistema de membranas dispuestas en forma de sacos aplanados y túbulos que están interconectados entre sí compartiendo el mismo espacio interno. Intervienen en funciones relacionadas con la síntesis proteica, metabolismo de lípidos y algunos esteroides, así como el transporte intracelular.
Revisión Bibliográfica o artículo de revisión	Tipo de artículo científico que sin ser original recopila la información más relevante sobre un tema específico.
Riesgo relativo (RR)	En estadística y epidemiología, el riesgo relativo es el cociente entre el riesgo en el grupo con el factor de exposición o factor de riesgo y el riesgo en el grupo de referencia (que no tiene el factor de exposición) como índice de asociación. SE suele calcular en estudios de cohortes (prospectivos) y el ensayo clínico. Su fórmula sería: $RR = \frac{\text{incidencia acumulada en expuestos}}{\text{incidencia acumulada en no expuestos}}$
Significación estadística	En estadística, un resultado o efecto es estadísticamente significativo cuando es improbable que haya sido debido al azar. Una "diferencia estadísticamente significativa" solamente significa que hay evidencias estadísticas de que hay una diferencia; no significa que la diferencia sea grande, importante o radicalmente diferente.
Síndrome de la descendencia gigante	En animales, se sabe que ART produce fetos y recién nacidos más grandes (<i>Large Offspring Syndrome</i> , LOS) que los concebido de forma espontánea, lo que se debe, entre otras causas, a defectos de programación genómica.
Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO)	Complicación casi exclusivamente iatrogénica derivada de la hiperestimulación farmacológica del ovario y desencadenada tras la administración de la hormona gonadotrofina coriónica (hCG), para los tratamientos de reproducción asistida (TRA).
Subfertilidad	Reducción de las posibilidades para concebir en una pareja en edad por una serie de trastornos. Las causas pueden ser femeninas, masculinas o una combinación de ambas. Se refiere a las dificultades que presenta una pareja para concebir hijos después de un año manteniendo relaciones sexuales habituales sin el uso de anticonceptivos.
Tamaño muestral	En estadística el tamaño de la muestra es el número de sujetos que componen la muestra extraída de una población, necesarios para que los datos obtenidos sean representativos de la población.
Tasa de gestación (TG)	Porcentaje de pacientes que se quedan embarazadas por ciclo de estimulación realizado o por transferencia embrionaria.

Tasa de implantación (TI)	Porcentaje de preembriones que se implantan en el útero después de la transferencia por ciclo de estimulación realizado o por transferencia embrionaria.
Tasa de parto (TP)	Porcentaje de pacientes que dan a luz por ciclo de estimulación realizado o por transferencia embrionaria.
Tasa de parto Gemelar (TPG)	Porcentaje de pacientes que dan a luz dos RNV por ciclo de estimulación realizado o por transferencia embrionaria.
Tasa de parto múltiple (TPM)	Porcentaje de pacientes que dan a luz más de dos RNV por ciclo de estimulación realizado o por transferencia embrionaria.
Tasa de aborto (TA)	Porcentaje de pacientes tienen un aborto por ciclo de estimulación realizado o por transferencia embrionaria.
Tasa muerte perinatal (TMP)	Porcentaje de fetos o RNV por ciclo de estimulación realizado o por transferencia embrionaria. La mortalidad perinatal o muerte perinatal se refiere a la muerte del feto o recién nacido desde las 28 semanas de embarazo hasta la primera semana de vida.
Técnicas de Reproducción asistida (TRA)	La Reproducción Asistida es el conjunto de técnicas y tratamientos médicos destinados a favorecer el embarazo en caso de problemas de fertilidad masculinos, femeninos o ambos. En los últimos años, esta disciplina médica ha ayudado también a mujeres que afrontan la maternidad de forma individual, sin pareja, y a parejas de mujeres, a ser madres.
Test de Apgar	Examen clínico que se realiza al recién nacido después del parto, en donde el pediatra, neonatólogo, matron/a o enfermero/a certificado/a realiza una prueba en la que se evalúan cinco parámetros (tono muscular, esfuerzo respiratorio, frecuencia cardíaca, reflejos, y color de la piel) para obtener una primera valoración simple y clínica sobre el estado general del neonato después del parto
Transferencia Embrionaria doble (TED)	Transferencia de dos preembriones.
Transferencia Embrionaria postcriopreservación (TEC)	Transferencia de los preembriones desvitrificados obtenidos en laboratorio FIV.
Transferencia de un único preembrión (TUE)	En inglés <i>Single Embryo Transfer (SET)</i> , es la transferencia de un solo preembrión para evitar embarazo múltiple.
Variables categóricas	Se denominan también variables cualitativas o variables de atributos. Los valores de una variable categórica son categorías o grupos mutuamente excluyentes. Los datos categóricos pueden tener o no tener un orden lógico.
Variables categóricas binarias	También conocida como variable dicotómica es una variable categórica que puede tomar dos valores.
Variables continuas	Los valores de una variable cuantitativa son números que suelen representar una medición.

Vesícula germinal (VG)	Los ovocitos en profase I, que muestran vesícula germinal, y no pueden ser utilizados en TRA debido a que tienen carga cromosómica diploide.
Vitrificación	Técnica de congelación muy poco agresiva para los preembriones (comparada con las técnicas antiguas de congelación lenta), lo que permite tener tasas de supervivencia embrionaria y de gestación muy elevadas.
Zona pelúcida	Se denomina zona pelúcida (ZP) a la capa externa que rodea el ovocito de los mamíferos, separándolo del espacio perivitelino. Está compuesta por varias glicoproteínas, agrupadas en cuatro familias: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 según sus propiedades inmunológicas y funcionales.
Zigoto	También se denomina cigoto, cigota, huevo o cigoto. Es la célula resultante de la unión del gameto masculino (espermatozoide) con el gameto femenino (ovocito) en la reproducción sexual de los organismos (animales, plantas, hongos y algunos eucariotas unicelulares). La fusión de los gametos va seguida de la fusión de los núcleos, con lo cual resulta que el núcleo del cigoto posee dos juegos completos de determinantes genéticos (cromosomas), cada uno de ellos procedente del núcleo de un gameto. Su citoplasma y sus orgánulos son siempre de origen materno al proceder del ovocito.

Hoja de información y Consentimiento informado entregado a los pacientes que participaron en el ECA

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

CÓDIGO Y TÍTULO DEL ESTUDIO: Eficacia clínica del uso de bajas concentraciones de oxígeno durante el cultivo embrionario *in Vitro*.

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Nombre y Apellidos: M^a José de los Santos, P. Gámiz, Pep Romero, Nicolás Prados.

b) Filiación: IVI-Valencia, IVI -Sevilla

c) Email: mjdelossantos@ivi.es

d) Teléfono / Fax: +34 963050991 / +34 963050999.

PROMOTOR: IVI Valencia

CENTRO: IVI-Valencia, IVI-Sevilla

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre una investigación que vamos a realizar y en la que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente, de acuerdo a la legislación vigente.

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

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

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

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Los laboratorios de las clínicas IVI son laboratorios de alto rendimiento equipados con tecnología de vanguardia que permite que los embriones crezcan de forma adecuada hasta que sean de nuevo transferidos al útero. Hoy en día la tecnología permite acercarnos más a las condiciones fisiológicas uterinas al poder cultivar los embriones en ambiente de bajo oxígeno al igual que ocurre en el útero. El **objetivo** del presente proyecto es conocer si cultivar los embriones en bajas concentraciones de oxígeno (que son las concentraciones encontradas en el útero), mejora la calidad de los embriones y por lo tanto la posibilidad de gestación. Para ello los embriones serán divididos en dos grupos al azar y crecerán dependiendo del grupo en que les toque en las condiciones de cultivo habituales o en condiciones de baja tensión de oxígeno.

Al mismo tiempo recogeremos los medios de cultivo donde han estado creciendo los preembriones los cuales habitualmente se descartan una vez éstos se han transferido y serán enviados a analizar mediante una técnica denominada Infra Red spectroscopy (NIR) con el fin de saber más sobre el comportamiento de los preembriones en las diferentes condiciones de cultivo.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Los resultados de las investigaciones que se van a llevar a cabo en el presente proyecto podrían suponer una mejora sustancial en los sistema de cultivo de *Fecundación in Vitro* que aumentaría las posibilidades de éxito de los tratamientos.

Tras la ejecución del proyecto, y si los resultados son favorables, se prevé la modificación de la metodología de cultivo en los laboratorio de IVI.

El cultivo de embriones en bajas concentraciones de oxígeno no representará un coste adicional ni riesgo alguno para usted ni para los preembriones.

CONFIDENCIALIDAD

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

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

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

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

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

Su participación en el estudio no le supondrá beneficio económico ni gasto adicional al tratamiento que se le practica en la clínica.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información relevante referente al estudio y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis. Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

CÓDIGO/NOMBRE DEL ESTUDIO: Eficacia clínica del uso de bajas concentraciones de oxígeno durante el cultivo embrionario *in Vitro*.

Código del Estudio:

Yo (nombre y apellidos de la pareja)

.....

Nº Historia:

Hemos leído la hoja de información que se me ha entregado:.....

Hemos podido hacer preguntas sobre el estudio:.....

Hemos recibido suficiente información sobre el estudio:.....

Hemos hablado con (nombre del investigador/Médico):

Comprendemos que nuestra participación es voluntaria:.....

Comprendemos que podemos retirarnos del estudio:.....

1º Cuando queramos:.....

2º Sin tener que dar explicaciones:.....

3º Sin que esto repercute en nuestros cuidados médicos:.....

Prestamos libremente nuestra conformidad para participar en el estudio y damos nuestro

Consentimiento para el acceso y utilización de nuestros datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma de los pacientes

Fecha:

Firma:

Firma:

Dña:

Don:

Firma del médico/investigador:

Nombre

Fecha: Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

CÓDIGO/NOMBRE DEL ESTUDIO: Eficacia clínica del uso de bajas concentraciones de oxígeno durante el cultivo embrionario *in Vitro*.

Código del Estudio:

Yo (nombre y apellidos de la pareja)

.....
.....

Nº Historia:

Hemos leído la hoja de información que se me ha entregado:.....

Hemos podido hacer preguntas sobre el estudio:.....

Hemos recibido suficiente información sobre el estudio:.....

Hemos hablado con (nombre del investigador/Médico):

Comprendemos que nuestra participación es voluntaria:.....

Comprendemos que podemos retirarnos del estudio:.....

1º Cuando queramos:.....

2º Sin tener que dar explicaciones:.....

3º Sin que esto repercuta en nuestros cuidados médicos:.....

Prestamos libremente nuestra conformidad para participar en el estudio y damos nuestro

Consentimiento para el acceso y utilización de nuestros datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma de los pacientes

Fecha:

Firma:

Firma:

Dña:

Don:

Firma del médico/investigador:

Nombre

Fecha: Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

