

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
CENTRO MÉDICO PUERTA DE HIERRO**

**EXAMEN GENÉTICO PREIMPLANTATORIO PARA ANEUPLOIDÍAS (PGT-A) EN EDAD
MATERNA AVANZADA: CORRELACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y SU EVALUACIÓN
MORFOLÓGICA**

T E S I S

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

**PRESENTA:
DRA. BEATRIZ HERNÁNDEZ MENDIETA**

**TUTOR:
DR. EFRAÍN PÉREZ PEÑA**

**ASESOR METODOLÓGICO:
DR. ERNESTO PÉREZ LUNA**

ZAPOPAN, JALISCO. JUNIO 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CARTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS

Por medio de la presente informamos que la C. Beatriz Hernández Mendieta, residente de la subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana ha concluido la escritura de su tesis "EXAMEN GENÉTICO PREIMPLANTATORIO PARA ANEUPLOIDÍAS (PGT-A) EN EDAD MATERNA AVANZADA: CORRELACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y SU EVALUACIÓN MORFOLÓGICA " y otorgamos la autorización para la presentación y defensa de la misma.

Dr. Efraín Pérez Peña

Director General Instituto Vida Guadalajara

Centro Médico Puerta de Hierro

Dr. Ernesto Pérez Luna

Jefe de Enseñanza Instituto Vida Guadalajara

Centro Médico Puerta de Hierro

ÍNDICE GENERAL

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	4
<i>Causas de aneuploidías</i>	5
<i>Edad y alteraciones genéticas</i>	6
<i>Origen parental de las aneuploidías</i>	7
EXAMEN GENÉTICO PREIMPLANTATORIO	8
SISTEMA DE GRADACIÓN MORFOLÓGICA DEL BLASTOCISTO	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
JUSTIFICACIÓN	13
METODOLOGÍA	14
<i>Pregunta de investigación</i>	14
<i>Tipo de estudio</i>	14
<i>Objetivo general</i>	14
<i>Objetivos específicos</i>	14
<i>Criterios de inclusión</i>	14
<i>Criterios de exclusión</i>	14
<i>Criterios de eliminación</i>	14
<i>Población de estudio</i>	15
<i>Ámbito geográfico donde se desarrollará la investigación</i>	15
<i>Metodología de la investigación</i>	15
<i>Especificación de las variables</i>	17
<i>Análisis estadístico de la información</i>	17
ASPECTOS ÉTICOS	18
Cronograma del proyecto	19
RESULTADOS	20
<i>Tipo de infertilidad</i>	20
<i>Características sociodemográficas y antropométricas</i>	21
<i>Determinación hormonal</i>	21
<i>Recuperación ovocitaria y desarrollo embrionario</i>	22
<i>PGT-A</i>	23
<i>Morfología embrionaria</i>	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	29
ANEXOS	30
<i>Hoja de obtención de datos</i>	30
BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características sociodemográficas y antropométricas en edad materna avanzada.	21
Tabla 2.1. Determinación hormonal basal en edad materna avanzada (35-39 años).	21
Tabla 2.2. Determinación hormonal basal en edad materna avanzada (≥ 40 años).	22
Tabla 3. Recuperación ovocitaria y desarrollo embrionario por grupo de edad.	22
Tabla 4. Relación de embriones euploides y aneuploides por grupo de edad.	23
Tabla 5. Patrón morfológico por grupo entre embriones euploides y aneuploides.	25

ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS

Gráfico 1. Grupos de edad en edad materna avanzada sometidas a FIV/ICSI (PGT-A).	20
Gráfico 2. Tipos de infertilidad en grupos de edad materna avanzada.	20
Gráfico 3. Recuperación ovocitaria y desarrollo embrionario por grupos de pacientes en relación con el total.	23
Gráfico 4. Relación de embriones euploides y aneuploides por grupo de edad y el total.	24
Gráfico 5. Distribución de aneuploidias en edad materna avanzada.	25
Gráfico 6.1. Patrón morfológico por grupo en embriones euploides.	26
Gráfico 6.2. Patrón morfológico por grupo en embriones aneuploides.	26

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

La obtención de un recién nacido sano es el principal objetivo de las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo existen factores intrínsecos que causan alteraciones cromosómicas y así un desenlace contrario a lo esperado, resultando en abortos o falla en la implantación.

El desarrollo humano temprano es un proceso dinámico y desafiante. El ovocito fertilizado tiene que facilitar la integración de la información genética masculina y posteriormente iniciar una serie de divisiones celulares para producir un embrión en estado de clivaje. El embrión debe desencadenar la activación de su genoma en el estado de 4-8 células, antes de la etapa de mórula y posterior de blastocisto, donde ya muestra signos visibles de dos linajes; el trofoectodermo como capa externa que formará la placenta y otros tejidos extra embrionarios, con un pequeño grupo de células, la masa celular interna de la cual se derivará el feto. El blastocisto debe entonces eclosionar, saliendo de la zona pelúcida que ha contenido al embrión los primeros 5 días de desarrollo para entonces la comunicación con el útero sea iniciada y se provoque la implantación.¹

En la especie humana un 10-30% de los óvulos fertilizados presenta un desequilibrio en la dosis cromosómica, en su mayoría presentados como monosomías o trisomías causados por errores meióticos, principalmente la no disyunción. Agregándose implicaciones clínicas importantes. Aproximadamente un tercio de los abortos son causados por aneuploidias, por lo que es la causa principal de pérdidas tempranas. Las únicas aneuploidias que son compatibles con la vida son las trisomías autosómicas 13 (Síndrome de Patau), 18 (síndrome de Edwards), 21 (síndrome de Down) y la aneuploidía de cromosomas sexuales, incluida la monosomía X (la única monosomía viable), sin embargo éstas son la principal causa genética de discapacidad, problemas en el desarrollo y retraso mental.²

A pesar de los avances recientes, sólo un número pequeño de embriones que son designados como de buena y suficiente calidad para ser transferidos, llegan a implantar y progresar hasta un embarazo a término. De acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés), en su último resumen en 2015 sobre Reproducción Asistida, reporta por transferencia de embriones propios una tasa de embarazo del 45%, de nacidos vivos un 36.7% y de nacimientos de producto único de 28.3%. Afirman que la edad de la mujer es el factor más importante para tener un nacido vivo cuando sus se usan óvulos propios, ya que de los 24 a los 34 años el porcentaje de nacidos vivos se encuentra entre el 30 y 40% y éste va disminuyendo si la

edad aumenta, así como la tasa de aneuploidías. En mujeres de 40 años el porcentaje de nacidos vivos es de 14%, a los 42 de 7% y a más de 44 años baja hasta un 1%.³

En México aun no contamos con un registro para la obtención de éstos datos. Por todo lo anterior las alteraciones cromosómicas son importantes a tomar en cuenta para evaluar las estrategias de valoración de embriones y su competencia reproductiva.

Causas de aneuploidías

Las aneuploidías pueden ser el resultado de la no disyunción en la división premeiótica de las células germinales masculinas o femeninas, en una primera o segunda división meiótica en cualquiera de los padres, o por la no disyunción postcigótica durante la embriogénesis.

El fin de la meiosis es generar gametos haploides a través de un proceso de división celular que consiste en una ronda de replicación de ADN seguido de dos divisiones celulares. En la primera división, o meiosis I (MI) el ADN de las células masculina y femenina se replica, de manera que cada uno de los 46 cromosomas se duplica en cromátidas hermanas. Sin embargo a diferencia de lo que pasa en la mitosis, los cromosomas homólogos se alinean en parejas, provocando la llamada sinapsis. Este emparejamiento se realiza de manera exacta excepto por los cromosomas sexuales. La recombinación genética consiste en el intercambio de segmentos de cromátidas entre los cromosomas homólogos emparejados. Se rompen segmentos de cromátidas que se intercambian cuando los cromosomas homólogos se separan. Durante el proceso de separación, los puntos de intercambio quedan temporalmente unidos y forman una estructura parecida a una X llamada quiasma. Los pares homólogos se separan en dos células hijas, lo que reduce el número de cromosomas que pasa de diploide a haploide. La meiosis II (MII) consiste en la separación de cromátidas hermanas, análogo a una división mitótica para obtener en cada gameto 23 cromosomas. El resultado de este proceso es un aumento de la variabilidad genética por la recombinación que redistribuye el material genético y a la distribución aleatoria de los cromosomas homólogos entre las células hijas.^{4, 5}

La meiosis en los gametos difiere entre mujeres y hombres. En las mujeres, el proceso meiótico se encuentra extraordinariamente protegido, iniciando la meiosis durante la vida fetal, pero cuando los cromosomas homólogos pasan por el proceso de sinapsis e inician recombinación, el oocito entra a un periodo de arresto meiótico. La reanudación de la

meiosis y la conclusión de la primera división ocurre años después en el ovario de la mujer adulta, justo antes de que el oocito sea ovulado. Al terminar MI, el oocito realiza una pausa en metafase de la MII y la segunda división termina sólo si éste es fertilizado. Obteniendo un oocito y de dos a tres cuerpos polares por cada célula que entra en meiosis. En contraste, en los hombres, la meiosis inicia en la pubertad y los eventos importantes son secuenciales: en el testículo adulto las células progresan de profase a metafase I y a metafase II sin pausa, entonces cada célula que entra a meiosis produce cuatro espermias.⁶

La no disyunción se refiere a cualquier proceso que causa que dos cromosomas homólogos vayan al mismo polo en vez de dirigirse a polos opuestos. Cuando cromosomas homólogos fallan al formar pares o al crear el quiasma, se separan y aparecen como univalentes en diploteno. Éstos pueden dirigirse de manera aleatoria a cualquiera de los polos en la primera división y dividirse regularmente en la segunda. De manera alternativa, pueden dividirse mitóticamente en la anafase I y en la anafase II dirigirse a polos contrarios o fallar en el camino hacia alguno de los polos, rara vez, uno de ellos puede dividirse por el centrómero, como lo harían los univalentes en la primera división meiótica.⁷

Edad y alteraciones genéticas

Existen diversas teorías basadas en múltiples estudios poblacionales justificando la aparición de aneuploidías en el embarazo como la edad materna, el patrón de recombinación cromosómica, factores socioeconómicos relacionados con el estilo de vida, estado de salud, entre otros; que de diferente manera afectan la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario.^{8, 9}

La edad paterna tiene un efecto muy pequeño en la incidencia de la no disyunción. Se conoce muy poco del mecanismo en la meiosis I del hombre y su contribución a la producción de espermatozoides aneuploides en edades avanzadas, ya que con las nuevas técnicas de reproducción asistida y los nuevos medicamentos para tratar disfunción eréctil hombres mayores han tenido la posibilidad de ser padres. Los estudios hasta ahora realizados para determinar el efecto potencial de la edad en la frecuencia de espermatozoides disómicos no han podido demostrar dicha relación. Son necesarios estudios a futuro en hombres seleccionados basados en su edad incluyendo hombres de 60 y 70 años, para poder determinar si es que la edad paterna aumenta realmente la frecuencia de espermatozoides alterados y si presenta un riesgo real para la descendencia.^{10, 11}

La edad materna es determinante y nos da un pronóstico de la calidad embrionaria esperada en ciclos de fertilización in vitro. En mujeres con edad materna avanzada los ovocitos son más susceptibles a errores meióticos y resultan en embriones aneuploides. El incremento exponencial de la frecuencia de no disyunción por aumento en la edad materna se correlaciona con una disminución en la frecuencia de recombinación genética, por ejemplo, para los cromosomas 21, 18,16 y 15.¹²,

La incidencia de las alteraciones cromosómicas aumenta con la edad materna, es así que mujeres por arriba de los 40 años cuentan con un 35% al 85% de probabilidades para aneuploidías, por debajo de los 30 un 10% al 30 %, mientras que una mujer a los 20 años sólo cuenta con porcentajes entre 2-3%.¹³ Lo anterior visto desde hace mas de 70 años cuando se relacionaba la presencia de síndrome de Down con edad materna avanzada, para lo que se describió una curva en forma de J, la cual mostraba que existe un aumento en las tasas de aneuploidía en embarazos de mujeres menores de 20 años (ya se contaba con un número mayor de embarazos), luego una leve caída antes del establecimiento de un aumento lineal a los 20-30 años, seguido de un cambio exponencial alrededor de los 30-35 años.¹⁴

La baja respuesta ovárica es otro dato temprano de envejecimiento ovárico y reducción de reserva ovárica. La estimulación ovárica puede verse como una prueba dinámica para valorar el grupo folicular en reposo; ya que el tamaño de la cohorte de folículos reclutables puede ser un reflejo de la cantidad de ellos.¹⁵ Aunado a la disminución de folículos disponibles, la respuesta ovárica a FSH disminuye con el aumento de edad provocando también disminución en el número recuperado.¹⁶ Así mismo se ha propuesto que la poca cantidad de oocitos recuperados posterior a la estimulación ovárica (3 o menos), está asociado con tasas más altas de aneuploidía. Ya que un número bajo de folículos antrales provoca la selección de oocitos subóptimos que son propensos a la no disyunción durante la meiosis. Aplicando el criterio anterior no sólo a pacientes añosas, si no también a pacientes con baja respuesta a la estimulación independientemente de la edad.¹⁷ Sin embargo es una hipótesis no comprobada en estudios claros o con resultados que carecen de significancia.^{18, 19}

Origen parental de las aneuploidías

En estudios realizados en individuos con cromosomas sexuales extras, y por técnicas basadas en marcadores genéticos, se encontró que el cromosoma adicional era de origen materno en un 90% para mujeres XXX y en un 54% para hombres XXY. En aquellas de

origen materno, el error se presentó en MI en casi dos tercios de los caso, en MII en cerca de un cuarto y sólo un décimo para el error mitótico postcigótico. Los erros MI maternos fueron asociados con la ausencia del quiasma en un 30%, quiasmas mal distribuidos en un 24% y quiasma normal en un 45%. De origen paterno la monosomía X en un 70-80%, 10% para 47XXX, 50% en 47XXY y 100% para 47XYY).^{20, 21}

Los cromosomas extras en las trisomías 13,14, 15 y 22 fueron de origen materno en un 88% y paterno en un 12%. Siendo lo anterior en dos tercios del total por error de la MI y en un tercio por errores en MII. Para el cromosoma 21, el 40% fue por error en la MII materna.^{22, 23} En algunos casos descritos como errores en la MII, éste era realmente una falla en la segregación de homólogos en la MI, ya que la edad materna no afecta la duración de la MII pero si para la MI (la cual tarda de 10-40 años aproximadamente).²⁵

EXAMEN GENÉTICO PREIMPLANTATORIO

El determinar qué embriones son los mejores para una transferencia ha sido tema de debate desde 1970. Tradicionalmente el uso de la morfología (apariencia embrionaria), había sido la principal modalidad para elegir embriones óptimos para ser colocados de manera intrauterina, sin embargo dicho sistema no ha podido aumentar la tasa de implantación y embarazo a término.²⁴ Es por ello que en la búsqueda de otros métodos diagnósticos capaces de identificar de manera precisa a los mejores embriones se han encontrado diferentes tecnologías, desde metabolómica, proteómica, video en tiempo real y el cribado genético preimplantatorio (prenatal genetic screening [PGS]), ahora llamado examen genético preimplantatorio para aneuploidías (preimplantation genetic testing for aneuploidies [PGT-A]).

PGT-A se basa en obtener una biopsia de células de embriones en desarrollo y el realizar análisis de su composición genética, en especial la evaluación para aneuploidías en embriones con padres cromosómicamente normales para así realizar una transferencia embrionaria dentro del ciclo de fertilización in vitro. En datos obtenidos de cribados preimplantatorios se ha demostrado que más de la mitad de los embriones producidos por fertilización in vitro son aneuploides.²⁵

Ha evolucionado desde su uso con biopsias de cuerpos polares, embriones en día 3 hasta ahora que se realiza en blastocistos. La biopsia en embriones en estado de clivaje (usualmente de 6-8 células con bajo porcentaje de fragmentación [<20%]) consiste en remover una sola blastómera pudiendo realizar la transferencia dos días después en el día 5 del desarrollo si se cuenta con el resultado. Sin embargo los anteriores se estudiaban

para un número limitado de cromosomas (5-14) por hibridización fluorescente in situ (FISH) pero los resultados no fueron los esperados, ya que muchos ensayos randomizados y controlados fallaban en demostrar un beneficio²⁶, incluso algunos solo presentando daños y disminuyendo la viabilidad embrionaria.²⁷ La biopsia realizada sólo al cuerpo polar, para no alterar al embrión, era incapaz de detectar errores derivados del lado paterno, o algunos presentados después o durante la fertilización. También el estudio de 5 a 14 cromosomas en vez de los 23 pares presentaba limitación para evaluar al embrión de manera adecuada. Es por ello que el FISH era incapaz de diagnosticar muchas de las anomalías cromosómicas encontradas comúnmente en embriones en desarrollo.^{28, 29} Los resultados de 11 estudios controlados randomizados de 2004 a 2010 arrojaron resultados controversiales. La mayoría de ellos demostraron que el cribado con FISH no aumentó las tasas de nacimiento y en algunos casos se asociaron con tasas de nacimiento disminuidas.³⁰

Se sabe que los embriones en día 3 del desarrollo presentan niveles altos de mosaicismo, el cual es una condición en la cual la composición de un solo embrión presenta más de una línea genética (pueden tener líneas celulares tanto euploides como aneuploides).^{31, 32} Existen estudios que han evaluado este fenómeno y concluyen que la mayoría de los embriones en día 3 del desarrollo pueden presentar estas características.³³ Por lo tanto una biopsia en un embrión en día 3 puede tener un resultado que no es representativo del embrión en su totalidad. Después se descubrió que estos embriones pueden corregir esta alteración genética y desarrollarse hasta día 5 como euploides.^{34, 35, 36} Ahora se realiza la biopsia a blastocistos en día 5 o 6 del desarrollo. Las tasas de embarazo clínico con la aplicación de este enfoque ha sido superior, reportado en diversos estudios.³⁷

Existen diversas técnicas para realizar la evaluación de los 23 pares de cromosomas, como la hibridización genómica comparativa, reacción de cadena polimerasa cuantitativa. Sin embargo estas técnicas presentan niveles variables de fallo en la amplificación durante la lisis de célula única. Otro inconveniente de estos métodos es la inhabilidad de diferenciar entre tipos de ploidías que contienen cuentas cromosómicas similares (euploidía y disomía uniparental) o para determinar el origen parental de los cromosomas.³⁸ Para ello se utilizó posteriormente el análisis de polimorfismo de nucleótido único por microarreglos, para determinar cuáles haplotipos de qué progenitor eran heredados en cada embrión. Esto permite inferir de manera correcta el genotipo y así incrementar significativamente el poder determinar la ploidía de la blastómera. Esta tecnología permite determinar no sólo la cuenta cromosómica en una célula si no también el origen parental de cada cromosoma, así como inserciones, deleciones y traslocaciones. Este

método puede detectar cuando ambos haplotipos de un solo progenitor están presentes en un segmento de cromosoma, lo cual es indicativo de un error meiótico.³⁹

Ahora para el análisis cromosómico se utiliza la secuenciación de última generación. Ésta tecnología de secuenciación masiva de ADN, denominada secuenciación de nueva generación (next generation sequencing [NGS]), ha revolucionado la investigación genómica ya que con ella en un solo día se puede secuenciar el genoma humano completo.

El uso de estas tecnologías tiene como propósito mejorar no sólo los resultados clínicos si no también reducir el tiempo para lograr el embarazo, y lo más importante aumentar las tasas de obtención de un bebé sano. Se han publicado estudios controlados y randomizados con pacientes de buen pronóstico. Uno de ellos muestra un aumento en la tasa de implantación de 27% a 66% comparado con controles, así como una reducción en la tasa de abortos, aunque sin poder obtener confianza estadística. Sólo un estudio fue realizado con pacientes de edad avanzada utilizando análisis de los 24 cromosomas en la unión europea.^{40, 41, 42}

Existen diferentes plataformas de NGS, las cuales realizan la secuenciación de millones de pequeños fragmentos de ADN en paralelo. Cada una de las tres billones de bases en el genoma humano son secuenciadas múltiples veces, ayudando a profundizar la información para obtener información puntual y una visión de la variación del ADN, a un costo relativamente menor.

Puede ser usada para secuenciar genomas enteros o solo áreas específicas de interés incluyendo todos los 22 mil genes codificantes o números pequeños de genes individuales. La detección de variantes genéticas a partir de datos de NGS consiste en identificar diferencias en la secuencia de ADN de un individuo al compararlo con un ADN de referencia. La NGS tiene el potencial de detectar cualquier tipo de variante genómica en un único experimento, incluso puede detectar inversiones, una clase de variación cuyo estudio resulta muy complicado para la mayoría de las otras técnicas.^{43, 44} Por su mayor rango dinámico tiene la capacidad de detectar mosaicismos en niveles bajos mejor que tecnologías anteriores, alteraciones mitocondriales en el ADN y alteraciones genéticas⁴⁵. El potencial que tiene para secuenciar minimiza errores, reduce tiempos, y permite mayor rendimiento y consistencia.⁴⁶ Es así que su utilización para estudios genéticos preimplantatorios se vuelve más accesible para un mayor porcentaje de pacientes.

En cuanto a sus limitaciones, el NGS aun no puede detectar arreglos cromosómicos balanceados, si es que no hay un desequilibrio en el contenido total del ADN. A pesar de que el NGS tiene el potencial para detectar haploidias y algunas poliploidías utilizando proporciones alélicas, la cobertura de secuencias y la profundidad de lectura de este protocolo es insuficiente para poder realizar detección de alelos. Para obtener beneficios en cuanto al costo es necesario realizar el proceso en un buen numero de muestras.⁴⁷

Muchas son las aplicaciones del NGS: en microbiología para una identificación genómica de patógenos, los genomas de diferentes tipos de cáncer ya pueden ser estudiados sistemáticamente en su totalidad para realizar diagnósticos precisos, clasificación de la enfermedad, pronósticos más certeros, y el manejo personalizado.⁴⁸

SISTEMA DE GRADACIÓN MORFOLÓGICA DEL BLASTOCISTO

Con el avance tecnológico se logró mejorar los medios de cultivo para lograr que un embrión se desarrolle hasta la etapa de blastocisto sin presentar alteraciones y con mayor capacidad de implantación aumentando las tasas de éxito en procedimientos de fertilización in vitro.⁴⁹ Éste tipo de embriones utilizados hoy en día para la realización del estudio genético preimplantatorio.

La evaluación de las características físicas de un embrión en crecimiento, se ha tomado en cuenta desde hace casi 30 años en el afán de seleccionar al mejor que tenga mayor probabilidad de lograr un embarazo. En 1999 Gardner y Shoolcraft introdujeron un sistema de gradación que fue rápidamente adoptado por la mayoría de laboratorios de fertilización in vitro⁵⁰. A pesar de que este sistema no cubre todos los aspectos de la morfología del blastocisto, especialmente la aberrante, ha sido muy útil para clasificar el grado de expansión así como la apariencia morfológica de la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TE).

El análisis de la expansión tiene un mérito fisiológico dado por que la formación del blastocele requiere de la formación de un epitelio competente con un requerimiento de energía considerable. Entonces, el embrión debe poseer cierto grado de competencia metabólica para crear el gradiente iónico requerido para permitir que se acumule líquido dentro de la mórula e incorporarse a ella para formar el blastocele. El gradiente iónico requerido para permitir que se transporte fluido es facilitado por la acción de sodio potasio (Na/K) ATPasas situadas en la membrana basolateral de las células del trofoectodermo, y requiere de un gran porcentaje de energía para crear y mantener la cavidad del blastocele.⁵¹ Tomando en cuenta que el blastocisto durante su desarrollo

colapsa y se re-expande de manera natural, acción que repercute en la morfología y grosor de la zona pelúcida la cual debe ser valorada para detectar cambios en el blastocisto.

El sistema alfanumérico creado por Gardner y Schoolcraft valora el:

Grado de expansión con números:

- 1 (blastocisto temprano).- el blastocele es menos de la mitad del volumen del embrión.
- 2 (blastocisto).- blastocele igual o mayor que la mitad del volumen del embrión.
- 3 (blastocisto completo).- blastocele llenando completamente el embrión.
- 4 (blastocisto expandido).- el volumen del blastocele es mayor que del blastocisto completo caracterizado por adelgazamiento de la zona pelúcida.
- 5 (blastocisto en eclosión).- el TE empieza a herniarse a través de la zona pelúcida
- 6 (blastocisto eclosionado).- el blastocisto ha escapado completamente de la zona pelúcida.

Los blastocistos clasificados por arriba del grado 3 de expansión son valorados ahora por MCI y TE ya que sus células son claramente visibles.

Masa celular interna por tres grados:

- A.- MCI compacta con muchas células.
- B.- MCI agrupada holgadamente con varias células.
- C.- MCI desorganizada con muy pocas células.

Calidad trofoectodermo definido por tres grados:

- A.- TE definido con muchas células formando un epitelio cohesivo.
- B.- pocas células formando un epitelio suelto.
- C.- muy pocas células.

La razón por la que se clasificó MCI y SE TE basa en el grado de mitosis semi-cuantitativo ocurrido en cada tipo de célula. En modelos animales el número total de células y el desarrollo de la MCI están relacionados con desarrollo fetal.⁵² En estudios en humanos se ha visto que utilizando este sistema existe una correlación entre el resultado clínico (implantación, embarazo) y el grado morfológico de los blastocistos.^{53, 54, 55}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aneuploidias son las anormalidades genéticas más comunes en embriones humanos obtenidos a través de fertilización in vitro; por lo que su identificación permite seleccionar embriones con los que podamos conseguir un embarazo a término y un recién nacido libre de enfermedades cromosómicas.

El PGS es un método de identificación de alteraciones cromosómicas. Éste se realiza para reducir el riesgo de aborto y el trauma psicológico y físico agregado, así como para reducir el tiempo necesario para obtener un embarazo hasta la mitad del promedio.⁵⁶

La edad materna avanzada es la indicación más común para realizar un examen genético preimplantatorio, ya que es el factor causal predominante para aneuploidías e incrementa de 20% a 60% en mujeres entre 35 a 43 años.⁵⁷ La mayoría de grupos han considerado de manera tradicional a la edad materna avanzada a cualquier paciente mayor de 37 años, sin embargo recientemente se ha movido el punto de corte a 35 años.

JUSTIFICACIÓN

El realizar análisis de los embriones obtenidos y seleccionarlos para una transferencia en pacientes que por edad ya tienen mal pronóstico, sirve para aumentar las probabilidades de un embarazo. El conocer cuáles son las alteraciones más frecuentes determina el riesgo que presenta la dotación cromosómica con el paso del tiempo para presentar desde un hijo enfermo, hasta abortos, fallas de implantación o pérdidas gestacionales recurrentes.

METODOLOGÍA

Pregunta de investigación

¿Cuáles es la correlación entre blastocistos aneuploides y sus características morfológicas analizados por PGT-A/NGS en mujeres con edad materna avanzada?

Tipo de estudio

Observacional, retrospectivo, comparativo, transversal.

Objetivo general

Determinar la correlación entre blastocistos aneuploides y sus características morfológicas analizados por PGT-A/NGS en mujeres con edad materna avanzada.

Objetivos específicos

Conocer el tipo de infertilidad de acuerdo a grupos de edad materna avanzada.

Conocer las características antropométricas de las pacientes en estudio.

Determinar valores hormonales basales por grupo de pacientes.

Conocer las alteraciones cromosómicas más frecuentes en edad materna avanzada detectadas por PGT-A/NGS.

Comparar las características morfológicas de los embriones aneuploides y los euploides.

Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 35 años a las que se les realizó ciclo de fertilización in vitro.

Pacientes que aceptaron realizar el examen genético preimplantatorio firmando consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Alteraciones uterinas o en la cavidad endometrial.

Factor masculino alterado.

Falla recurrente de la implantación.

Patologías endocrinológicas o sistémicas.

Criterios de eliminación

Pacientes menores de 35 años.

Pacientes con embriones que no llegaron a etapa de blastocisto.

Población de estudio

Pacientes mujeres mayores de 35 años, que acudieron al Instituto de Ciencias en Reproducción Humana: Vida, en busca de tratamiento de reproducción asistida.

Ámbito geográfico donde se desarrollará la investigación

Instituto de Ciencias en Reproducción Humana: Vida Guadalajara. Zapopan, Jalisco. México.

Metodología de la investigación

1. Después de la evaluación primaria de la pareja infértil y al presentar los criterios de inclusión las pacientes iniciaron estimulación ovárica controlada. Protocolo de acuerdo a la evaluación hormonal realizada por médico tratante.
2. Al contar con folículos de 18 mm de diámetro y endometrio mayor a 8 mm de espesor, se realiza la administración de HCG o agonista de GnRH para efectuar captura folicular 36 horas después.
3. La captura folicular se realiza con una punción vaginal dirigida con ultrasonografía en quirófano, adyacente al laboratorio para la recolección del líquido folicular, búsqueda de los complejos cúmulo-corona-ooocito (CCCO) y clasificación de su madurez.
4. Preparación del semen se realizan técnicas como el nado hacia arriba y gradientes de densidad, de acuerdo al criterio del biólogo.
5. Se realiza fertilización a base de inyección intracitoplasmática (ICSI) de los ovocitos en Metafase II no más de dos horas posterior a la denudación, y se colocan en medio de cultivo para iniciar crecimiento y vigilancia.
6. Se realiza evaluación de la fertilización 17-20 horas posterior al ICSI. Posteriormente se realiza evaluación del desarrollo embrionario desde la primera división 24-42 horas post inyección, sus características e identificación de alteraciones o arrestos en las siguientes horas. Evaluación en día 3 y valoración de los embriones que llegan a la etapa de blastocisto en día 5 o 6.

7. A los embriones que llegan a la etapa de blastocisto se les realiza biopsia de trofoectodermo al quinto o sexto día de desarrollo embrionario y se envía para su estudio a Igenomix[®]. Posterior a la biopsia se realiza proceso de vitrificación con identificación de cada embrión.
8. Se reciben resultados de 7 a 10 días aproximadamente, se registran en base de datos para realizar análisis estadístico al concluir con el tiempo de recolección de datos.
9. Para la valoración de características morfológicas, se utilizó el sistema de clasificación de Gardner y Schoolcraft (1999), categorizando a los blastocistos en 4 grupos de acuerdo a lo estudiado por Capalbo et al. 2014 e Irani et al. 2017: 1. Excelente ($\geq 3AA$), 2. Adecuados (3,4,5,6 AB y BA), 3. Promedio (3, 4, 5,6 BB, AC y CA), 4. Pobres ($\leq 3BB$).

Especificación de las variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
Edad	Tiempo vivido de una persona o ser vivo desde su nacimiento.	Tiempo de vida representado en años.	Cuantitativa continua.	Años
Índice de masa corporal	Relación entre el peso y la altura de una persona para determinar su estado nutricional	Se conoce mediante el cálculo del peso entre la talla al cuadrado.	Cuantitativa continua.	Kg/m ²
Embrión aneuploide	Óvulo fertilizado con mutaciones cromosómicas numéricas que altera el orden y cantidad de cromosomas.	Cromosomas de más o de menos presentes en el ADN de un embrión.	Cualitativa nominal dicotómica.	Si/No
Embrión euploide	Óvulo fertilizado con dotación de cromosomas adecuado.	Número completo de cromosomas en un embrión.	Cualitativa nominal dicotómica.	Si/No

Análisis estadístico de la información

Se realizará análisis comparativo por grupos de edad y variables con chi cuadrada. Comparación de blastocistos por morfología realizada por Kruskal-Wallis.

ASPECTOS ÉTICOS

Los embriones utilizados para realización de biopsias derivan de células humanas (padre y madre), utilizadas únicamente con propósito de investigación para la realización de transferencias embrionarias asegurando la colocación de embriones euploides. Posterior a la obtención del consentimiento informado de las pacientes que aceptaron el procedimiento, y con previa autorización del Comité de Ética del Instituto de Ciencias de la Reproducción Vida Guadalajara.

Se garantizó la confidencialidad de las pacientes y pareja ya que no se pusieron en evidencia nombres o datos personas que comprometan a los pacientes. Se tomó en cuenta de acuerdo a la base de datos para asignar un número a cada caso a evaluar.

Este estudio se apega a las normas éticas nacionales e internacionales para la investigación en salud basándose en las enmiendas de la Declaración de Helsinki, Asamblea General 64 Octubre 2013 Brasil, Código de Nuremberg, las Guías para la buena Práctica Clínica.

Basándose en el Reglamento de la Ley General de salud en Materia de Investigación para la Salud es un tipo de estudio Categoría I Investigación sin riesgo: estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

Este estudio no se realizó con población vulnerable, embarazadas ni en grupos subordinados.

Cronograma del proyecto

ACTIVIDAD	MES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL Y ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO	X								
PRESENTACIÓN DEL PROTOCOLO	X	X	X						
RECOLECCIÓN DE DATOS				X	X	X	X		
ANÁLISIS DE DATOS								X	
OBTENCIÓN DE RESULTADOS								X	
ESCRITURA Y PUBLICACIÓN DEL INFORME FINAL								X	
DIFUSIÓN									X

Difusión de resultados

Los resultados se difundirán en forma de tesis publicada para obtener el diploma en Biología de la Reproducción Humana, según la normatividad de la Universidad Autónoma de México.

RESULTADOS

Durante el periodo comprendido entre agosto de 2016 a junio de 2018, se encontraron 43 PGT-A que cumplieron con los criterios de inclusión. Para un análisis más detallado se dividió a las mujeres de edad avanzada en dos grupos: de 35 a 39 años (47%) y el segundo mujeres igual o mayor a 40 años (53%).

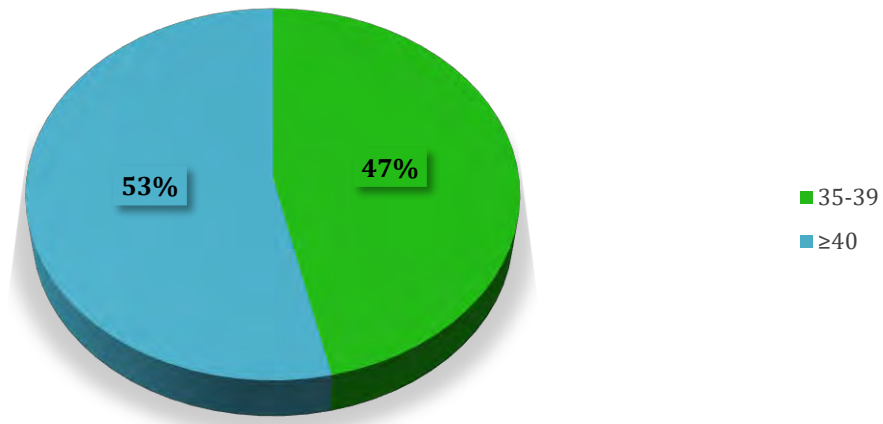


Gráfico 1. Grupos de edad en edad materna avanzada sometidas a FIV/ICSI (PGT-A).

Tipo de infertilidad

Del grupo de pacientes estudiadas el 58.1% cuenta con infertilidad primaria y el 41.9% con infertilidad secundaria. Divididas por grupos de edad se observa una mayor tendencia para infertilidad primaria para el grupo de 35 a 39 años y para infertilidad secundaria en el grupo de ≥40 años.

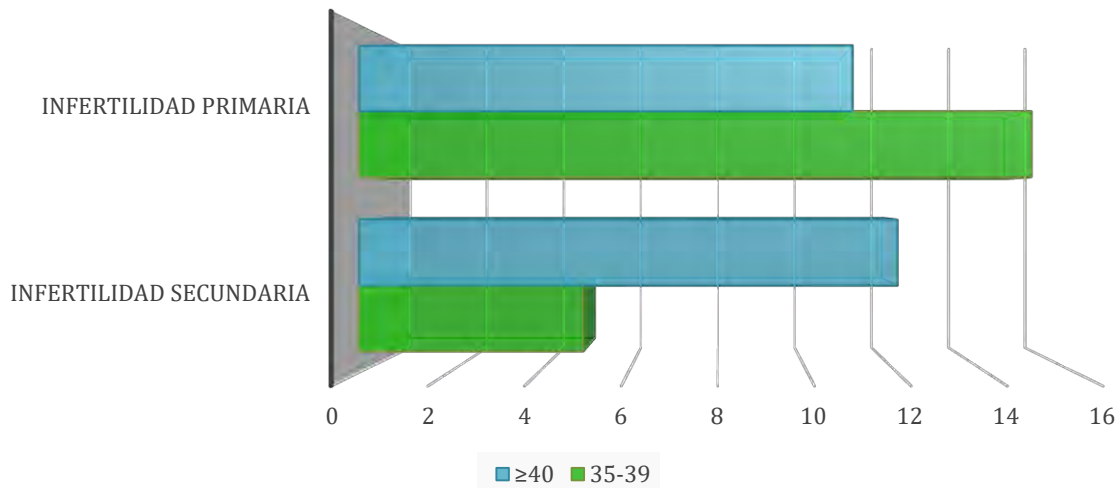


Gráfico 2. Tipos de infertilidad en grupos de edad materna avanzada.

Características sociodemográficas y antropométricas

Se realizó un análisis estadístico dividiendo a la población estudiada de acuerdo a la obtención de blastocistos euploides o aneuploides, utilizando chi cuadrada.

En el análisis comparativo para edad entre la obtención de blastocistos euploides y aneuploides se halló significancia estadística, no así para índice de masa corporal (IMC), gestas o el antecedente de nacidos vivos.

	BLASTOCISTOS EUPLOIDES	BLASTOCISTOS ANEUPLOIDES	Valor P
EDAD	39.46±0.78	40.26±0.57	<0.0001
IMC	25.51±0.79	25.33±0.59	0.08
Gestas	1.11±0.27	1.25±0.13	0.16
Nacidos vivos	0.96±0.3	0.88±0.23	0.22

Tabla 1. Características sociodemográficas y antropométricas en edad materna avanzada.

Determinación hormonal

De acuerdo a la división de la población estudiada en grupos de edad se realizó una valoración del estado hormonal anterior a la estimulación ovárica controlada de acuerdo al perfil ovárico, tomando en cuenta a la hormona folículo estimulante (FSH), estradiol, hormona luteinizante (LH), y hormona antimülleriana (AMH). De acuerdo al análisis no se encontró significancia estadística para ninguno de los grupos o tipo de hormona. Encontrando valores similares entre los dos grupos de población. Para la AMH una disminución en aproximadamente 0.5 ng/ml posterior a los 40 años reflejo del comportamiento de la reserva ovárica a esta edad.

35-39 años			
	BLASTOCISTOS EUPLOIDES	BLASTOCISTO ANEUPLOIDES	Valor P
FSH basal mUI/L	6.42±0.42	6.63±0.42	0.26
Estradiol basal pg/ml	43.62±3.94	41.53±4.01	0.21
LH basal mUI/L	4.6±0.35	7.2±2.59	0.44
AMH ng/ml	1.74±0.19	1.76±0.19	0.15

Tabla 2.1. Determinación hormonal basal en edad materna avanzada (35-39 años).

	≥40 años		Valor P
	EUPLOIDES	ANEUPLOIDES	
FSH basal mUI/L	7.35±0.94	7.57±0.53	0.37
Estradiol basal pg/ml	45.07±5.75	48.17±4.15	0.43
LH basal mUI/L	4.03±0.42	4.55±0.30	0.24
AMH ng/ml	1.4±0.39	1.22±0.19	0.029

Tabla 2.2. Determinación hormonal basal en edad materna avanzada (≥40 años).

Recuperación ovocitaria y desarrollo embrionario

El total de ovocitos recuperados posterior a la estimulación ovárica fue de 488, con un promedio por paciente de 11.3 (12.85 para el grupo de 35-39 años y de 10.04 para el grupo ≥40 años). De los cuales sólo el 80.9% fueron metafase II (MII), adecuados para realizar la inyección intracitoplasmática espermática (ICSI). El 82.02% de los óvulos inyectados fertilizaron y de ellos el 67.2% llegó a la etapa de blastocisto. Realizando la biopsia de trofoectodermo al 100% de los anteriores.

Sólo se observó una mayor cantidad de óvulos recuperados en el grupo de 35-39 años, así como de ovocitos MII (257 vs 231 y 215 vs 190 respectivamente), con significancia estadística. El resto de parámetros sin diferencia significativa entre ambos grupos.

	35-39 años	≥40 años	Valor P
Ovocitos recuperados	257	231	<0,0001
Ovocitos MII	199	196	0.0079
Fertilizados	162	162	0.0277
Blastocistos	108	107	0.1804
Blastocistos biopsiados	108	107	0.1804

Tabla 3. Recuperación ovocitaria y desarrollo embrionario por grupo de edad.

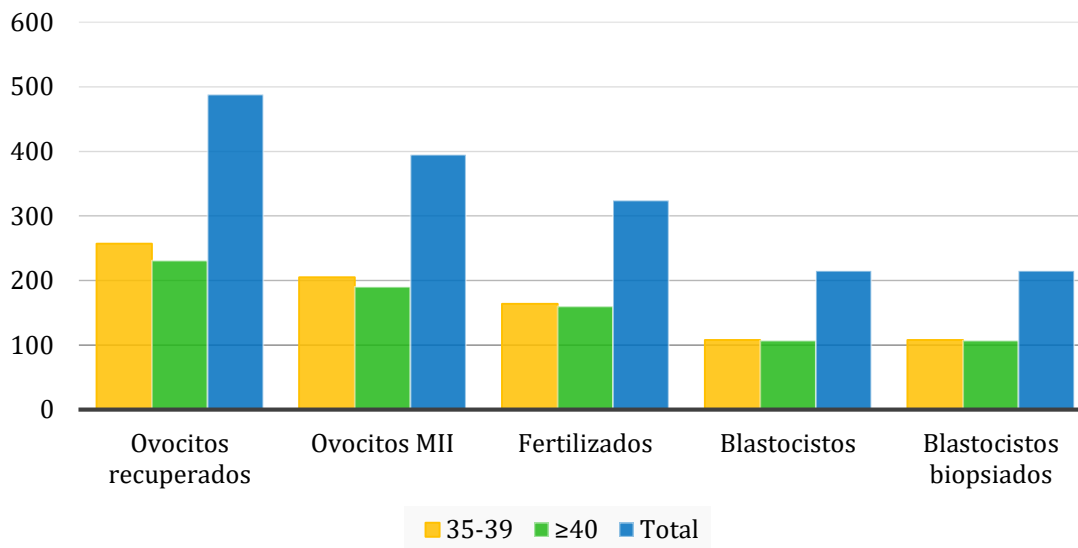


Gráfico 3. Recuperación ovocitaria y desarrollo embrionario por grupos de pacientes en relación con el total.

PGT-A

De los 215 embriones analizados 77 de ellos resultaron euploides (35.8%), y 138 aneuploides (64.1%).

El 64.9% de los embriones euploides corresponden a mujeres entre 35 a 39 años, y el 35.1% restante son de mujeres igual o mayor a 40 años.

En cuanto a los embriones aneuploides el 42.7% de ellos corresponden a mujeres entre 35-39 años y el 57.3% a mujeres ≥40 años.

El 58.4% de los embriones euploides corresponden al sexo masculino, el 41.6% al femenino. Proporciones similares para embriones aneuploides con el 55% para el sexo masculino y el 45% para el femenino.

	35-39 años	≥40 años	Valor P
EMBRIONES EUPLOIDES	50	27	0.2034
EMBRIONES ANEUPLOIDES	59	79	0.4715

Tabla 4. Relación de embriones euploides y aneuploides por grupo de edad.

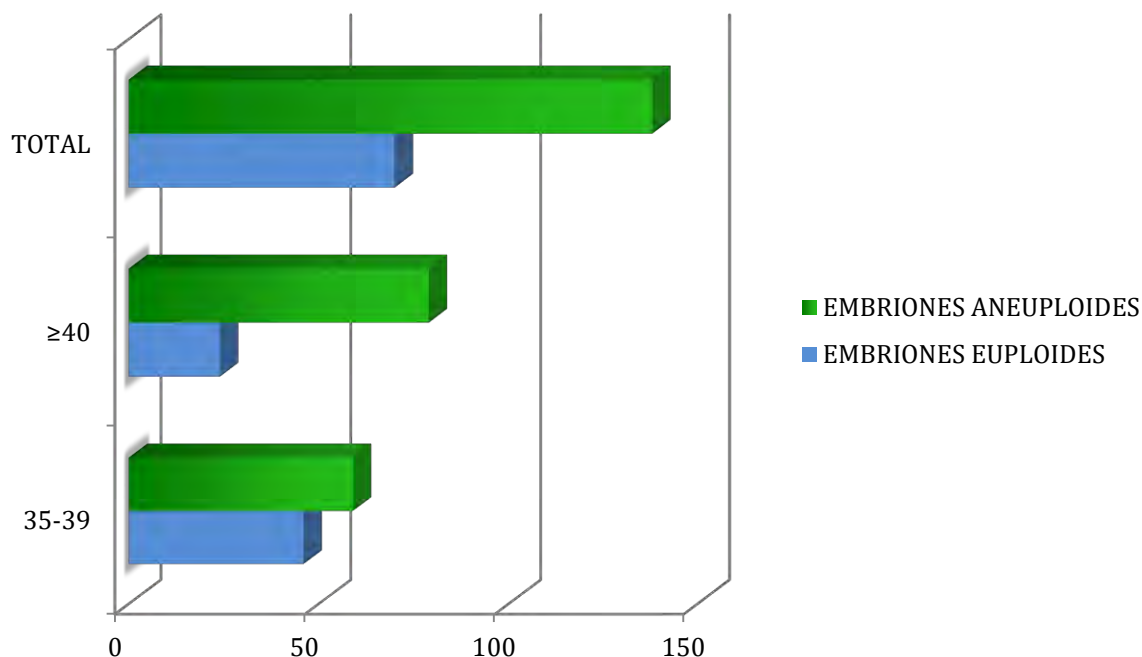


Gráfico 4. Relación de embriones euploides y aneuploides por grupo de edad y el total.

Las alteraciones cromosómicas más frecuentes reportadas en los PGT-A recolectados de los 138 embriones aneuploides fueron las trisomías en un 51.7%, seguido de las monosomías en un 39.8%. Pequeños porcentajes del total se encuentran repartidos entre las alteraciones debidas a falta o agregación de material genético en alguno de los brazos de los cromosomas, ya sea p o q, determinadas como deleciones o duplicaciones. Las duplicaciones para p en un 1.53%, para q en un 3.06%. Las deleciones para p en un 2.29% y para q en un 1.53%.

La trisomía más frecuente es la del cromosoma 21 en un 11.1%, seguida del cromosoma 15 en un 9.6% y el cromosoma 18 en un 8.14%. La monosomía más frecuente se encuentra en el cromosoma 22 en el 10.5%, en el cromosoma 16 con un 8.6% y con un porcentaje de 7.6% en los cromosomas 18 y 21.

Aneuploidías compatibles con la vida: encontradas en 15 embriones con trisomía 21, 8 embriones con trisomía 13, 11 embriones con trisomía 18, 2 embriones con monosomía X0, 2 embriones con trisomía XXY y 2 embriones con trisomía XYY.

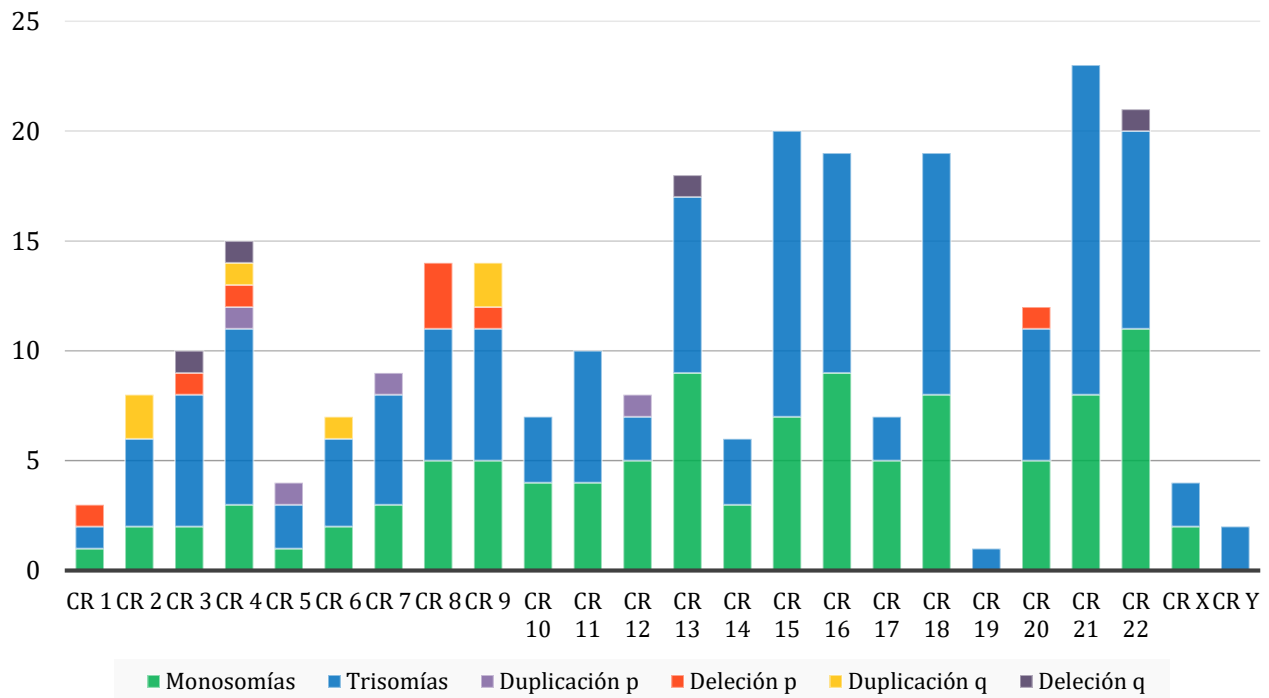


Gráfico 5. Distribución de aneuploidias en edad materna avanzada.

Morfología embrionaria

Se realizó el análisis comparativo entre los embriones aneuploides y euploides con la morfología embrionaria de los blastocistos biopsiados. Dentro del grupo de embriones euploides se encontró con morfología denominada como excelente al 11.6%, buena en 10.3%, promedio en un 35% y pobre en el 42.8%

Para el grupo de blastocistos aneuploides se encontraron dentro del grupo de morfología excelente al 19.5%, buena 5.07%, promedio 36.9 y pobre al 38.4%.

El análisis entre los 4 grupos por morfología se realizó utilizando la prueba de Kruskal Wallis, tanto para blastocistos euploides como aneuploides obteniendo para ambos grupos significancia estadística.

	Excelente	Bueno	Promedio	Pobre	Valor P
Euploides	9	8	27	33	<0,0001
Aneuploides	27	7	51	53	<0,0001

Tabla 5. Patrón morfológico por grupo entre embriones euploides y aneuploides.

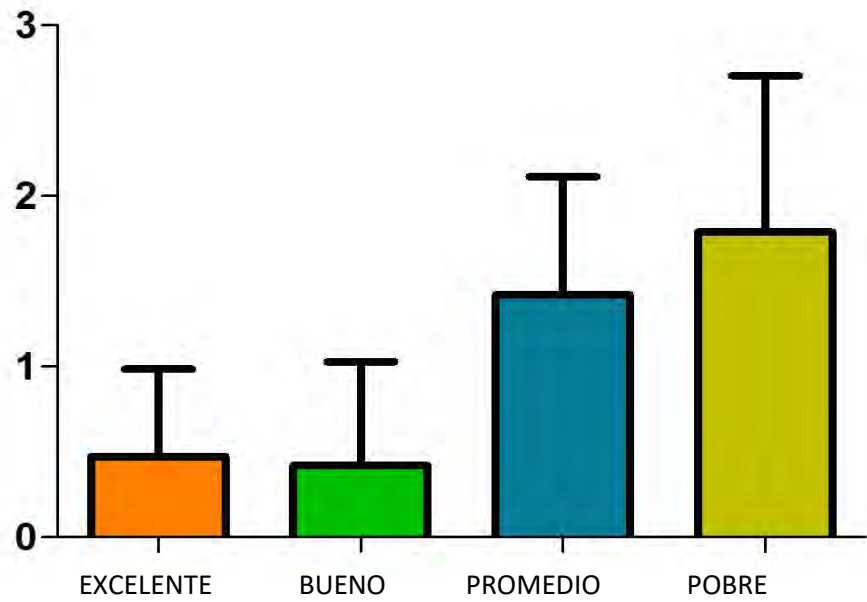


Gráfico 6.1. Patrón morfológico por grupo en embriones euploides.

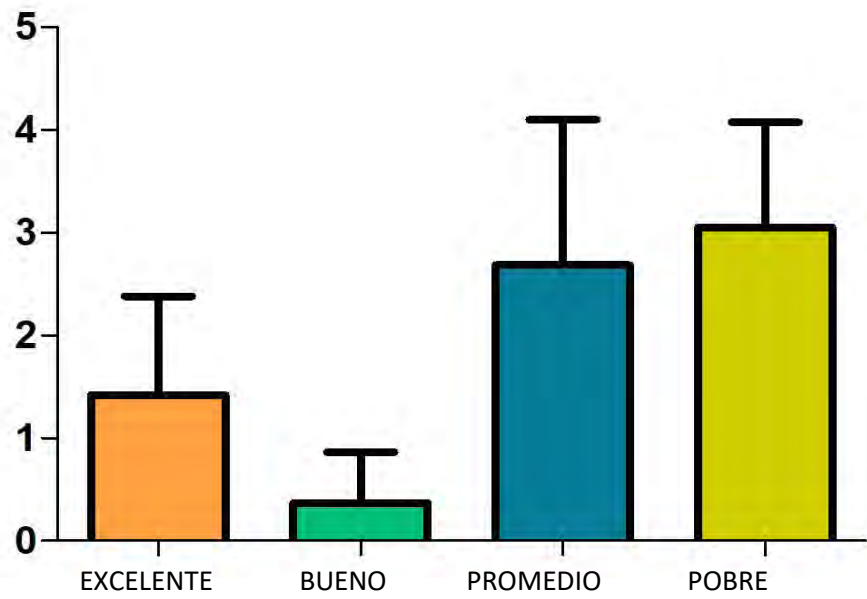


Gráfico 6.2. Patrón morfológico por grupo en embriones aneuploides.

DISCUSIÓN

La asociación de edad y fertilidad se sabe y está bien documentado ya por muchos años. Para la realización del análisis de resultados se dividió al grupo de edad materna avanzada en dos grupos: mujeres de 35 a 39 años y mujeres con 40 años o más. De acuerdo a la revisión de resultados se encontró que el grupo de más de 40 años representaba el mayor porcentaje con 53%. Visto en lo reportado para transferencias de embriones que para 1988-89 se reportaban en menos de 200 en mujeres mayores de 40 años comparada con los más de 17 000 ciclos realizados para 2012 en el mismo grupo de mujeres reportado por el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC).⁵⁸

Como un parámetro importante a conocer se valoró el tipo de infertilidad asociada a cada grupo de pacientes encontrando que en el grupo de 35 a 39 años predomina el tipo de infertilidad primaria, la cual está asociada al retraso de maternidad observado en la sociedad en los últimos años como lo comenta Sauer MV. En el grupo ≥ 40 años la infertilidad secundaria, sin embargo presente en un buen porcentaje para la primaria.⁵⁹

La valoración de la edad en base a la obtención de embriones euploides y aneuploides tuvo significancia estadística aunque la diferencia en años fue mínima para la media y error estándar. La media para el índice de masa corporal (IMC) en límites bajo para sobrepeso en ambos grupos, sin significancia estadística como registrado en el estudio de Goldman KN et al., al no encontrar relación entre el IMC y euploidía.⁶⁰

La determinación hormonal basal realizada se realizó para valorar la reserva ovárica como potencial de fertilidad y euploidía, dar una pauta para el régimen de estimulación, así como pronóstico para la recuperación ovocitaria, tomando en cuenta parámetros establecidos de normalidad a tomar en cuenta que los rangos varían de mujer a mujer a pesar de la edad. En el estudio los parámetros para los dos grupos de edad fueron similares, sin encontrar significancia estadística para embriones euploides y aneuploides a pesar del margen de años estudiados. A diferencia de lo reportado por Shahine LK et al., donde se encontró relación entre la disminución de la reserva ovárica y porcentaje de embriones aneuploides. Se confirma disminución en la función ovárica de acuerdo a la relación hormonal que describe la literatura inicia a partir de los 35 años.^{61, 62}

La cantidad de ovocitos recuperados para edad fue mayor a lo esperado, con un promedio mayor en el grupo de 35 a 39 años por ende también la proporción de ovocitos metafase II adecuados para realizar ICSI. La tasa de fertilización se encontró por arriba de lo reportado por Tournaye et al.⁶³, y recientemente por Johnson LN, et al.⁶⁴, así como la tasa

de formación de blastocisto estudiada en mujeres normorrespondedoras con peso adecuado de 57.2% vs 43.6% en pacientes con IMC >25 (Comstock JA et al.).⁶⁵

La disminución de la fertilidad relacionada con la edad va de la mano con el aumento significativo en las tasas de aneuploidía y aborto espontáneo, Balasch et al.⁶⁶, corroborado en el estudio observando la proporción de embriones aneuploides contra los euploides en el total y en la comparación por grupos de edad.

Concuerda con la literatura, donde se observa una tasa de aneuploidía en mujeres acercándose a los 40 años de 75% como lo refiere Fragouli E, et al.⁶⁷

El hallazgo más frecuente son las trisomías el cual está relacionado al menos en parte, a cambios y alteraciones en el huso meiótico, que predispone a la no disyunción.⁶⁸, ⁶⁹ Existe una alta prevalencia de aneuploidía en mujeres con edad materna avanzada aún en embriones morfológicamente normales seleccionados para transferencia en ciclos de fertilización in vitro.⁷⁰

CONCLUSIONES

El reconocer el efecto de la edad en la fertilidad es esencial para una mejor evaluación, consejo y tratamiento para las parejas que acuden a la consulta.

En pacientes de edad avanzada, las características morfológicas embrionarias no son suficientes para asegurar un de embrión sano.

La morfología del blastocisto independientemente de su capacidad para llegar a día 5 no tiene correlación con su contenido genético.

El promover el uso del PGT-A en éste grupo de pacientes, aumenta la eficacia y seguridad de las técnicas de reproducción asistida.

Es necesario complementar este estudio con los resultados reproductivos de las pacientes posterior a la transferencia de todas las incluidas en el análisis.

ANEXOS

Hoja de obtención de datos

EXAMEN GENÉTICO PREIMPLANTATORIO PARA ANEUPLOIDÍAS (PGT-A) EN EDAD
MATERNA AVANZADA: CORRELACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y SU EVALUACIÓN
MORFOLÓGICA

Nombre:

Edad:

Antecedentes obstétricos: Gestas ____ Partos ____ Cesáreas ____ Abortos ____

1. Peso _____ Talla _____ IMC _____

2. Perfil ovárico: FSH _____ LH _____ E2 _____ AMH _____

3. Ovocitos recuperados: _____ Fertilizados: _____ Blastocistos: _____
Blastos biopsiados: _____

4. Blastos euploides: _____ Sexo: _____

5. Blastos aneuploides: _____ Sexo: _____

6. Alteración cromosómica: _____

7. Morfología: _____

11. Observaciones

BIBLIOGRAFÍA

¹ Tao T, Robichaud A, Mercier J, Ouellette R. Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(1):63-68.

² Bolcun-Filas E, Handel MA. Meiosis: The Chromosomal Foundation of Reproduction. *Biol Reprod* 2018. In: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy021>.

³ Centers for Disease Control and Prevention. National summary report assisted reproductive technology (ART) report. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention;2015.

⁴ Yanowitz J. Meiosis: making a break for it. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22(6):744-751.

⁵ Sadler TW. Langman. Gametogénesis: transformación de las células germinales en gametos femeninos y masculinos. En: Sadler TW Ed. Langman. Embriología médica. 13ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2015;2:13-32.

⁶ Hunter N. Oocyte Quality Control: Causes, Mechanisms, and Consequences. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2018. pii: 035394. doi:10.1101/sqb.2017.82.035394.

⁷ Miller OJ, Therman E. Meiotic Abnormalities: Abnormal Numbers of Chromosomes. In: Miller OJ, Therman E, editors. *Human Chromosomes*. 4th ed. Springer, New York, NY. 2001; 11: 156-173.

⁸ Nagaoka SI, Hassold Tj, Hunt PA. Human aneuploidy: Mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 2012;13(7):493-504.

⁹ Kong A, Barnard J, Gudbjartsson DF, Thorleifsson G, Jonsdottir G, Sigurdardottir S, Richardsson B, Jonsdottir J, Thorgeirsson T, Frigge ML, Lamb NE, et al. Recombination rate and reproductive success in humans. *Nat Genet* 2004;36(11):1203-1206.

¹⁰ Buwe A, Guttenbach M, Schmid M. Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:213-218.

¹¹ Fonseka KG, Griffin DK. Is there a paternal age effect for aneuploidy? *Cytogenet Genome Res* 2011; 133:280-291.

¹² Hassold TJ, Pettay D, Freeman SB, Grantham M, Takaesu N. Molecular studies of non-disjunction in trisomy 16. *J Med Genet* 1991;28:149-162.

-
- ¹³ Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott Jr RT. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014;101(3):656-663.
- ¹⁴ Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2011;2(4):230-291.
- ¹⁵ Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 1998;30:137-142.
- ¹⁶ Ferraretti AP, Marca A, La Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L; ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26(7):1616-24.
- ¹⁷ Warburton D. The effect of maternal age on the frequency of trisomy: change in meiosis or in utero selection= *Prog Clin Biol Res* 1989;311:165-181.
- ¹⁸ Haadsma ML, Mooij TM, Groen H, Burger CW, Lambalk CB, Broekmans FJ, van Leeuwen FE, Bouman K, Hoek A; OMEGA Project Group. A reduced size of the ovarian follicle pool is associated with an increased risk of a trisomic pregnancy in IVF-treated women. *Hum Reprod* 2010;25(2):552-558.
- ¹⁹ Honorato T, Hoek A, Henningsen AK, Pinborg A, Lidegaard O, Mooij T, van Leeuwen F, Land J, Groen H, Haadsma M, OMEGA Project Group. Low oocyte yield during IVF treatment and the risk of a trisomic pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2017;36(6):685-692.
- ²⁰ Templado C, Uroz L, Estop A. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2013;19(10):634-643.
- ²¹ Uroz L, Templado C. Meiotic non-disjunction mechanisms in human fertile males. *Hum Reprod* 2012;27(5):1518-1524.
- ²² Takaesu N, Jacobs PA, Cockwell A, Blackston RD, Freeman S, Nuccio J, Kurnit DM, Uchida I, Freeman V, Hassold T. Nondisjunction of chromosome 21. *Am J Med Genet Suppl* 1990;7:175-181.
- ²³ Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. Human aneuploidy; incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996;28(3):167-175.

²⁴ Brezina PR, Brezina DS, Kearns WG. Preimplantation genetic testing. *BMJ* 2012;345:e5908.

²⁵ Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 2013;132:1001-1013.

²⁶ Mastenbroek S, Twisk M, Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9-17.

²⁷ Fritz MA. Perspectives on the efficacy and indications for preimplantation genetic screening: where are we now? *Hum Reprod* 2008;23(12):2617-21.

²⁸ Harper JC, Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet* 2012;131:175-186.

²⁹ Brezina PR, Tobler K, Benner AT, Du L, Xu X, Kearns WG. All 23 chromosomes have significant levels of aneuploidy in Recurrent Pregnancy Loss couples. *Fertil Steril* 2012;97(3):S7.

³⁰ Masternbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011;17:454-466.

³¹ Daphnis DD, Delhanty JDA, Jerkovic S, Geyer J, Craft I, Harper JC. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Hum Reprod* 2005;20:129-37.

³² Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005;11:33-41.

³³ Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17(5):620-627.

³⁴ Brezina PR, Sun Y, Anchan RM, Li G, Zhao Y, Kearns WG. Aneuploid embryos as determined by 23 single nucleotide polymorphism (SNP) microarray preimplantation genetic screening (PGS) possess the potential to genetically normalize during early development. *Fertil Steril* 2012;98(3):S108.

³⁵ Baart EB, Van Opstal D, Los FJ, Fauser BCJM, Martini E. Fluorescence in situ hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Hum Reprod* 2004;19:685-693.

³⁶ Munné S, Velilla E, Colls P, Bermudez M, Vemuri M, Steuerwald N, et al. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril* 2005;84:1328-1334.

³⁷ Dahdouh EM, Balayla J, García-Velasco JA. Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. *Reprod Biomed Online* 2015;30(3):281-289.

³⁸ Fragouli E, Delhanty JD, Wells D. Single cell diagnosis using comparative genomic hybridization after preliminary DNA amplification still needs more tweaking: too many miscalls. *Fertil Steril* 2007;88:247-248; autor replay 248-249.

³⁹ Rabinowitz M, Ryan A, Gemelos G, Hill M, Baner J, Cinnioglu C, et al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil Steril* 2012;97:395-400.

⁴⁰ Yang, Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24.

⁴¹ Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, et al. Blastocyst biopsy in CCS and fresh ET significantly increases IVF implantation and delivery rates; an RCT. *Fertil Steril* 2013;100:687-703.

⁴² Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod* 2011;26:3173-3180.

⁴³ Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, et al. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. *Am J Hum Genet* 2011;88:469-481.

⁴⁴ Koboldt DC, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. Challenges of sequencing human genomes. *Brief Bioinform* 2010;11:484-498.

⁴⁵ Ruttanajit T, Chanchamroen S, Cram DS, et al. Detection and quantitation of chromosomal mosaicism in human blastocysts using copy number variation sequencing. *Prenat Diagn* 2016;36(2):154-162.

⁴⁶ Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013;100:595-602.

⁴⁷ Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F, Michel CE, Minasi MG, Greco E. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod* 2014;29(12):2802-2813.

⁴⁸ Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2013;98(6):236-238.

⁴⁹ Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997;3:367-382.

⁵⁰ Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In Jansen R, Mortimer D, eds. *Towards Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999*. UK: Parthenon Publishing Carnforth, 1999:378-388.

⁵¹ Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:583-592.

⁵² Lane M, Gardner KD. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 1997;109:153-164.

⁵³ Gardner DK, Stevens J, Sheehan CB, Schoolcraft WB. Analysis of blastocyst morphology. In: Elder KC, J. Ed. *Human Preimplantation Embryo Selection*. London: Informa Healthcare, 2007:79-87.

⁵⁴ Ahlstrom A, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2011;26:3289-3296.

⁵⁵ Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, Levens ED. Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2013;99:1283-1289.

⁵⁶ Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, et al. Blastocyst biopsy in CCS and fresh ET significantly increases IVF implantation and delivery rates; an RCT. *Fertil Steril* 2013;100:687-703.

-
- ⁵⁷ Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, et al. Genetic screening in women of advanced maternal age cause a decrease in clinical pregnancy rate: A randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008;23(12):2806-2812.
- ⁵⁸ Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2012 Assisted reproductive technology national summary report. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services; 2014.
- ⁵⁹ Sauer MV. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil Steril* 2015;103(5):1136-1143.
- ⁶⁰ Goldman KN, Hodes-Wertz B, McCulloh DH, Flom JD, Grifo JA. Association of body mass index with embryonic aneuploidy. *Fertil Steril* 2015;103(3):744-748.
- ⁶¹ Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015; 103(3):e9-e17.
- ⁶² Shahine LK, Marshall L, Lamb JD, Hickok LR. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization.
- ⁶³ Tournaye H, Verheyen G, Albano C, Camus M, Van Landuyt L, Devoroev P, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertil Steril* 2002;78(5):1030-7.
- ⁶⁴ Johnson LN, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;100(3):704-711.
- ⁶⁵ Comstock JA, Kim S, Behr B, Lathi RB. Increased body mass index negatively impacts blastocyst formation rate in normal responders undergoing in vitro fertilization.
- ⁶⁶ Balasch J, Gratacos E. Delayed childbearing: effects on fertility and the outcome of pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012;24:187-93.
- ⁶⁷ Fragouli E, Alfawarati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 2013;132:1001-1013.

⁶⁸ Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996;11:2217-22.

⁶⁹ Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Hurneau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003;112:195-203.

⁷⁰ Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-91.