

# **ESTUDIO DE ANEUPLOIDÍAS EN EMBRIONES PRODUCIDOS EN UN PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

**Ornella Tedesco Mercau**

**Matricula: 1402-2479**

**Tutor: Dr. A. Gustavo Martínez**

**Director del Laboratorio de Biología de la Reproducción**

**2020**

**Universidad de Belgrano**



# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>8</b>
<u>El embrión.....</u>	8
- Desarrollo embrionario.....	9
- El blastocisto.....	11
<u>Reproducción asistida.....</u>	11
- Definición de la infertilidad.....	11
o Infertilidad femenina.....	14
o Infertilidad masculina.....	15
o Infertilidad causada por combinación de factores femeninos y masculinos.....	17
<u>Tratamientos.....</u>	17
- Tratamientos de baja y alta complejidad.....	17
o Antecedentes históricos.....	17
o Técnicas de reproducción asistida.....	18
▪ Técnicas de baja complejidad.....	18
▪ Técnicas de alta complejidad.....	18
<u>Factores que afectan la calidad embrionaria.....</u>	19
- Condiciones del laboratorio.....	20
- Calidad de las gametas.....	21
<u>Métodos de la evaluación de la calidad embrionaria.....</u>	21
<u>Reprogenetica.....</u>	24
- Evaluación genética preimplantacional.....	25
o Aspectos científicos y técnicos.....	25
o Procedimiento.....	25
o Pasos para realizar la técnica.....	27
o Resultados esperados.....	28
o Técnicas empleadas en el diagnóstico genético preimplantacional.....	28

○ Técnicas a aplicar sobre el material biopsiado.....	29
○ Algunas consideraciones con respecto a esta técnica.....	29
<b>Hipótesis.....</b>	<b>30</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>30</b>
- Generales.....	30
- Específicos.....	31
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>31</b>
- Procedimiento.....	31
- Datos registrados.....	33
- Análisis estadístico.....	33
<b>Resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>42</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>43</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>47</b>

## RESUMEN

La edad reproductiva avanzada es una de las causas más significantes de la caída de la efectividad en la tasa de embarazo en reproducción asistida. La fertilidad de la mujer disminuye en el pasar de los años a causa de la disminución de la reserva ovárica y de la disminución de la calidad de sus ovocitos, lo cual lleva a un aumento en la aneuploidía en los embriones producidos a partir de ellos.

Las aneuploidías son las anormalidades más comunes en la genética humana. Las altas tasas de aneuploidías en embriones humanos no existen en otra especie de mamífero, y provoca bajas tasas de implantación, altas tasas de abortos espontáneos, además de un aumento en el riesgo de enfermedades congénitas en los recién nacidos.

Se ha desarrollado una serie de técnicas para la selección de los embriones que se desarrollan en fecundación in vitro (FIV), incluyendo procedimientos de screening para anomalías cromosómicas numéricas o estructurales provenientes de parejas con un cariotipo normal. Estos procedimientos son comúnmente conocidos como diagnóstico genético preimplantacional por screening de aneuploidías (PGT-a).

Las plataformas genéticas empleadas para estos estudios utilizan la amplificación del genoma completo, además de la hibridación del genoma comparativo (CGH), polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), y la reciente secuenciación de la segunda generación (NGS). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se utiliza para el screening de aneuploidías. Esta tecnología se utiliza rutinariamente hace varios años con el objetivo de mejorar no solo los análisis clínicos sino además el tiempo de embarazo y, lo más importante, generar el embarazo a término con un alto número de “bebés saludables en casa”.

A través de la evaluación genética preimplantacional (PGT) se obtiene diferentes resultados, tales como como: embriones euploides (cuándo la evaluación muestra desviaciones respecto a la base bioinformática de referencia para ninguno de los veintitrés cromosomas), embriones aneuploides (presentan ganancia o pérdida de uno o más cromosomas), no informativos (cuando los resultados de la secuenciación son no concluyentes), y embrión mosaico (cuando coexisten células euploides y aneuploides en el mismo embrión).

Hasta el presente los grupos de investigación que trabajaron en la técnica de PGT realizaron la fecundación de los ovocitos mediante la técnica de ICSI, pese que no había indicación en contra del uso de FIV para esta práctica. La justificación para el uso de este método de fecundación reside en que con la técnica de fecundación in vitro convencional pueden quedar espermatozoides adheridos a la zona pelúcida y por lo tanto se amplificarían en el PCR utilizado para la evaluación genética preimplantacional. Es por eso que en el presente trabajo se estudió la realización de PGT luego de la fecundación mediante FIV convencional y por otra parte la comparación de las tasas de aneuploidías entre ambas técnicas de fecundación.

Se analizaron 58 embriones de Día 5 y Día 6 de cultivo en el estadio de blastocisto expandido, provenientes de 21 pacientes. Dichos embriones fueron obtenidos en tratamientos de fecundación in vitro realizados en Medicina Reproductiva Fertilis entre los meses de agosto de 2019 y diciembre de 2019, en los cuales los pacientes decidieron realizar PGT-a a sus embriones.

El resultado más relevante del presente estudio ha sido la confirmación de que se puede realizar el análisis cromosómico de los embriones desarrollados a partir de fecundación in vitro convencional. Esto fue confirmado a partir del hecho de no haber encontrado reportes de mosaicismo y/o embriones no informativos en el análisis de estos embriones.

Además, si bien hubo pocas confirmaciones mediante una herramienta estadística a causa del bajo número de embriones analizados, se pudo observar una tendencia hacia una mayor tasa de aneuploidía en los embriones de calidad pobre. Cuando se evaluó por separado la calidad de la masa celular interna y el trofoblasto se observó una marcada disminución en la tasa de euploidia junto con la disminución de la calidad embrionaria. Por último, la comparación de la tasa de euploidia con respecto a la edad de los pacientes coincide con hallazgos previos que muestran al igual que el presente trabajo que hay una disminución en la cantidad de embriones euploides con la edad.

Los resultados de esta tesis aportan información valiosa al uso de la técnica de fecundación in vitro convencional para la realización de la evaluación genética preimplantacional. Actualmente se está realizando este mismo análisis en cuanto a comparación de técnicas de fecundación, calidad embrionaria y edad de los pacientes sobre esta nueva técnica denominada PGT no invasivo.

**Palabras clave:** Embrión - FIV – ICSI - PGT

## AGRADECIMIENTOS

Primero y principal a la que me acompaño en absolutamente todo, mi hija perruna Luna, por estar en todos los momentos de mi vida, depresiones, alegrías y por acompañarme despierta a las 3am mientras yo estudiaba para finales.

### Mi familia:

A mis papas por apoyarme en la carrera que elegí.

A mi padrino Carlos y mi tía Bety por siempre mandarme un mensajito o llamarme para ver cómo me había ido en los parciales y finales.

A mi madrina, porque en la distancia y con sus días buenos y malos siempre estuvo presente y me hizo saber que estaba ahí para apoyarme sea la nota que sea, poniendo velitas para darme ánimo y cada vez que aprobaba me festejaba a la distancia.

A mis primo Ezequiel y a mi cuñada Nadia, por enseñarme a tomarme todo con humor y hacer la carrera divertida incluso en los malos finales y como principal, enseñarme que a materia aprobada no se le mira la nota.

A mis primos Carla, Emmanuel, Camila y Estefanía, si bien no estaban siempre presentes, cuando necesitaban algún conocimiento biológico no dudaban en lo que tenía para decirles.

Por último, pero los más importantes a mis cuatro sobrinos, Valentino, Clara, Isabella y Allegra por no dejarme dormir antes de finales, por no importarles si estaba estudiando o haciendo un trabajo ellos demandaban juegos y yo después me quedaba hasta cualquier hora haciendo lo que debería haber hecho antes. Por ser mi distracción y mi alegría en cada momento.

### La Clínica Fertilis:

Primero a Gustavo, por darme la oportunidad de hacer la tesis con él, recibirme con una sonrisa y darme el espacio para poderla llevar a cabo la pasantía y enseñarme todas las cosas con las que hoy cuento.

A mi compañera de laboratorio Estefi por tenerme una paciencia de oro, enseñarme las técnicas con las que tenía que trabajar y estar siempre ahí para mí.

A Pepa, Marce, Bren y Luchi por ser la alegría de todas las mañanas, por llamarme por teléfono y decirme “Peque a desayunar” y estar para chismear en todo momento.

A Nacho por ser la persona por la cual no se puede entrar con una mala cara a Fertilis.

A los médicos Juan, Diego, Antonio, Lautaro, Marcela, Gracho, Lucas y Laurita por aceptarme y dejarme presenciar las aspiraciones y transferencias, incluso a veces enseñarme a hacer ecografías y ayudar como circulante.

A todo Fertilis por ser incondicional y recibirme desde el día 1 con una sonrisa.

Amigos:

A mis amigas desde que tengo uso de memoria Bian, Lula, Bren y Mili por siempre sorprenderse con las cosas que sabía y por siempre tratarme como su medica personal.

Al resto del equipo Franco, Pipi, Campi, Juan, Carlitos, Tozzo, Ini, Tomas y Voltu por ser simplemente ellos.

A mis compañeros y colegas More y Chiche por darme los recuerdos más felices de la cursada, por acompañarme en cada parcial y final, incluso hasta obligarme a rendir porque ellos confiaban más en mí que yo en mi misma, por prestarme y pedirme apuntes, por los almuerzos y cenas fuera de la facultad y principalmente por hacer la carrera más divertida.

A mis compañeros y futuros colegas Iván por haberme tenido la paciencia de sentarse a enseñarme materias para que apruebe los parciales y finales, a Gina y Celi por ser mis compañeras de estudio y a Cami, Alan, Benja y Caro por aceptarme en las materias recursadas, por los mates, los desayunos y los asados.

A mis amigas de mi otro amor, la danza, Luli y Flor por acompañarme en toda la carrera y verme estudiar entre ensayo y ensayo o mientras entrenábamos.

A mis maestros Yunes, Rodri y Vicky por dejarme faltar a ensayos o clases por tener que estudiar y después siempre preguntarme como me había ido.

*No nacemos para ser lo que los demás quieren que seamos, nacemos para ser lo que nosotros queramos. - Brave*

# INTRODUCCIÓN

## El embrión

### Desarrollo embrionario

Una vez producida la fecundación, comienzan a desarrollarse los eventos tempranos de activación del oocito, que son inducidos a partir de la penetración del espermatozoide y tienen lugar antes de que ocurra la primera división celular (Figura 1). Estos eventos incluyen: la descondensación del material genético del núcleo masculino; los eventos tardíos implican: que se complete la meiosis femenina, la descondensación del material genético de su núcleo, la formación de los pronúcleos femeninos y masculinos y el reclutamiento de ARNm maternos que permitan la expresión de nuevas proteínas (Knobil y col; 2005).

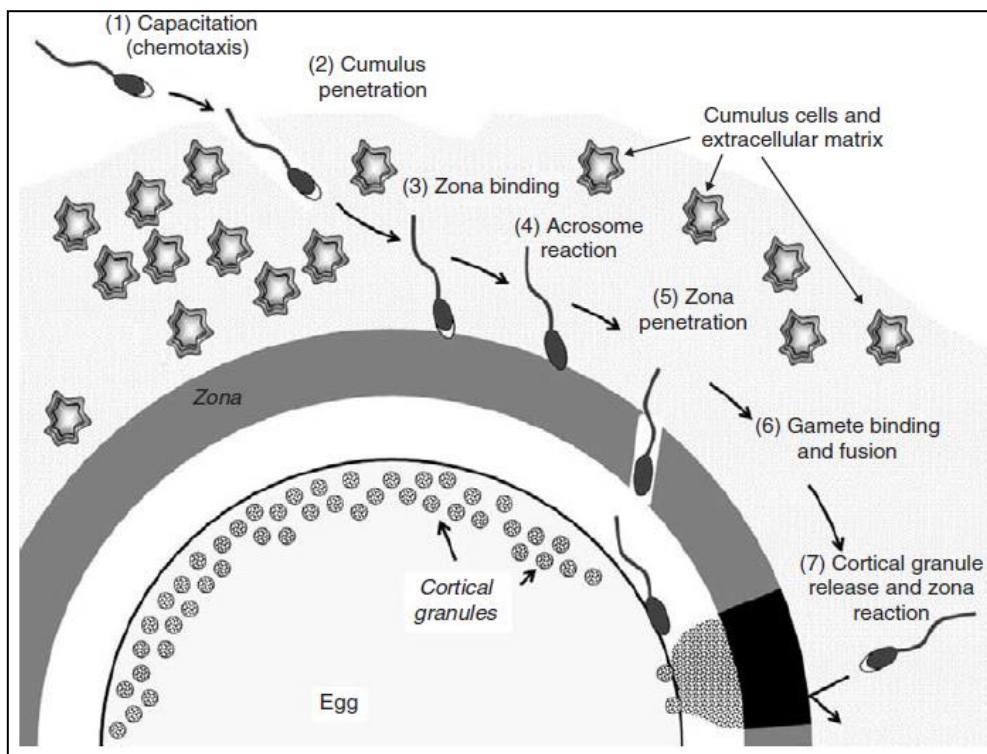


Figura 1: Esquema de los eventos tempranos que ocurren durante el proceso de fecundación. 1- La capacitación del espermatozoide se completa en el oviducto. 2- El espermatozoide penetra la matriz extracelular del cumulus, manteniendo intacto su acrosoma. 3- El espermatozoide alcanza la zona pelúcida y se une a la misma. 4- Se desencadena la reacción acrosomal. 5- El espermatozoide penetra la zona pelúcida luego de haber perdido su vesícula anterior. 6- El espermatozoide se une y luego fusiona con la membrana plasmática del oocito (en el gráfico es denominado "egg"). 7- La exocitosis de gránulos corticales constituye el inicio de la activación del oocito (en Knobil y col; 2005).



## Desarrollo embrionario

Una vez formados los pronúcleos femenino y masculino se produce la unión de ambos, proceso conocido como singamia (Tabla 1). Luego de este evento tiene lugar el primer clivaje embrionario entre las 24 y 28 horas siguientes, y el segundo clivaje, que dará un embrión de 4 células, ocurre unas 12 horas después. Usualmente las blastómeras (células embrionarias) se dividen cada 16-24 horas, por lo que en el Día 2 de desarrollo el embrión tendrá 4 células y el de día 3 tendrá 8 células (Figura 2). A partir de ese momento se activará el genoma embrionario y aquellos que lo hagan con éxito comenzarán a dividirse en forma exponencial alcanzando primero el estadio de mórula (Día 4) y luego el de blástula o blastocisto (Día 5) (Thibault y col; 1993). En la Figura 2 se observan los diferentes estadios embrionarios.

Tabla introducción 1: Cronología del desarrollo del embrión

<b>Día</b>	<b>Diferentes etapas antes y después de la ovulación</b>	<b>Tiempos aproximado desde la ovulación (hs.)</b>
<b>0</b>	Ovulación e inseminación	
<b>1</b>	Oviducto Fecundación: Pronucleado	24
<b>2</b>	Oviducto Estadio de 4 blastómeras	48
<b>3</b>	Oviducto Estadio 8 blastómeros	72
<b>4</b>	Oviducto/útero Mórula: 32 a 64 blastómeras - Blastocisto temprano: 100 células	96
<b>5</b>	Libre en el útero Blastocisto expandido. 500 células	
<b>6</b>	Libre en el útero Blastocisto saliendo de la zona pelúcida: 700 células	
<b>7</b>	Libre en el útero Primeros contactos entre las células del trofoblasto embrionario y el epitelio del endometrio que señala el inicio de la implantación: >1000 células	

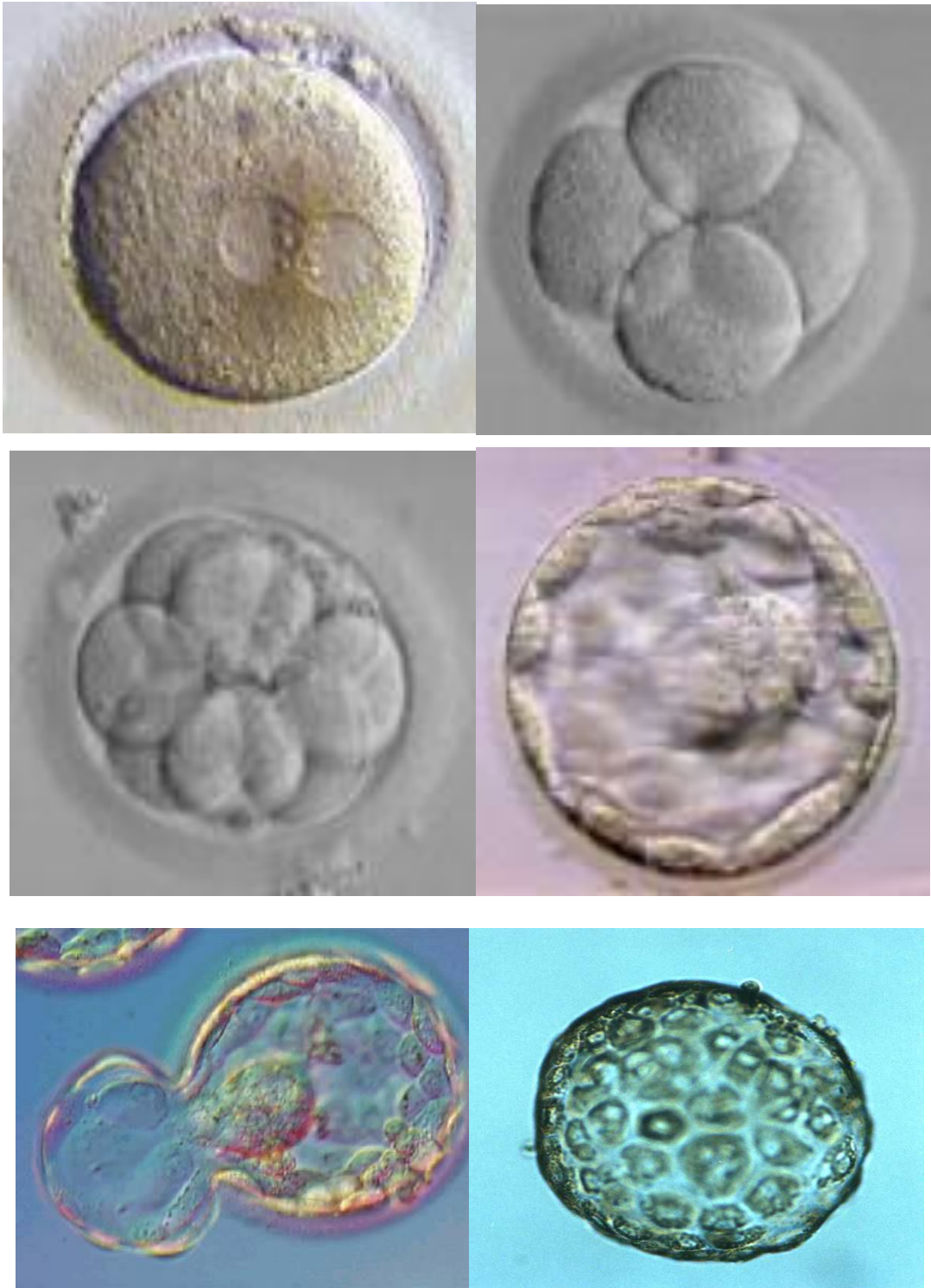


Figura 2: Desarrollo embrionario. A- Pronucleado; B- Embrión de 4 células; C- Embrión de 8 células; D- Blastocisto expandido; E- Blastocisto eclosionando; F- Blastocisto eclosionado. (Imágenes tomadas con el microscopio invertido de Fertils, aumento 400x)

## El blastocisto

La implantación del embrión en el útero es un avance evolutivo reciente asociado a la viviparidad y toma lugar en la etapa de blastocisto. Esta estrategia reproductiva asegura una eficiente nutrición y protección de los embriones, lo cual promueve su supervivencia. Para que la implantación sea exitosa debe existir una sincronización precisa entre el desarrollo del blastocisto y la receptividad uterina al comienzo del proceso.

El desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocistos es el resultado del proceso de compactación de la mórula, producto del incremento de adhesión entre las células exteriores del embrión en división. Por definición, el blastocisto es caracterizado por un blastocele, el cual es una cavidad central rodeada por una monocapa de células o trofotodermo. Un pequeño grupo de células (un cuarto de las células del blastocisto) resultante de las células interiores de la mórula, es localizada abajo del trofotodermo, y se denomina masa celular interna (MCI). Ambos tipos de celulares son requeridos para el desarrollo embrionario: el trofotodermo interactúa con el útero durante la implantación, mientras que la MCI da principalmente origen al embrión propiamente dicho. A partir de ambos tipos celulares se generarán las diferentes capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. La interacción, asociación y desarrollo de estas capas resultará en la diferenciación de tejidos y órganos del feto y también en la formación de las membranas extraembrionarias (Jirasek, 2001).

El primer contacto entre el epitelio uterino (endometrio) y el embrión es establecido por el trofotodermo. Ninguna otra capa celular es capaz de iniciar la implantación. La principal característica de las células del trofotodermo son su naturaleza epitelial y su polaridad. La polaridad aparece primero en la capa celular externa de la mórula compacta. El trofotodermo es un continuo e impermeable epitelio cuyo rol es aislar el medio embrionario e inducir la expansión del blastocele. Como consecuencia todo el intercambio materno-embrión es efectuado por el trofotodermo, al menos durante la fase de vida libre del blastocisto.

## **Reproducción asistida**

### **Definición de infertilidad**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo determinado por la imposibilidad de concebir un embarazo luego de 12 meses o más de coitos regulares no protegidos si la edad de la mujer es menor a 35 (OMS, 2010). En el caso de mujeres de mayor edad no es aconsejable esperar los 12 meses y se trata de comenzar los estudios luego de 6 meses. La reproducción es un proceso natural que tiene una baja tasa de éxito en la especie humana. Aproximadamente solo el 25% de las parejas

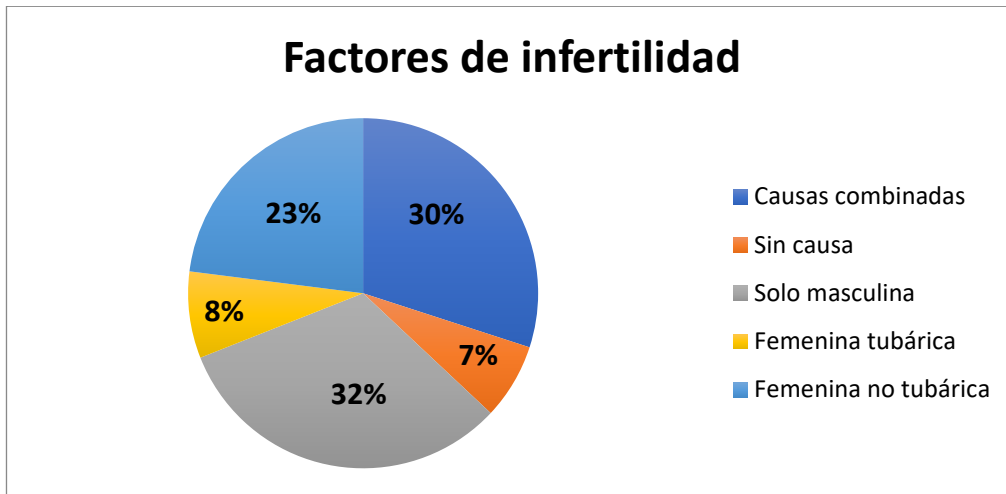
saludables menores de 30 años que tengan relaciones regularmente logran producir el nacimiento de un niño.

Desde un punto de vista social, para muchas personas, formar una familia y tener hijos es considerado como objetivos de vida. Cuando esa meta no se alcanza debido a la infertilidad, esto produce un gran impacto negativo a nivel psicológico, provocando frustraciones, y alteraciones emocionales. Aproximadamente el 10 al 15% de las parejas experimentan algún problema de infertilidad durante su vida fértil, esto representa entre 50 y 80 millones de personas a nivel mundial. Se estima que cada año se agregan 2 millones de parejas con problemas de infertilidad en el mundo y que la incidencia está aumentando (Adamson y col; 2018)

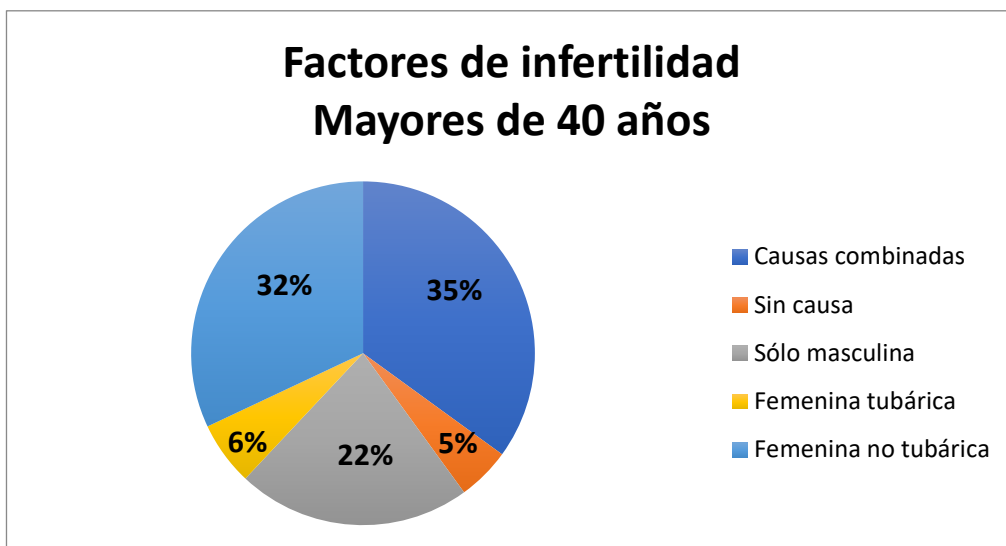
En las últimas décadas ha habido un aumento en el número de personas que consultan por infertilidad, y esto puede ser atribuido al menos a tres factores (Wilkinson y col; 2019). En primer lugar, se destaca la postergación del momento en que se decide procrear, lo cual está relacionado con una mayor participación de la mujer en actividades profesionales y laborales. En segundo lugar, el aumento de las alteraciones en la calidad del semen debido a hábitos sociales como el alcoholismo y el tabaquismo. Por último, se pueden mencionar los cambios en la conducta sexual. Los avances de los métodos anticonceptivos, en muchas ocasiones provocan el reemplazo del preservativo por métodos que, si bien impiden el embarazo, dejan más expuestos los órganos reproductivos al contacto íntimo, con el consecuente aumento del riesgo de contraer enfermedades de transmisión sexual. Estas podrían potencialmente alterar la capacidad reproductiva.

A veces, la fecundación se ve impedida debido a diversos factores anatómicos y/o fisiológicos. En estos casos, estamos ante problemas de fertilidad, los cuales pueden ser solucionados mediante tratamientos de reproducción asistida. Aunque habitualmente se emplea el término infertilidad en forma generalizada, no siempre se utiliza correctamente. Se define como infertilidad primaria aquella situación en la que no se puede conseguir la concepción. Mientras que se denomina infertilidad secundaria, cuando la pareja ha tenido un hijo previamente, pero no logra la concepción cuando busca un nuevo embarazo. En el caso de las parejas igualitarias o madres solteras por elección, hablamos de infertilidad estructural, ya que para lograr la concepción de un hijo necesitan una célula del sexo contrario.

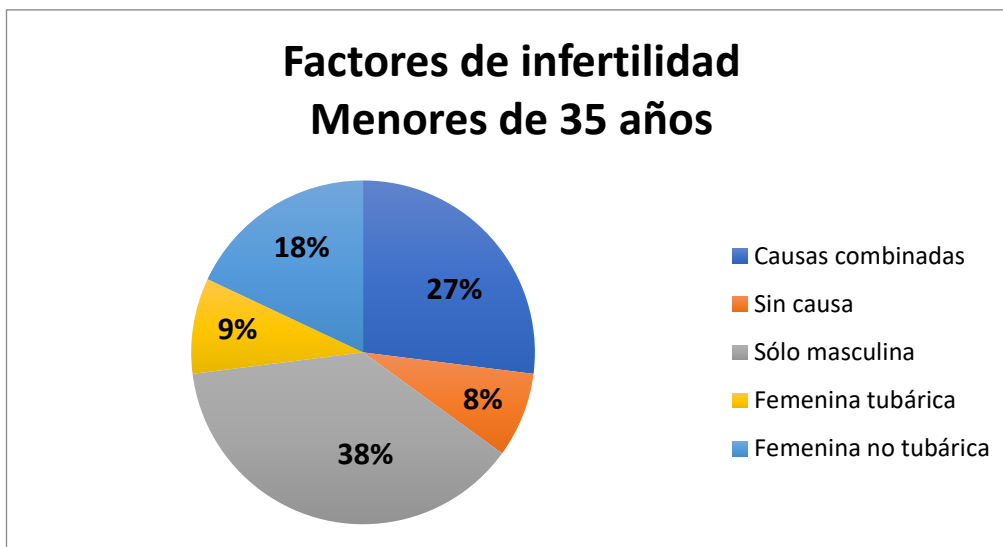
El estudio de la pareja infértil siempre ha sido enfocado considerando diferentes factores: el factor ovulatorio, el factor útero-tubario-peritoneal y el factor masculino entre otros. Estos factores pueden combinarse entre sí, o actuar independientemente (Morente y col; 2013). Globalmente, el factor masculino y las causas mixtas son las más prevalentes (Cuadro 1); mientras que en las pacientes mayores de 40 años el factor femenino no tubario y las causas mixtas son las más frecuentes (Cuadro 2). En cambio, en las pacientes menores de 35 años, la causa más frecuente es el factor masculino (Cuadro 3).



Cuadro 1: Distribución de los factores de infertilidad (Morente y col; 2013)



Cuadro 2: Distribución de los factores de infertilidad en pacientes mayores de 40 años. (Morente y col; 2013)



Cuadro 3: Distribución de los factores de infertilidad en pacientes menores de 35 años (Morente y col; 2013)

A continuación, se analizarán las causas de infertilidad, tanto femeninas como masculinas, así como también las que se deben a fallas en la interacción entre ambos sexos.

#### - Infertilidad Femenina

La infertilidad femenina tiene su origen en múltiples factores entre los que se pueden enumerar: desordenes ovulatorios, alteraciones anatómicas, procesos infecciosos, afecciones congénitas, causas genéticas, entre otras.

La ovulación es el fenómeno más importante del ciclo menstrual femenino y su ausencia es responsable de la infertilidad que padecen un gran número de mujeres. El hecho de que el óvulo no sea expulsado del ovario se conoce como anovulación, y es definida como la condición en la cual el desarrollo y la ruptura folicular están alterados. La anovulación puede deberse a la falta de estímulo por parte del hipotálamo o de la hipófisis, razón por la cual se ve modificada la producción de GnRH, FSH y LH; así como también por alguna falla en la respuesta del ovario hacia las hormonas antes mencionadas. Esta deficiencia ovárica puede deberse a factores genéticos o a causas funcionales como exceso de ejercicio físico, bajo peso corporal, utilización de drogas y tratamientos oncológicos (Lania y col; 2019).

El síndrome de ovario poliquístico es la patología endócrina más prevalente en las mujeres y la causa más frecuente de anovulación (Sanchez-Garrido y Tena-Sempere, 2020). Los ovarios que presentan esta afección se caracterizan por secretar una mayor proporción de hormonas

masculinas y por reclutar una gran cantidad de folículos en cada ciclo menstrual, por lo que la función ovárica normal se ve alterada.

Entre las alteraciones anatómicas más frecuentes se destacan las adherencias pelvianas, también llamadas sinequias. Estas son cicatrices que involucran al aparato reproductor femenino, y que, en general, constituyen una secuela de procesos infecciosos o de endometriosis. En esta patología se unen diferentes órganos, alterando tanto la anatomía como la fisiología del aparato reproductor femenino (Curry y col; 2019).

La endometriosis puede ser definida como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, y sus causas pueden ser tanto genéticas, como inmunológicas u hormonales (Freytag y col; 2020). Dentro de las alteraciones congénitas más frecuentes se puede destacar la segmentación vertical del útero (tabicación), responsable de producir abortos recurrentes, y la obstrucción tubaria de las Trompas de Falopio, que puede ser unilateral o bilateral. Esta afección puede ser también producida por una infección de las vías reproductivas (Benacerraf, 2019).

La infertilidad femenina puede tener causas genéticas, como pueden ser alteraciones en el cromosoma "X", mutaciones en ciertos genes que alteran la anatomía del aparato reproductor, mutaciones en genes que alteran la función de las hormonas esteroideas sexuales, así como también mutaciones en los genes que codifican los receptores de hormonas nucleares, receptores de estrógenos y de andrógenos (Jedidi y col; 2019).

#### - Infertilidad masculina

El espermograma en el cual se realiza el análisis del semen es el estudio más importante a realizar en el hombre cuando la pareja presenta dificultades para concebir. Según el Manual de la OMS del 2010 un espermograma se considera normal cuando el volumen de semen es  $\geq 1.5$  ml, y la concentración de espermatozoides por es  $\geq 15$  millones/ml. Cuando la concentración de espermatozoides está por debajo del nivel considerado como normal, se dice que el individuo presenta oligospermia, mientras que la azoospermia se define como la ausencia de los gametos masculinos en el eyaculado (OMS, 2010).

Otros aspectos a tener en cuenta al momento de analizar la calidad del semen, es la movilidad espermática, así como también su morfología. Una muestra normal debe tener una cantidad de espermatozoides con movilidad progresiva  $\geq 30\%$ . En muchos casos la movilidad es anormal, y esto puede deberse a largos períodos de abstinencia, determinadas condiciones psicológicas, factores inflamatorios, inmunológicos, congénitos e idiopáticos o incluso a errores durante la obtención y transporte de la muestra (OMS, 2010).

La evaluación de la morfología espermática es tan importante como la evaluación de la concentración y la movilidad, ya que si los espermatozoides son morfológicamente anormales,

probablemente sean también anormales funcionalmente. La OMS considera normales aquellas muestras de semen con espermatozoides con morfología normal  $\geq 4\%$ . Los resultados de la evaluación de la morfología con criterio estricto se correlacionan con la capacidad de los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida, penetrar y fecundar los oocitos y con fallas en la implantación y en la concepción (OMS, 2010).

Dentro de las causas más comunes de infertilidad masculina se puede mencionar la disfunción eyaculatoria junto con todas sus variantes. Estas incluyen la ausencia completa de eyaculación, la eyaculación retrógrada y la eyaculación prematura. Las dos primeras pueden tener un origen traumático, iatrogénico, farmacológico, metabólico y psicológico, mientras que la eyaculación prematura puede deberse a causas sistémicas, inflamatorias o psicológicas (Shindel, 2019).

El varicocele es una patología frecuente (10-25% de hombres jóvenes sanos) que se caracteriza por la dilatación de las venas de los testículos, la cual provoca una alteración de los parámetros seminales normales en los individuos afectados, ya que tiene una influencia directa sobre la espermatogénesis (Shindel, 2019).

Las infecciones en el tracto reproductor masculino pueden contribuir o ser causales de infertilidad, ya que alteran la espermatogénesis, el almacenamiento de los gametos masculinos y el transporte en el sistema glandular secretorio, causando inflamación y consecuentemente esclerosis del sistema de transporte de túbulos, generando infecciones en la próstata y en las vesículas seminales, desarrollando anticuerpos antiespermáticos y aglutinación (Vickram y col; 2019).

Además, las infecciones o inflamaciones afectan la función secretora de la próstata y de las vesículas seminales. Las infecciones de la próstata causan obstrucciones parciales o totales de los conductos eyaculadores, causando oligospermia o azoospermia (Wijayarathna y Hedger, 2019).

Existen también factores genéticos responsables de la infertilidad masculina, que se considera que corresponden a menos de un 5%, y que se clasifican según si la alteración se debe a un único gen o a un defecto estructural de los cromosomas. Dentro de las patologías genéticas más frecuentes se pueden destacar la fibrosis quística (1 en 2500), que induce un pobre desarrollo del conducto de Wolff y una azoospermia obstructiva; y la distrofia miotónica (1 en 8000), que causa atrofia testicular (Jedidi y col; 2019).

La importancia del diagnóstico genético radica tanto en la posibilidad de realizar diagnósticos etiológicos de la afección, así como evaluar los riesgos de transmisión a la descendencia (Rey Valzacchi, 2013).



- Infertilidad causada por combinación de factores femeninos y masculinos

El contacto entre algunos tejidos de los aparatos reproductores femeninos y masculinos, puede generar en algunos casos, una respuesta inmune que desencadena dificultades para concebir.

Se ha demostrado, que tanto los hombres como las mujeres pueden desarrollar anticuerpos antiespermáticos que reaccionarán contra aquellos gametos y que alterarán la capacidad reproductiva de la pareja (Vickram y col; 2019).

## **Tratamientos**

### **Tratamiento de baja y alta complejidad**

- Antecedentes históricos

A mediados del siglo XX, y durante muchos años, los métodos quirúrgicos habían ocupado un rol principal en el tratamiento de la infertilidad, aplicados a contrarrestar el daño en determinados órganos reproductores como las Trompas de Falopio. Sin embargo, a la vez fueron desarrollándose nuevas metodologías menos invasivas. Comenzaron a ser utilizadas la laparoscopia y la ultrasonografía. Por otra parte, lograron avances en el campo de la endocrinología. La inducción de la ovulación en mujeres acíclicas fue el método endocrinológico más utilizado en esos años y lo sigue siendo actualmente (Huhman, 2018).

Estas nuevas metodologías fueron reemplazando las clásicas técnicas de la medición del moco cervical para predecir la ovulación, y el control de la temperatura corporal basal. La laparoscopia operatoria se convirtió en la principal opción al momento de tratar patologías tubo-peritoneales femeninas, y simultáneamente fueron desarrolladas técnicas como la faloposcopia, la histerosalpingografía, la microlaparoscopia y la hidrolaparoscopia transvaginal para realizar un mejor análisis y diagnóstico de la patología tubárica (Dubuisson y col; 1990).

El desarrollo de la fertilización *in vitro* (FIV) ha brindado información adicional sobre la gametogénesis y el desarrollo de los embriones, lo que permitió avanzar en el entendimiento de la importancia de la calidad oocitaria, así como también de las alteraciones que pueden ocurrir al momento de la implantación (McGowen y col; 2014).

En la búsqueda de aumentar la tasa de fecundidad en mujeres infértiles, se comenzaron a emplear inductores de la ovulación, que permitieran obtener un mayor número de oocitos disponibles para ser fecundados. A lo largo de los años, se han utilizado diferentes inductores como el citrato de clomifeno, las gonadotropinas obtenidas a partir de mujeres menopáusicas, la FSH purificada, y en más recientemente la FSH recombinante (Holesh y col; 2020).

Con respecto a los hombres, ya a principios del siglo XX, se reconoció la importancia de la infertilidad masculina, por lo que comenzaron a surgir nuevas ideas, como la participación de la

FSH en la espermatogénesis, y el rol principal de la cirugía en la reparación de los vasos deferentes (Acosta y col; 1991). En la actualidad el tratamiento del factor masculino está fuertemente relacionado con la inyección citoplasmática de espermatozoides (ICSI), logrando muy buenos resultados a partir de esta técnica.

- Técnicas de reproducción asistida

Las parejas que experimentan dificultades para concebir, en la actualidad tienen a su disposición una gran variedad de tratamientos y metodologías que incorporan avances médicos y tecnológicos y que proveen diversas alternativas para lograr una solución a su problema.

Las técnicas de reproducción asistida son aquellas que consisten en la asistencia del médico para facilitar el contacto entre el oocito y el espermatozoide. Se las puede clasificar en las técnicas de baja complejidad y las técnicas de alta complejidad.

i. Técnicas de baja complejidad

La inseminación intrauterina es el proceso por el cual el semen es puesto en el útero mediante el empleo de un catéter especialmente diseñado para esta práctica. Previo a realizarse este procedimiento, los espermatozoides son sometidos a un proceso de selección en el laboratorio para el mismo día en que se producirá la ovulación, logrando así un encuentro sincrónico de las gametas.

ii. Técnicas de alta complejidad

El 25 de Julio de 1978 nació en Inglaterra Louise Brown, el primer “bebé de probeta”, producto de la fecundación de un oocito y un espermatozoide *in vitro*, es decir, fuera de la cavidad uterina. Fue un hecho de gran impacto social, y que revolucionó la medicina reproductiva. Este procedimiento fue realizado por los Doctores Robert Edwards, quien ganó el premio Nobel, y Patrick Steptoe. En la actualidad se estima que el número de bebés nacidos como resultado de las tecnologías de reproducción asistida de alta complejidad ha superado los 8 millones (Mouzon y col; 2020).

Inicialmente, la FIV se indicaba para solucionar la infertilidad relacionada con problemas en las Trompas de Falopio. Sin embargo, gracias al éxito alcanzado, la técnica se convirtió en el tratamiento estándar de diversas patologías responsables de producir infertilidad.

Los pasos implicados en un tratamiento de FIV son:

- Hiperestimulación ovárica controlada: mediante el suministro hormonal se logra aumentar el número de folículos preovulatorios.

- Aspiración oocitaria: empleando una aguja guiada por ecografía se realiza la punción de los folículos preovulatorios.
- Recuperación de oocitos: se realiza la captación de los oocitos aspirados en el laboratorio.
- Procesamiento de los espermatozoides: mediante centrifugación se realiza la selección de los espermatozoides para realizar la fecundación.
- Co-incubación de los oocitos y los espermatozoides: ambas gametas son incubadas en conjunto durante 16 a 20 horas para que se produzca la fecundación
- Cultivo *in vitro* de los embriones: los embriones producidos son cultivados en los medios apropiados durante 3 a 5 días.
- Transferencia embrionaria: mediante un catéter especial se coloca un embrión dentro del útero a la espera de lograr la implantación y el embarazo.

En los casos en que se presente un factor masculino severo (bajo número de espermatozoides o escasa movilidad de los mismos) se indica la técnica de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), la cual consiste en incorporar un único espermatozoide directamente en el citoplasma del oocito, de manera que se logran atravesar las barreras puestas por la zona pelúcida y la membrana plasmática mediante una microinyección empleando una aguja especialmente diseñada para esta práctica (Figura 3).



*Figura 3: Inyección intracitoplasmática previo a la liberación del espermatozoide (Elder y Dale; 2011).*

**Factores que afectan la calidad embrionaria en fecundación *in vitro*.**

Podemos enumerar cuatro causas principales como las responsables de la mala calidad de los embriones que se producen en el laboratorio:

1. Estudio incompleto de la pareja infértil
2. Protocolo de estimulación inadecuado
3. Condiciones adversas en el laboratorio de embriología
4. Anormalidades genéticas o citoplásmicas en las gametas

### Condiciones del Laboratorio

Es obvio que si las condiciones que encuentran las gametas al entrar al laboratorio son adversas, el producto final será de mala calidad. Sólo haciendo un esfuerzo por mantener las condiciones óptimas lograremos embriones de buena calidad. Para ello podemos considerar al laboratorio como un sistema con módulos conectados a los cuales es necesario controlar y mejorar. Cualquier laboratorio puede producir embriones que sobrevivirían a las condiciones imperantes dada la elasticidad intrínseca de los mismos. Pero sólo aquel laboratorio que haya optimizado todos los aspectos involucrados en el desarrollo *in vitro* logrará obtener embriones de buena calidad asegurando un alto potencial de implantación para desarrollar embarazos viables (Esfandiari y Gubista; 2020).

Dentro de estos aspectos dedicaremos una particular atención a los medios de cultivo. Originalmente se empleaban formulaciones simples de medios para todas las etapas de un ciclo de producción *in vitro*. Hoy sabemos que los requerimientos energéticos, de iones y nutrientes van cambiando con los diferentes estadios del desarrollo embrionario. Condiciones inapropiadas de cultivo exponen a los embriones a un stress celular que puede resultar en un clivaje retrasado, una detención del clivaje, formación de fragmentos citoplasmáticos, pobre producción de energía, inadecuada activación del genoma y deficiente transcripción génica (Fan y col; 2010).

Aunque estas necesidades embrionarias no son por entero conocidas, hoy contamos con medios, los cuales son específicos para cada estadio, químicamente definidos, con los que se pretende reproducir la situación *in vivo*. Estos son medios salinos suplementados con aminoácidos, proteínas, factores de crecimiento, entre otro (Gardner y col; 2020).

Las únicas pruebas concluyentes de que un medio es el adecuado luego de los controles de calidad habituales es la obtención de tasas adecuadas de fertilización ( $\geq 70\%$ ), clivaje ( $\geq 95\%$ ) y embarazo e implantación (próximos al 45% y al 20% respectivamente, para mujeres menores de 39 años y respuesta ovárica adecuada).

Un punto clave dentro del sistema es la temperatura, ya que los oocitos humanos son extremadamente sensibles a variaciones momentáneas de este factor. Pequeñas disminuciones de temperatura pueden causar disrupción irreversible del huso meiótico y dispersión de cromosomas. Una forma efectiva de solucionar este problema es incorporar al sistema platinas

térmicas y cubrir las cápsulas con aceite mineral (el cual actúa de amortiguador de los cambios atmosféricos).

### Calidad de las gametas

La calidad de las gametas que se empleen en el proceso de desarrollo *in vitro* de embriones afectará el resultado final del mismo. Ha sido demostrado que tanto la edad de los oocitos como el origen de los espermatozoides afecta fuertemente la calidad de los embriones producidos a partir de ellos tanto desde el punto de vista anatómico como genético (Vermey y col; 2019).

En el núcleo de los oocitos se encontraron anomalías genéticas tales como errores en la segregación de cromátidas durante la primera división meiótica, anomalías en la estructura del huso meiótico y anomalías producidas durante las divisiones mitóticas tempranas. Mientras que en el citoplasma se han observado anomalías en la estructura y/o distribución de proteínas estructurales y reguladoras, factores de transcripción y sitios de almacenaje. Debido a que el desarrollo embrionario temprano está dirigido por constituyentes ooplásmicos, las anomalías mencionadas se traducen en una pobre tasa de división celular, muerte celular y/o fragmentación embrionaria. Todos estos factores son responsables, en gran parte, de las fallas de implantación y pérdidas de embarazos tempranos.

Es conocida la declinación en la fertilidad a medida que aumenta la edad materna. Dicha declinación es muy marcada a partir de los 35 a 37 años de edad. Se ha establecido que en oocitos de mujeres de edad materna avanzada la función mitocondrial se halla alterada debido a un incremento de las especies reactivas de oxígeno, que provocan un aumento del stress oxidativo y una reducción de los niveles de ATP (Somigliana y col; 2016).

Pero no sólo el oocito es el responsable de la mala calidad embrionaria. Trabajos recientes han mostrado evidencias de que los pacientes con factor masculino pueden producir altas tasas de embriones mosaico y caóticos, aunque el paciente sea cromosómicamente normal (Colaco y Sakkas; 2018). Estos autores compararon la constitución cromosómica de embriones obtenidos mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides realizada con espermatozoides provenientes del eyaculado y de aquellos en los que se realizó la recuperación quirúrgica de espermatozoides. Como resultado observaron que las anomalías cromosómicas (principalmente mosaicismos) eran mayores en el grupo de recuperación quirúrgica.

### **Métodos de evaluación de la calidad embrionaria**

La calidad embrionaria es una medida subjetiva de determinar el potencial implantatorio de un embrión. Algunos parámetros embrionarios utilizados para esta evaluación son la velocidad de división celular, el aspecto de las blastómeras, la presencia de fragmentación celular, la

presencia de uno o más núcleos en las células, la apariencia de la zona pelúcida y la morfología de pronúcleos y cuerpos polares. Esta forma de evaluación es no invasiva y fácil de llevar a cabo, pero genera gran variabilidad entre evaluadores (Abeyta y Behr; 2014) y es muy cuestionada. Esto ha llevado al desarrollo de diferentes técnicas de evaluación entre las que podemos nombrar el uso de sistemas timelapse, determinaciones metabólicas del embrión en cultivo, evaluaciones genéticas, entre otras (Munné y Gallego; 2019).

Se ha observado una menor tasa de implantación en embriones de clivaje lento, mientras que, la mala morfología celular y la pobre adhesión entre células también correlacionan con baja tasa de implantación (McCollin y col; 2020).

La fragmentación es una división celular sin división nuclear. Esto provoca una pérdida parcial o total de la integridad celular, lo cual redundaría en una menor tasa de implantación de estos embriones (Fujimoto y col; 2019). La emisión de fragmentos a partir de las blastómeras es algo común en los embriones producidos *in vitro*, pero se desconoce con qué frecuencia ocurre in vivo.

Frecuentemente algunas blastómeras muestran más de un núcleo luego de la primera división celular. Los mecanismos para que esta multinucleación se produzca incluyen la cariocinesis sin citocinesis, la fragmentación nuclear y/o la migración anormal de cromosomas durante la anafase. Diversos estudios han confirmado que los embriones de este tipo tienen una menor capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto. En pacientes que recibieron al menos un embrión multinucleado se registraron bajas tasas de implantación y embarazo (Gardner y Balaban; 2016).

Para algunos autores la evaluación de la morfología de los pronúcleos es de gran importancia para determinar la calidad del embrión. Se ha establecido que un tamaño diferente de los pronúcleos produce arrestos cigóticos con mayor frecuencia, y luego del clivaje se observa un mayor número de embriones de día 2 multinucleados y de embriones de día 3 con mosaicismo. Se ha encontrado que los cigotos con sus pronúcleos ubicados en forma contigua y con sus nucléolos polarizados tienen mayor número de células en el día 3, además de menor incidencia de multinucleación y arresto embrionario (Bisioli y col; 2002).

Por último, debemos mencionar que ha habido un gran esfuerzo por desarrollar escalas de clasificación embrionaria que asignen un puntaje o número a los embriones producidos, con el objetivo de diferenciar los de buena y mala calidad. La escala más aceptada a nivel mundial y que ha ganado gran lugar en los laboratorios de embriología humana es la desarrollada en el consenso realizado en Estambul en el año 2011 al cual asistieron representantes de la sociedad Alpha de embriología y de la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) en 2011 (Balaban y col; 2011).

Como se mencionó anteriormente se están realizando grandes esfuerzos por desarrollar métodos objetivos de evaluación embrionaria. Entre ellos, los que han logrado mayor grado de desarrollo son los estudios del metabolismo embrionario, los estudios del embrión en cultivo mediante timelapse y por último la evaluación genética preimplantacional (PGT).

Se ha establecido que la actividad metabólica de un embrión puede medirse para determinar su calidad, ya que los embriones de mejor calidad harán un uso diferente de los estratos metabólicos que aquellos de calidad pobre (Thompson y col; 2016). Dentro de los métodos utilizados se destacan el monitoreo de la captación de piruvato, del consumo de glucosa y la detección de productos derivados del embrión en el medio de cultivo (Bracewell-Milnes y col; 2017). Recientemente se han logrado grandes avances al determinar que blastocistos de buena calidad producen algunas sustancias que indican al endometrio su presencia y que permiten que este reconozca al embrión permitiendo implantarse (Grasso y col; 2018). El sistema se basa en tomar una serie de fotografías con espacio de 5 a 10 minutos para componer una película del desarrollo embrionario de forma abreviada para de esta forma poder determinar mediante algoritmos computacionales que embrión tiene el mayor potencial de implantación (Armstrong y col; 2018). Pese a que esta es una tecnología muy prometedora, no ha mostrado una mejoría en las tasas de embarazo e implantación que justifique el uso generalizado en los laboratorios de reproducción (Reignier y col; 2018).

Finalmente, la técnica de evaluación embrionaria que más difusión ha logrado hasta el presente es la evaluación genética preimplantacional de los embriones. Mediante esta técnica se puede evaluar una parte importante de las anomalías genéticas presentes en ellos. La mayoría de ellas provienen de anomalías de los ovocitos que dieron origen a los embriones. Las más comunes son el resultado de errores en la segregación de las cromátidas durante la primera división meiótica (Mihajlović y FitzHarris; 2018). También se han descrito anomalías en el huso meiótico que contribuyen a una distribución inapropiada de los cromosomas entre el oocito y el primer cuerpo polar (Capalbo y col; 2017). Otra fuente de anormalidades genéticas se presenta durante las mitosis en los embriones tempranos. Adicionalmente, las anormalidades genéticas aparecen con una frecuencia marcadamente aumentada en embriones de mujeres de edad avanzada. Este tipo de anormalidades genéticas aparecen frecuentemente en embriones de baja calidad (Nagaoka col; 2012).

Los avances tecnológicos en la evaluación genética preimplantacional hacen posible realizar un estudio más detallado de la calidad de los embriones previo a la implantación, pudiéndose con estas técnicas analizar todos los cromosomas embrionarios (Kemper y col; 2019). A partir del conjunto de técnicas de biología molecular y genética desarrollada en los últimos años ha aparecido un nuevo campo de estudio en las técnicas de reproducción asistida denominado "Reprogenética".

## Reprogenética

La edad reproductiva avanzada es una de las causas más significantes de la caída de la efectividad en la tasa de embarazo en reproducción asistida. La fertilidad de la mujer disminuye con el pasar de los años a causa de la disminución de la reserva ovárica y de la calidad de sus ovocitos, lo cual lleva a un aumento en las aneuploidías en embriones producidos. Las aneuploidías son las anormalidades más comunes en la genética humana. Numerosos trabajos en los que se estudian la tasa de aneuploidía en los embriones humanos muestran que más de la mitad de estos son aneuploidías (Kemper y col; 2019). Estas altas tasas de aneuploidías en embriones humanos no existen en otra especie de mamíferos y está implicada en bajas tasas de implantación, altos abortos espontáneos, altos riesgos de enfermedades congénitas y fetos con anomalías cromosómicas, como el síndrome de Down (Fesahat y col; 2020). En los últimos años se han desarrollado técnicas para la selección de embriones desarrollados en la fecundación *in vitro* (FIV), incluyendo procedimientos de screening para anomalías cromosómicas numéricas o estructurales provenientes de parejas con un cariotipo normal. Estos procedimientos son comúnmente conocidos como evaluación genética preimplantacional (PGT por sus siglas en inglés).

En los años 90 se empleaba la hibridación fluorescente in situ (FISH) para realizar el PGT tanto en cuerpos polares como en embriones en estadios tempranos para visualizar cromosomas. Después de la publicación de varios estudios retrospectivos, esta técnica se volvió popular. Numerosos trabajos demostraron que el PGT empleando el FISH no incrementó la tasa de nacimientos y en algunos casos incluso lo redujo (Cornelisse y col; 2020). Muchos factores son los responsables de este resultado, incluyendo la ineficiencia del procedimiento FISH, el número limitado de cromosomas analizados, problemas con la cantidad de mosaísmos cromosómicos en la etapa de clivaje, y el hecho que la mayoría de los estudios son con pacientes con mal pronóstico, que producen embriones de mala calidad.

En la década pasada, nuevas tecnologías basadas en la amplificación del genoma completo a partir de una sola célula, permitió realizar un screening para 24-cromosomas, así pudo contribuir al campo del PGT iniciando una nueva etapa en el diagnóstico. Las plataformas utilizan la amplificación del genoma completo, además de la hibridación del genoma comparativo (CGH), polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), y la reciente secuenciación de la segunda generación (NGS). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se utiliza para el screening de aneuploidías. Esta tecnología se utiliza rutinariamente desde 2008 con el objetivo de mejorar no solo los análisis clínicos sino además el tiempo de embarazo y, lo más importante el número de “bebés saludables en casa”.



La finalidad de un programa de screening o tamizaje prenatal es la identificación de embarazos de riesgo genético aumentado, sobre todo cuando la mujer tiene menos de 35 años y la pareja no tiene antecedentes familiares relevantes de enfermedades genéticas.

El propósito del mismo es intentar detectar riesgo aumentado para trisomías autosómicas fetales, especialmente la de los cromosomas 21, 18, 13 y los defectos de cierre del tubo neural. Existen los que se realizan antes de terminar el primer trimestre del embarazo (semana 10) y los del segundo trimestre (semana 15).

## **Evaluación genética preimplantacional**

### Aspectos científicos y técnicos

La evaluación genética preimplantacional (PGT) es, en forma genérica, el estudio del ADN de embriones humanos. Un porcentaje elevado de embriones humanos presenta alteraciones genéticas de distinto tipo, y este porcentaje aumenta con la edad de la mujer (Romanski y col; 2019). Por otro lado, existen enfermedades génicas específicas, portadas por progenitores que pueden detectarse en el embrión temprano, con la tecnología disponible actualmente. De dichos embriones se realiza biopsia de un número de células que varía según el número de días de desarrollo.

Dentro del concepto de PGT debemos distinguir algunas opciones:

- PGT-a: es la evaluación que se realiza para seleccionar embriones cromosómicamente normales dentro de una cohorte embrionaria.
- PGT-m: es la evaluación que se realiza para determinar la presencia o no de un alelo causante de una enfermedad genética específica.
- PGT-sr: es la evaluación que se realiza para evaluar rearrreglos cromosómicos heredables

### Procedimiento

En todos los casos antes de comenzar el estudio genético, es necesario realizar una fecundación *in vitro*.

#### PGT-a:

Es la selección de los embriones cromosómicamente normales de una cohorte en la que se sospecha que está elevada por encima de lo normal la proporción de embriones cromosómicamente anormales. Las alteraciones cromosómicas, afectan al número o a la estructura de los cromosomas. La gran mayoría de los embriones que presentan alterado su

número de sus cromosomas, no poseen la capacidad de implantar en el útero, o en caso de implantar, detienen su evolución generando un aborto. En un muy bajo porcentaje pueden generar un nacido vivo con una anomalía cromosómica (como el Síndrome de Edwards, Síndrome de Patau, Síndrome de Down o Síndrome de Turner), o incluso un tumor trofoblástico (placentario) gestacional con o sin embrión.

Entre el 0,6 y 6% de los recién nacidos presentan anomalías en el cariotipo: translocaciones (anomalías en la estructura de los cromosomas) o aneuploidías (alteración del número de cromosomas). En promedio, el 60% de los abortos espontáneos presentan alteraciones cromosómicas, y este porcentaje aumenta significativamente con la edad de la mujer, representando más del 80% de los abortos en mujeres mayores de 40 años. De ahí la gran importancia de PGT-a.

Existen factores de riesgo que se asocian a una mayor probabilidad de generar un mayor porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas: edad avanzada, aborto de repetición sin causa conocida o con aneuploidías recurrentes, factor masculino severo y falla recurrente de implantación. En estos casos muchos grupos recomiendan estudiar genéticamente los embriones mediante PGT-a para seleccionar los embriones normales cromosómicamente y los que, por tanto, tendrán mayor posibilidad de implantar.

Entre el 20 y el 40% de los embriones *in vitro* son genéticamente anormales según estudios científicos, de hecho, los más recientes estudios elevan este dato incluso hasta el 50% a 60%, y este porcentaje aumenta significativamente con la edad de la mujer o con los otros factores anteriormente mencionados (aborto recurrente, falla recurrente de implantación, factor masculino severo o anomalías en el cariotipo de la pareja).

Las anomalías del cariotipo de la pareja se presentan cuando uno de los dos integrantes presenta translocaciones, inversiones o mosaicismos cromosómicos. Estos pacientes no presentan alteraciones fenotípicas y no padecen ninguna enfermedad. Pero presentan una elevada proporción de aneuploidías en los embriones que generan (80 a 95%).

Debido a todo lo mencionado, se desprende que un bajo porcentaje de embriones humanos tiene aptitud genética para implantar, desarrollarse y culminar su proceso como un nacido vivo sano, este número se ha estimado en un 15-20% de los embriones. Los más recientes estudios internacionales, ensayos clínicos aleatorizados que comparan resultados en FIV, haciendo uso del PGT-a, han arrojado todos resultados similares, incrementando significativamente las tasas de embarazo, reduciendo las tasas de aborto, y disminuyendo el tiempo necesario para lograr un embarazo con nacido vivo sano.

### PGT-m:

Es la evaluación de enfermedades génicas y de anomalías cromosómicas determinadas por anomalías en el cariotipo parental. Se evalúa el genotipo del embrión respecto a la presencia o no del alelo causante de una enfermedad específica o de la alteración cromosómica que presentan los progenitores. Permite seleccionar un embrión sano o portador no afectado antes de ser transferido al útero. Aproximadamente el 1% de los niños nacidos sufren algún tipo de grave enfermedad genética. Hoy se sabe que existen más de 5000 enfermedades con mutación conocida y la lista continúa ampliándose. Ejemplos de estas son la enfermedad de Gaucher, la distrofia muscular, la corea de Huntington, y otras, causantes de discapacidad y deterioro severo de la salud. En varios países incluidos Argentina, cuando una pareja tiene una enfermedad diagnosticada que puede transmitir a su descendencia es obligación de la clínica de reproducción asistida realizar el PGT-m.

### PGT-sr:

Es la evaluación que se realiza cuando uno de los progenitores presenta una alteración en la estructura de sus cromosomas. Con este análisis se detecta si la estructura de alguno o varios cromosomas esta alterada debido a la ruptura o a la unión incorrecta de segmentos cromosómicos.

### Pasos para realizar la técnica

- La mujer debe someterse a un tratamiento hormonal para estimular la ovulación.
- A continuación se extraen los óvulos en el quirófano y en el laboratorio se realiza la fecundación de los óvulos con los espermatozoides.
- Se desarrollan los embriones en cultivo
- Se obtienen células del embrión y se evalúa la constitución genética. Al transferir los embriones sanos la posibilidad de lograr un embarazo con un nacido vivo sano aumenta.

Las células para el análisis se obtienen haciendo un pequeño orificio mediante un Laser, sobre la zona pelúcida del embrión. Empleando una pipeta se aspiran las células para su posterior análisis.

Los embriones pueden ser transferidos en fresco (si la biopsia se realiza en el 3er día de su evolución y el resultado se obtiene en 48 hs o si se biopsia en el 5to día y el resultado se obtiene en 12 horas) o ser criopreservados a la espera del resultado del análisis genético, para luego transferir aquellos diagnosticados como libres de anomalías genéticas en un ciclo posterior.

### Resultados esperados

Embrión euploide: como resultado del análisis se determina que el embrión posee la conformación diploide normal de 23 pares de cromosomas. Es un embrión transferible.

Embrión aneuploide: se determina que el embrión posee algún/os cromosoma/s de más o de menos. Estos embriones se denominan anormales y no son transferibles.

Embrión no informativo: es un embrión cuyo resultado no se puede determinar debido a algún error o problema en la técnica del PGT. Esto puede deberse a la poca cantidad de ADN recolectado o alguna interferencia en el proceso de amplificación y lectura. Dado a este resultado no se puede decir si un embrión es euploide o aneuploide y queda a consideración del médico y de los pacientes la decisión de transferirlo.

Embrión mosaico: es un embrión que tiene mezcla de células euploides y aneuploides. Dependiendo del grado de mosaicismo queda a consideración del médico y los pacientes la decisión de transferirlo.

### Técnicas empleadas para la evaluación genética preimplantacional

La obtención del material genético puede realizarse en uno de los tres momentos siguientes:

1. Biopsia de cuerpo polar (biopsia del ovocito)

Permite diagnosticar las anomalías genéticas provenientes del ovocito, pero no permite detectar anomalías que suceden después de la fecundación ni las que provienen del espermatozoide. Dadas estas limitaciones, esta técnica ha sido prácticamente abandonada.

2. Biopsia de una blastómera

Esta técnica se realiza en un embrión ya fecundado con un número de células entre 6 y 8, al tercer día después de la fecundación. Consiste en extraer una célula de un embrión en desarrollo. La biopsia embrionaria no suele afectar a la estructura del embrión ni a su desarrollo cuando la realiza un operador con experiencia.

Esta técnica presenta la limitación de la extrapolación de los resultados de una sola célula a las restantes, de esta forma uno puede estar infiriendo un resultado que solo se da en una célula y en el resto no. Debido a esto esta técnica ha sido prácticamente abandonada.

3. Biopsia de tejido extraembrionario

Cuando los embriones llegan a la etapa de blastocito están formados por una capa externa de células (el trofotodermo) dentro de la cual hay una masa celular interna que dará origen al feto. En este caso las células se extraen del trofoblasto. Existe evidencia que demuestra que este tipo de

biopsia no afecta la viabilidad embrionaria. La biopsia en día 5 minimiza el riesgo de error diagnóstico por mosaicismo (ocurre cuando un embrión posee información genética distinta en diferentes células) ya que extrae entre 5 y 10 células. Dado estas ventajas hoy en día es la técnica de mayor aceptación en los laboratorios.

#### Técnicas a aplicar sobre el material biopsiado

Una vez realizada la biopsia existen distintas posibilidades de estudio:

- Fijar la/s célula/s o el corpúsculo polar y estudiar la conformación cromosómica mediante la técnica FISH (se evalúan solamente hasta 12 pares de cromosomas).
- Estudio mediante aCGH (array comparative genomic hybridization o hibridización genómica comparativa por arrays) (se evalúan 23 pares de cromosomas)
- Estudio mediante NGS (next genomic sequencing o secuenciación de nueva generación) (se evalúan 23 pares de cromosomas)
- Estudio mediante qPCR (se evalúan los 23 pares de cromosomas)
- Estudio mediante SNIPS (estudio mediante polimorfismos de base única) (se evalúan los 23 pares de cromosomas y permite evaluar al mismo tiempo anomalías génicas)
- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (permite el estudio de anomalías génicas para una enfermedad específica)

#### Algunas consideraciones con respecto a esta técnica

El PGT no corrige problemas ni mejora la calidad embrionaria. Se trata de un método de selección embrionaria.

Los beneficios de la utilización de estas técnicas son:

Cuando se aplica PGT-m por riesgo de una enfermedad génica específica, se evita su transmisión a la descendencia

Cuando se aplica PGT-a, se evita la transferencia y/o criopreservación de embriones anormales, aumentando la tasa de implantación y la tasa de embarazo por transferencia, se disminuye la tasa de aborto y disminuye la tasa de nacidos con anomalías cromosómicas. Así mismo se evita la pérdida de tiempo (por evitar transferencias de embriones que no tienen la capacidad de implantar o por disminuir la tasa de aborto). Este punto es de suma importancia en las pacientes de 35 años o más.

Uno de los fines del PGT es el deseo de evitar el nacimiento de niños con enfermedades genéticas. Se puede evitar el nacimiento de niños con enfermedades genéticas como la hemofilia y algunos tipos de cáncer, además de enfermedades cromosómicas como el síndrome de Down o la fibrosis quística simplemente seleccionando embriones en cuyo genotipo se haya comprobado que no portan la mutación correspondiente.

El seleccionar a los embriones más adecuados puede ayudar a mujeres de avanzada edad o con problemas de esterilidad a llevar un embarazo a término.

## **HIPOTESIS**

- Los embriones obtenidos a partir de fecundación *in vitro* convencional presentarán un mayor número de embriones no informativos y/o con mosaicismo debido a la interferencia del ADN de los espermatozoides eventualmente recolectados durante la biopsia.
- Los embriones obtenidos a partir de fecundación *in vitro* convencional tendrán una menor tasa de aneuploidías que los embriones producidos por la inyección citoplasmática de espermatozoides (ICSI).
- Los embriones de pacientes de edad reproductiva avanzada presentarán mayor tasa de aneuploidías al igual que los embriones de menor calidad.
- Los blastocistos obtenidos en día 5 de cultivo tendrán menor tasa de euploidia que aquellos obtenidos en día 6.

## **OBJETIVOS GENERALES**

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo estudiar la tasa de aneuploidía que presentan los embriones producidos en un programa de fecundación *in vitro*.

## Objetivos específicos:

- Determinar si es posible obtener resultados del PGT confiables a partir de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* convencional.
- Determinar si existen diferencias en la tasa de aneuploidías en los embriones obtenidos luego realizar la fecundación mediante la técnica de FIV convencional o de ICSI.
- Determinar si diferentes parámetros tienen un efecto sobre la tasa de aneuploidías de los embriones producidos *in vitro*

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 58 embriones de Día 5 y Día 6 de cultivo en el estadio de blastocisto expandido, provenientes de 21 pacientes (edad promedio  $39.2 \pm 5.3$ ; rango etario 27 a 45 años). Dichos embriones fueron obtenidos en tratamientos de fecundación *in vitro* que se realizaron en Medicina Reproductiva Fertilis entre los meses de agosto de 2019 y diciembre de 2019, en los cuales los pacientes decidieron realizar PGT-a a sus embriones.

El procedimiento se realizó siguiendo los siguientes pasos:

1. Los pacientes decidieron realizar un tratamiento de fecundación *in vitro*. En el momento de firmar el consentimiento de dicha práctica, expresaron su voluntad de realizar el PGT-a a sus embriones mediante la firma del consentimiento específico.
2. Estimulación ovárica y recolección de ovocitos:  
Todas las pacientes fueron estimuladas con FSH recombinante (Gonal-F, Merck-Serono, Alemania combinada con HMG (Menopur, Ferring, Suecia). Se administró una dosis inicial de 150 a 300 IU internacionales de gonadotropinas durante 5 días, ajustándola de acuerdo a la respuesta ovárica. Al alcanzar un diámetro folicular promedio de 14 mm o niveles de estrógenos de 300 pg/ml se administró una dosis diaria de antagonista de GnRh (Cetrorrelix, Cetrotide NR, Merck-Serono, Alemania) hasta el momento de la descarga, para lo cual se administró una dosis simple de 10.000 IU de HCG (Gonacor 5000, Ferring Pharmaceuticals, Suiza) 34-36 hs antes de la aspiración folicular. Dicha aspiración se realizó empleando una aguja de punción guiada por ecografía.

3. Fecundación *in vitro*.

Luego de recuperado los ovocitos se colocaron en la incubadora durante 4 horas, para luego realizar el procedimiento de fecundación mediante la técnica de FIV convencional (co-incubar ovocitos y espermatozoides durante 16 a 20 horas) o ICSI (inyectando un espermatozoide en el citoplasma del ovocito). En el día siguiente se constató la fecundación y aquellos ovocitos fecundados fueron cultivados hasta el Día 3 en medio G1 plus (Vitrolife, Suecia), luego de lo cual fueron colocados en medio G2 plus (Vitrolife, Suecia) hasta el día 5 de cultivo. El cultivo se llevó a cabo en incubadoras de mini volumen ESCO Miri, a 37°C, en 5% de oxígeno y 6% de dióxido de carbono. Los embriones de Día 5 y/o 6 fueron evaluados según el criterio de Estambul (Balaban y col; 2011), según esta clasificación al embrión se le otorga un valor numérico de acuerdo a la calidad de la masa celular interna y/o del trofotodermo. Así el valor 1 significa bueno, el valor 2 regular y el valor 3 malo. Los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto expandido fueron seleccionados para realizar el PGT-a.
4. Se realizó la biopsia de 5 a 8 células del trofoblasto del blastocisto empleando un láser (Lykos, Hamiltong Thorne, USA) para disolver la zona pelúcida y permitir de esta forma el ingreso de una pipeta especialmente diseñada para esta técnica (Blastomere Biopsy Pipette, Sunlight Medical, USA). Las células extraídas fueron colocadas en buffer de lisis para ser enviadas a la empresa Igenomix, quien estuvo a cargo de la evaluación luego de la amplificación por PCR y su análisis por NGS.
5. Los embriones a los que se les realizó la biopsia fueron criopreservados mediante vitrificación
6. Se recibieron los resultados enviados por Igenomix y se les comunicó a los pacientes la estrategia de transferencia a seguir, decidiendo la fecha de transferencia y que embrión se transferiría.
7. Transferencia embrionaria:

Los embriones fueron desvitrificados. Las transferencias se realizaron bajo control ecográfico transfiriendo 1 embrión por paciente empleando un catéter Rocket-EchoCath (Rocket Medical, England).
8. Luego de 14 días realizada la transferencia se realizó el análisis de la concentración de beta-HCG para determinar si hubo embarazo.
9. Luego de 30 días de la transferencia se realizó una ecografía para constatar la presencia de saco embrionario.
10. Se realizó el análisis estadístico.



Datos registrados:

Datos principales:

- Datos de los pacientes de la historia clínica
- Datos de la estimulación ovárica y obtención de ovocitos
- Tipo de fecundación *in vitro*
- Ovocitos fecundados y número de embriones en desarrollo
- Número de blastocistos expandidos a los que se les realizará la biopsia
- Resultados del PGT (embrión euploide, embrión aneuploide, embrión mosaico y embrión no informativo)

Datos complementarios:

- Embarazo
- Presencia de saco gestacional en la primera ecografía
- Evolución de la gestación en semana 12
- Nacimientos
- Semana de gestación
- Peso de los niños al nacer
- Anomalías congénitas de los niños nacidos

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó empleando el software GraphPad InStat 7 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). Se empleó el Test Exacto de Fisher y el Test de T según correspondiera. Valores de  $p < 0.05$  serán considerados significativos.

## RESULTADOS

A partir de los resultados del análisis del PGT no se registraron embriones no informativos ni mosaicos tanto de FIV convencional como de ICSI.

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos luego de la aspiración folicular de los 21 pacientes y la posterior fecundación de los ovocitos maduros.

Tabla 1. Resultados obtenidos en los 21 procedimientos de fecundación *in vitro*

Cantidad de casos	21
Promedio de edad femenina	38.2±5.3
Promedio de edad masculina	41.1±6.0
Promedio de procedimientos de FIV	1.7±1.4
Promedio de ovocitos totales obtenidos	9.2±3.8
Promedio de ovocitos maduros obtenidos	7.6±2.9
Tasa de fecundación	89.4% (143/160)
Blastocistos obtenidos	58
Promedio de blastocistos obtenidos	2.9±2.0

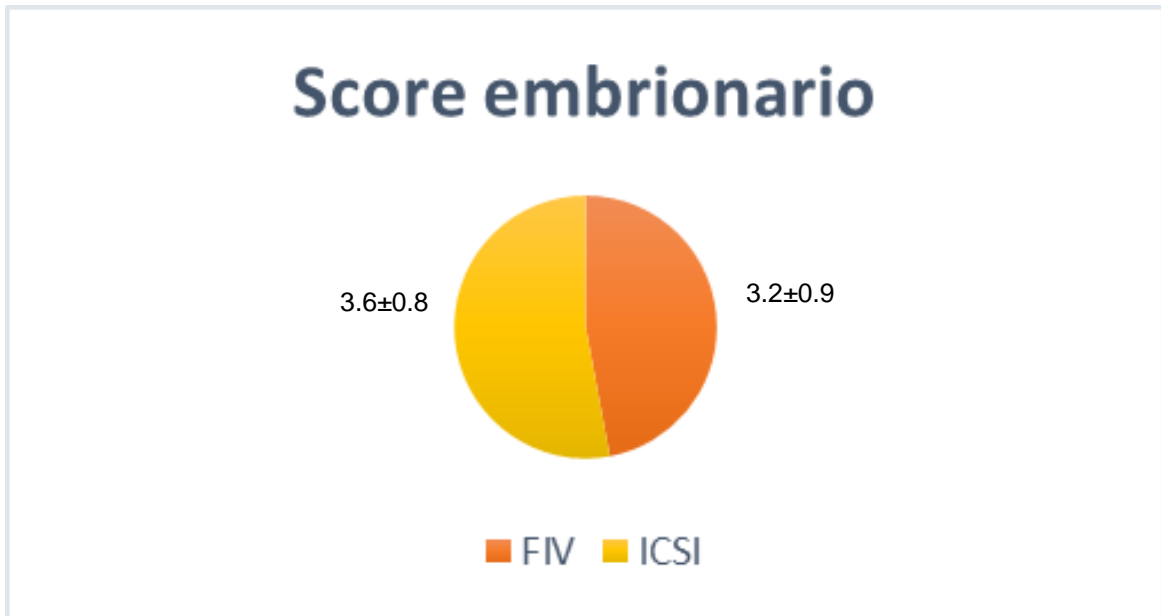
A continuación, se detalla la distribución de la calidad de los blastocistos expandidos según la clasificación embrionaria mediante el consenso de Estambul (Tabla 2)

Tabla 2.- Distribución de los blastocistos expandidos según su calidad.

Calidad embrionaria	Totales	FIV	ICSI
1.1	13	6	7
1.2	16	9	7
1.3	0	0	0
2.1	3	0	3
2.2	16	8	8
2.3	6	2	4
3.1	0	0	0
3.2	2	0	2
3.3	2	0	2
	58	25	33

Cuando se comparó el score embrionario a partir de la calidad de los blastocistos obtenidos luego de la fecundación *in vitro* realizada por FIV o ICSI no se encontraron diferencias significativas (FIV:  $3.2\pm 0.9$  vs ICSI:  $3.6\pm 0.8$ ; Gráfico 1).

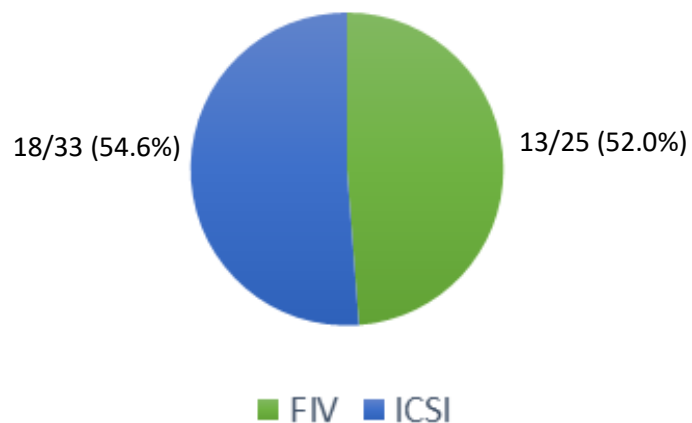
Gráfico 1.- Comparación del score embrionario obtenido a partir de la fecundación mediante FIV o ICSI



Cuando se comparó la tasa de euploidia de los embriones obtenidos a partir de la fecundación realizada por FIV o ICSI no se encontraron diferencias significativas (FIV: 52.0% vs ICSI: 54.6%; Gráfico 2).

Gráfico 2. Comparación de la tasa de euploidia de los embriones obtenidos a partir de la fecundación realizada por FIV o ICSI

## Euploidias entre FIV-ICSI



No se encontraron diferencias significativas al comparar la tasa de euploidia cuando se compararon los blastocistos obtenidos en Día 5 de cultivo con aquellos obtenidos en Día 6 (Día 5: 60.0% vs Día 6: 38.9%; Gráfico 3)

Gráfico 3. Comparación de la tasa de euploidía entre embriones obtenidos en Día 5 y Día 6 de cultivo

## Euploidia según día de biopsia



Cuando se comparó la tasa de euploidia según la calidad embrionaria no se encontraron diferencias significativas entre los embriones de buena calidad y de aquella de mala calidad (Tabla 3).

Tabla 3: Comparación de la tasa de euploidia según la calidad embrionaria

Clasificación embrionaria	Tasa de euploidía	Calidad embrionaria
1.1	9/13 (69.2%)	Buena
1.2	9/16 (56.3%)	
2.1	1/3 (33.3%)	
2.2	7/16 (43.8%)	Regular
2.3	2/6 (33.33%)	
3.2	2/2 (100%)	
3.3	1/2 (50%)	Mala

Al comparar en forma individual la calidad de la Masa Celular Interna (MCI) y la calidad del Trofoblasto según el criterio de Estambul no se encontraron diferencias significativas entre los embriones que tenían buena calidad y aquellos de mala calidad para estos parámetros (Tabla 4).

Tabla 4.- Comparación de la calidad de la masa celular interna y del trofoblasto

Calidad	MCI	Trofoblasto
1	18/29 (62.1%)	10/16 (62.5%)
2	10/25 (40.0%)	18/34 (52.9%)
3	3/4 (75.0%)	3/8 (37.5%)

Al comparar la tasa de euploidia según la edad femenina se encontraron diferencias significativas entre aquellas pacientes con edades  $\leq 30$  años (88.9%) y las pacientes de edad  $\geq 41$  años (26.7%), mientras que las pacientes en rango de edad 31 a 35 años (57.2%) y 36 a 40 años (55.5%) no mostraron una tasa de euploidia significativamente diferente al resto (Tabla 5). Por otra parte, cuando se comparó la tasa de euploidia según la edad masculina se encontraron diferencias significativas entre los varones de edad  $\leq 35$  años (66.6%) y aquellos de los rangos etarios de 41 a 45 años (30.0%) y de  $>45$  años (20.0%), mientras que el rango de edad de 36 a 40 años (78.1%) no fue significativamente diferente al resto (Tabla 6).

Tabla 5.- Comparación de la tasa de euploidia según la edad femenina.

<b>Edad femenina</b>	<b>Tasa de euploidia</b>
$\leq 30$	8/9 (88.9%) a
31-35	8/14 (57.2%) ab
36-40	11/20 (55.5%) ab
$\geq 41$	4/15 (26.7%) b

(a,b) valores con diferente letra difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

Tabla 6.- Comparación de la tasa de euploidia según la edad masculina.

<b>Edad masculina</b>	<b>Tasa de euploidia</b>
$\leq 35$	4/6 (66.6%) ab
36-40	23/32 (71.8%) a
41-45	3/10 (30.0%) b
$>45$	2/10 (20.0%) b

(a,b) valores con diferente letra difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

A continuación, se detallan los datos obstétricos obtenidos a partir de embriones euploides producidos mediante fecundación *in vitro* convencional e ICSI (Tabla 7)

Tabla 7. – Resultados obstétricos complementarios obtenidos en el estudio luego de la transferencia de embriones euploides.

Tipo de embrión transferido	ICSI	FIV
Cantidad de embriones transferidos por paciente	1	1
Número de transferencias realizadas	9	11
Tasa de embarazo	6/9 (67%)	7/11 (64%)
Tasa de embrión evolutivo en semana 12	5/9 (56%)	7/11 (64%)
Tasa de nacimientos	5/9 (56%)	7/11 (64%)
Semana de gestación	37.3±2.1	37.1±2.3
Peso promedio de nacimiento	2953±314	3015±421
Tasa de anomalías congénitas	0/9	0/11

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la tasa de aneuploidías presentes en embriones producidos en el programa de fecundación *in vitro* de Fertilis Medicina Reproductiva. Es sabido que una baja cantidad de embriones aneuploides logra realizar una correcta implantación en el útero (Fesahat y col., 2020), por ello se ha buscado durante mucho tiempo una herramienta para evaluar estas anomalías cromosómicas con el objetivo de minimizar el tiempo de espera de los pacientes para lograr el embarazo y/o evitar que, pese a ser una baja proporción, logren implantarse embriones con estas anomalías. Como se dijo en la introducción en la última década ha sido desarrollada una serie de técnicas de biología molecular que permiten analizar la composición cromosómica de las células embrionarias (Sedó, 2018). Entre estas técnicas la que ha cobrado mayor relevancia es la evaluación genética pre implantacional (PGT por sus siglas en ingles).

Hasta el presente los grupos de investigación que trabajaron en la técnica de PGT realizaron la fecundación de los ovocitos mediante la técnica de ICSI, pese que no había indicación en contra del uso de FIV para esta práctica, es por eso que en el presente trabajo se estudió la realización de PGT luego de la fecundación mediante FIV convencional y por otra parte la comparación de las tasas de aneuploidías entre ambas técnicas de fecundación.

Existen numerosos reportes que muestran que diferentes parámetros tales como la edad de los pacientes o la calidad embrionaria están relacionados con variaciones en las tasas de aneuploidía, es por eso que parte del diseño experimental planteado en la presente tesis se realizó con el objetivo de estudiar algunos parámetros claves tales como la edad de los pacientes y la calidad embrionaria (Chen HF y col; 2020).

Uno de los resultados más relevantes del presente estudio ha sido la confirmación de que se puede realizar el análisis cromosómico de los embriones desarrollados a partir de fecundación *in vitro* convencional. Esto fue confirmado a partir del hecho de no haber encontrado reportes de mosaicismo y/o embriones no informativos en el análisis de estos embriones. Quienes sostenía que esta técnica no se podía emplear lo hacían afirmando que al realizar el PCR amplificando el ADN embrionario también se amplificaría el ADN de algún espermatozoide remanente de la FIV unido a la zona pelúcida embrión y recogido durante la biopsia embrionaria, lo cual agregaría ADN extraembrionario arrojando resultados falsos. Mas aún, el haber obtenido 7 nacimientos de niños normales a partir de estos embriones muestra que los resultados son confiables.

La importancia de esta confirmación reside en que se logra una disminución de la complejidad en el trabajo en el laboratorio de fecundación *in vitro*, ya que, la técnica de ICSI es más laboriosa, y acarrea mayor gasto de insumos, una mayor tasa de degeneración de ovocitos luego de la fecundación debido a la inyección propiamente dicha y como producto de la manipulación realizada al tener que denudar los ovocitos e inyectarlos, una calidad embrionaria algo menor que los embriones obtenidos con la técnica de fecundación *in vitro* convencional (Ruhlmann y col; 2012). Este último factor redundante en una tasa de embarazo algo menor en aquellos embriones obtenidos a partir de fecundación mediante ICSI. Por último, la técnica de ICSI requiere de personal altamente entrenado para realizarla ya que implica una serie de pasos de gran precisión.

Cuando se analizó la tasa de aneuploidía según la calidad embrionaria no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los análisis, pese a ello, se pudo observar una tendencia hacia una mayor tasa de aneuploidía en los embriones de calidad pobre. Si bien esta tendencia no fue confirmada mediante una herramienta estadística es posible que el bajo número de embriones analizados haya tenido un efecto en el análisis. Se evaluó por separado la calidad de la masa celular interna y el trofoblasto, particularmente en el trofoblasto y se observó una marcada disminución en la tasa de euploidia junto con la disminución de la calidad embrionaria. Nuevamente si bien no se pudo comprobar con una herramienta estadística esta diferencia, muchos trabajos muestran que hay un alto correlato entre la tasa de implantación embrionaria y la calidad del trofoblasto, estos trabajos muestran que esa baja tasa de implantación correlaciona



con altas tasas de aneuploidías en el trofoblasto. De hecho, muchos trabajos muestran que una mala calidad de la masa celular interna tiene bajo impacto en la tasa de implantación en la medida que la calidad del trofoblasto sea buena.

Finalmente, la comparación de la tasa de euploidia con respecto a la edad de los pacientes coincide con hallazgos previos que muestran al igual que el presente trabajo que hay una disminución en la cantidad de embriones euploides con la edad (Dang y col; 2019). De hecho, hemos encontrado que solo uno de cada cuatro embriones obtenidos de pacientes de 41 años de edad o más es euploide. Lo mismo ocurre con los embriones producidos empleando espermatozoides de varones de 41 años o más. Este hallazgo es relevante ya que existe escasa bibliografía al respecto.

Es importante destacar que hasta el año 2019 y principios del año 2020 el análisis genético pre implantacional se ha realizado mediante la técnica invasiva descrita en la introducción. Esta técnica, como ya se ha dicho, implica realizar la extracción de entre 5 y 10 células de trofoblasto del embrión e implica aceptar que los resultados obtenidos a partir del trofoblasto se correlacionan de forma directa con los de la masa celular interna. Recientemente se ha empezado a utilizar una técnica novedosa la cual implica tomar del medio de cultivo en el cual el embrión se ha desarrollado hasta el día 5 o 6 y amplificar el ADN embrionario presente en el mismo. A priori se pueden identificar 2 ventajas muy importantes de esta técnica que son: no se necesita dañar al embrión realizando la extracción de blastómeras mediante una biopsia y por otra parte, el ADN presente en el medio de cultivo es representativo de todo el embrión y no solo del trofoblasto. Esto último es muy importante ya que, pese a no haber encontrado embriones con mosaicismo en esta tesis, la presencia del mismo es frecuente en los informes de los análisis de PGT invasivo.

El mosaicismo presenta un problema a la hora de decidir la transferencia o no de un embrión ya que se ha visto que embriones con bajo porcentaje de mosaicismo logran implantarse y generar un embarazo normal el cual llegará a término sin complicaciones con el nacimiento de un niño sano. Esto claramente muestra que no todos los mosaicismos del trofoblasto correlacionan con mosaicos de la masa celular interna. Es por eso que hoy las guías internacionales aconsejan la transferencia de embriones mosaicos de bajo grado (ASRM., 2020).

Actualmente nos encontramos realizando como extensión de esta tesis el mismo análisis en cuanto a comparación de técnicas de fecundación, calidad embrionaria y edad de los pacientes sobre esta nueva técnica denominada PGT no invasivo.

## CONCLUSIONES

Como conclusiones podemos decir que:

- Hemos demostrado que se puede realizar la evaluación genética preimplantacional PGT en embriones obtenidos a partir de la técnica de fecundación *in vitro* convencional.
- Hemos confirmado que hay un aumento de las aneuploidías correlacionado con el aumento de la edad reproductiva de los pacientes tanto femeninos como masculinos.
- Si bien no fue confirmado de forma estadística observamos una tendencia en el aumento de aneuploidía de embriones de calidad pobre y en los blastocistos obtenidos en día 6.

*No duermas para descansar, duerme para soñar. Porque los sueños están  
para cumplirse. - Walt Disney*

## BIBLIOGRAFÍA

- A S, V., Dhama, K., Chakraborty, S., Samad, H. A., Latheef, S. K., Sharun, K., Khurana, S. K., K, A., Tiwari, R., Bhatt, P., K, V., & Chaicumpa, W. (2019). Role of Antisperm Antibodies in Infertility, Pregnancy, and Potential for Contraceptive and Antifertility Vaccine Designs: Research Progress and Pioneering Vision. *Vaccines*, 7(3), 116.
- Abeyta M, B. B. (2014). Morphological assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med.*, 32(2):114-126. .
- Acosta, A. O. (1991). Possible role of pure human follicle-stimulating hormone in the treatment of severe male-factor infertility by assisted reproduction: preliminary report. *Fertility and Sterility* n°55, 1150-1156.
- Adamson GD, d. M. (2018). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology. *Fertil Steril.*, 2018;110(6):1067-1080.
- Armstrong S, B. P. (2018). Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. . *Cochrane Database Syst Rev.* , 5(5):CD011320.
- asrm@asrm.org., P. C. (2020). Clinical management of mosaic results from preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) of blastocysts: a committee opinion. *Fertil Steril.*, 114(2):246-254. .
- Balaban B, B. D. (2011). Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, 26 1270–1283.
- Benacerraf B. R. (2019). Three-Dimensional Volume Imaging in Gynecology. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 46(4), 755–781.  
<https://doi.org/10.1016/j.ogc.2019.07.008>
- Bisioli C, M. A. (2002). Calidad embrionaria: Podemos mejorarla? El punto de vista del laboratorio. *Reproduccion Humana*, 2: 26-36.
- Bracewell-Milnes T, S. S. (2017). Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review. *Hum Reprod Update.*, 23(6):723-736.
- C Ruhlmann, C. B. (2012). Conventional IVF vs ICSI in patients with normal or mild teratozoospermic semen samples: an study done using sybling oocytes. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, 16: 239-242.
- Capalbo A, H. E. (2017). Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Hum Reprod Update.*, 23(6):706-722. .
- Chen HF, C. M. (2020). An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs. *Taiwan J Obstet Gynecol.*, 59(4):489-495. .
- Colaco S, S. D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet*, 35:1953-68.
- Cornelisse S, Z. M. (2020). Preimplantation genetic testing for aneuploidies (abnormal number of chromosomes) in in vitro fertilisation. . *Cochrane Database Syst Rev.* .
- Curry, A. W. (2019). Pelvic Inflammatory Disease: Diagnosis, Management, and Prevention. . *American family physician*, 100(6), 357–364.

- Dang TT, P. T. (2019). Preimplantation Genetic Testing of Aneuploidy by Next Generation Sequencing: Association of Maternal Age and Chromosomal Abnormalities of Blastocyst. *Open Access Maced J Med Sci.* , 7(24):4427-4431.
- Dubuisson JB, A. F. (1990). Reproductive outcome after laparoscopic salpingectomy for tubal pregnancy. *Fertil Steril.*, 53(6):1004-1007.
- Elder, K. D. (2011). In Vitro Fertilization, ed. *Cambridge Medicine. Tercera edición*, 127.
- Esfandiari N, G. A. (2020). Mouse embryo assay for human in vitro fertilization quality control: a fresh look. *J Assist Reprod Genet.*, 37(5):1123-1127.
- Fan Y, L. Y. (2010). A modified culture medium increases blastocyst formation and the efficiency of human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. *J Reprod Dev.*, 56(5):533-539.
- Fesahat F, M. F. (2020). Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* , 49(5):101723. .
- Freytag, D. M. (2020). Uterine anomalies and endometriosis. *Minerva medica*, 111(1), 33–49.
- Fujimoto VY, B. R. (2019). Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertil Steril.*, 95(4):1197-1204.
- Gallego RD, R. J. (2019). Time-lapse imaging: the state of the art†. *Biol Reprod*, 101(6):1146-1154.
- Gardner DK, B. B. (2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important?. *Mol Hum Reprod.* , 22(10):704-718.
- Gardner DK, K. T. (2020). Prospective randomized multicentre comparison on sibling oocytes comparing G-Series media system with antioxidants versus standard G-Series media system. *Reprod Biomed Online.* , 40(5):637-644. .
- Grasso E., G. S. (2018). Impact of the Reticular Stress and Unfolded Protein Response on the inflammatory response in endometrial stromal cells. *Sci Rep*, 16:12274.
- Holesh, J. E. (2020). Physiology, Ovulation. In StatPearls. *StatPearls Publishing*.
- Huhman, H. R. (2018, November 6). *The History of IVF: From Folklore to Technological Marvel*. Retrieved from <https://www.volusonclub.net/empowered-womens-health/the-history-of-ivf-from-folklore-to-technological-marvel/>
- Jedidi, I. O. (2019). Sex chromosomes-linked single-gene disorders involved in human infertility. *European journal of medical genetics*, 62(9), 103560.
- Jirasek, J. E. (2001). An Atlas of the Human Embryo and Fetus. A Photographic Review of Human Prenatal Development. The Encyclopedia of Visual Medicine Series. *New York and London: The Parthenon Publishing Group*, 27-29.
- Kemper JM, V. B. (2019). Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy: A Review. *Obstet Gynecol Surv.*, 74(12):727-737. .
- Knobil, N. J. (2005). Physiology of Reproduction. . *Academic Press, Elsevier. Tercera edición*, 1, 3-54.
- Lania, A. G. (2019). Functional hypothalamic and drug-induced amenorrhea: an overview. *Journal of endocrinological investigation*, 42(9), 1001–1010.

- McCollin A, S. R. (2020). Abnormal cleavage and developmental arrest of human preimplantation embryos in vitro. *Eur J Med Genet.*, 63(2):103651.
- McGowen, M. R. (2014). The evolution of embryo implantation. *The International journal of developmental biology*, 58(2-4), 155–161. .
- Mihajlović AI, F. G. (2018). Segregating Chromosomes in the Mammalian Oocyte. *Curr Biol*, 28(16):R895-R907.
- Morente, C. H. (2013). RAFA: Registro Argentino de Fertilización Asistida 2004-2010. *Rev. Reproducción (SAMER)*, 28:42-55.
- Mouzon J, C. G.-H. (2020). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology. *Hum Reprod.*, 35(8):1900-1913.
- Munné S, K. B. (2019). Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril.*, 112(6):1071-1079.e7.
- Nagaoka SI, H. T. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. . *Nat Rev Genet*, 13(7):493-504.
- Reignier A, L. J. (2018). Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reprod Biomed Online*, 36(4):380-387. .
- Rey Valzacchi, G. (2013). Conceptos actuales de genética e infertilidad masculina. Enfoque práctico para el médico reproductólogo. *Procreate. Red de Medicina Reproductiva y Molecular. Rev. Reproducción (SAMER)*, 28: 127-136.
- Romanski PA, J. K. (2019). Women's health providers' perspectives on preimplantation genetic testing. . *Reprod Biomed Online*. , 39(3):530-537. .
- Sanchez-Garrido, M. A.-S. (2020). Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome: Pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies. *Molecular metabolism*, 35, 100937.
- Sedó, C. Á. (2018). Estudio Genético Pre-implantatorio para. *Reproducción* , 33:21-43.
- Shindel A. W. (2019). Anejaculation: Relevance to Sexual Enjoyment in Men and Women. *The journal of sexual medicine*, 16(9), 1324–1327.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2019.07.002>
- Somigliana, E. P. (2016). Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma. *Human reproduction (Oxford, England)*, 31(7), 1390–1396. .
- Thibault, C. L. (1993). Reproduction in mammals and man. *Ellipses*, 800.
- Thompson JG, B. H.-M. (2016). Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reprod Fertil Dev.*, 28(1-2):41-50. .
- Vermeij, B. G. (2019). Is there an association between oocyte number and embryo quality? A systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*, 39(5), 751–763.
- Wijayarathna, R. &. (2019). Activins, follistatin and immunoregulation in the epididymis. . *Andrology*, 7(5), 703–711.
- Wilkinson J, M. P. (2019). Do à la carte menus serve infertility patients? The ethics and regulation of in vitro fertility add-ons. *Fertil Steril.*, 112(6):973-977.



## APENDICE

Tabla 1.- Datos obtenidos a partir de la aspiración folicular de cada caso de PGT iniciado (los nombres de los pacientes permanecen en anonimato por confidencialidad)

Casos iniciados	Pin	Edad Mujeres	Edad Varones	Nº de procedimientos
1	#PGT00119	40	55	2
2	#PGT00219	39	40	1
3	#PGT00220	36	37	3
4	#PGT00319	43	46	1
5	#PGT00320	35	34	2
6	#PGT00420	37	37	1
7	#PGT00519	37	38	1
8	#PGT00520	33	43	1
9	#PGT00619	37	38	2
10	#PGT00620	45	48	7
11	#PGT00719	43	42	2
12	#PGT00720	42	44	1
13	#PGT00820	45	52	2
14	#PGT00919	29	38	1
15	#PGT00920	40	39	1
16	#PGT01019	42	41	1
17	#PGT01119	30	45	1
18	#PGT01219	27	40	1
19	#PGT01319	35	36	2
20	#PGT01419	44	28	1
		<b>38.0±5.3</b>	<b>41.1±6.2</b>	<b>1.7±1.4</b>

Nº de ovocitos totales	Nº de M2 obtenidos	Tasa de fecundación	Nº de blastocisto obtenidos
6	6	5	2
12	9	9	6
9	6	6	2
9	9	8	5
8	5	4	5
8	8	8	5
4	4	3	1
9	8	7	3
12	8	8	3
5	5	4	2
7	6	6	2
6	4	2	1
8	8	8	1
7	7	7	7
15	9	9	1
7	5	4	3
16	13	13	1
15	13	10	1
17	14	11	6
7	7	5	1
<b>9.4±3.8</b>	<b>7.7±2.9</b>	<b>89.0%</b>	<b>2.9±2.0</b>
		137/154	58



Tabla 2.- Resultados de los informes de PGT de cada paciente

#	Edad Varones	Día	Calidad embrionaria	Resultado	Sexo	Tipo de aneuploidía	Tranfer	Embarazo	Aborto	Eco sem 12
1	40	5	1.1	Euploide	Femenino	-		Bioquimico	-	-
2	40	5	1.1	Euploide	Masculino	-				
3	40	6	1.1	Aneuploide	Femenino	-18				
4	40	6	1.2	Euploide	Femenino	-				
5	40	6	2.2	Aneuploide	Masculino	: -16, -21				
6	40	6	2.2	Aneuploide	Femenino	-6				
7	55	5	1.1	Aneuploide	-	Caótico	-	-	-	-
8	55	6	1.2	Aneuploide	Masculino	: -7p, +8q, 22	-	-	-	-
9	46	5	1.1	Euploide	Masculino	-		1019	Aborto semana 6	1
10	46	6	1.2	Aneuploide	Femenino	: -10, +22				
11	46	5	1.2	Euploide	Masculino	-				
12	46	5	2.1	Aneuploide	Masculino	-14				
13	46	5	2.1	Aneuploide	Masculino	: +2p, +14, +22				
14	38	6	2.3	Euploide	Femenino	-				
15	38	5	1.1	Euploide	Femenino	-				
16	38	6	1.2	Euploide	Femenino	-				
17	38	6	1.2	Aneuploide	Masculino	-		1425	-	1
18	42	5	1.1	Euploide	Femenino	-		Negativo	-	-
19	42	5	1.2	Aneuploide	Femenino	-22				
20	40	6	2.2	Euploide	Femenino	-		267	-	1
21	41	5	1.1	Aneuploide	Femenino	-11				
22	41	5	1.1	Euploide	Masculino	-		568	-	1
23	41	5	1.1	Aneuploide	Masculino	: +4, +9, -18, +21				
24	38	5	1.1	Euploide	Masculino	-	Embarazo espontaneo	1	-	21/11/2019
25	38	5	1.2	Euploide	Masculino	-				
26	38	5	2.2	Euploide	Femenino	-				
27	38	5	2.1	Euploide	Masculino	-				
28	38	5	2.2	Aneuploide	Masculino	: +1q				
29	38	5	3.2	Euploide	Femenino	-				
30	38	6	3.2	Euploide	Masculino	-				
31	45	5	1.2	Euploide	Femenino	-				
32	28	6	2.2	Aneuploide	Femenino	: +2, -10, -18	-	-	-	-
33	36	5	1.1	Euploide	Femenino	-				
34	36	5	1.2	Aneuploide	-	X0				
35	36	5	2.2	Euploide	Masculino	-				
36	36	5	2.2	Euploide	Femenino	-				
37	36	5	2.2	Euploide	Femenino	-				
38	36	5	2.3	Aneuploide	Femenino	: -16, -22				
39	34	5	1.2	Euploide	Femenino	-		Si	-	
40	34	5	2.3	Euploide	Masculino	-				
41	34	6	2.3	Aneuploide	Femenino	-2				
42	34	6	3.3	Euploide	Masculino	-				
43	34	6	2.2	Euploide	Femenino	-				
44	37	5	2.2	Aneuploide	Masculino	-22				
45	37	5	2.2	Euploide	Masculino	-				
46	37	5	1.2	Euploide	Femenino	-				
47	37	5	1.1	Euploide	Femenino	-				
48	37	5	2.2	Aneuploide	Femenino	: -14, -20				
49	37	5	1.2	Euploide	Femenino	-				
50	37	5	1.2	Euploide	Femenino	-				
51	43	5	2.2	Aneuploide	Femenino	: +8p, -18p				
52	43	5	2.2	Aneuploide	Femenino	: +8p, -18p				
53	43	5	1.2	Aneuploide	Femenino	: +8p, -18p	-	-	-	-
54	48	5	1.2	Aneuploide	Femenino	-22				
55	48	6	3.3	Aneuploide	-	: -20, X0	-	-	-	-
56	52	6	2.3	Aneuploide	Masculino	: +8, -10, +15, -21	-	-	-	-
57	39	5	2.3	Aneuploide	Masculino	: +16				
58	44	6	2.2	Aneuploide	Femenino	-2	-	-	-	-