

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**SCREENING GENÉTICO PREIMPLANTACIÓN,
REVISIÓN CLÍNICA EN PACIENTES CON FISH
DE ESPERMATOZOIDES ALTERADO**



Autor: Miguel Ángel Arenas Conde

Tutores: Dr. Antonio Urbano Carrillo y Dra. Isabel Ochando Sánchez

Unidad de Genética y Reproducción del Hospital HLA Vistahermosa

Facultad de ciencias experimentales-Área de Biología Celular

Universidad Miguel Hernández-Elche

Curso académico 2017/18

DECLARACIÓN DE LOS TUTORES

Dña. Isabel Ochando Sánchez, profesora asociada del departamento de Histología y Biología Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y facultativa de la Unidad de Genética del Hospital HLA Vistahermosa y D. Antonio Urbano Carrillo facultativo de la Unidad de Genética del Hospital HLA Vistahermosa.

CERTIFICAN

Que D. Miguel Ángel Arenas Conde, estudiante de cuarto curso del Grado de Biotecnología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “SCREENING GENÉTICO PREIMPLANTACIÓN, REVISIÓN CLÍNICA EN PACIENTES CON FISH DE ESPERMATOZOIDES ALTERADO” incluido en la memoria de este Trabajo Fin de Grado. El presente trabajo se ha llevado a cabo en la Unidad de Genética del Hospital HLA Vistahermosa.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman la presente certificación.

En Alicante, Junio de 2018

Fdo. Isabel Ochando



Fdo. Antonio Urbano



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer este TFG a todos los profesionales que trabajan en la Unidad de Genética y Reproducción del Hospital HLA Vista Hermosa, ellos me han permitido desarrollar este trabajo aportando todo cuanto han podido. En especial, agradecer al laboratorio de genética los tres meses que pasé con ellos, he aprendido mucho de todos, aunque sin duda me quedo con que un trabajo es más fácil cuando estás rodeado de personas maravillosas, como lo son mis dos tutores, Antonio e Isabel a los cuales admiro y recordaré para siempre.

Por otro lado, quiero agradecerlo a mi pareja, mi compañera de vida. Gracias Cristina por soportar mi estrés y mis nervios durante estos cuatro años de grado. Estoy seguro que podré agradecerte dentro de un año el TFM.

Por último y no por ello menos importante, me gustaría agradecerlo a mi familia, sin duda el mayor apoyo que he tenido. Gracias a mis abuelos, a mi hermano, a mi padre y, lo siento papá, pero en especial gracias a mi madre, por ser la mejor persona que conozco, eres mi ídolo.

ÍNDICE DE MATERIA

| | |
|--|----|
| 1. ABREVIATURAS..... | 3 |
| 2. RESUMEN | 4 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 4. ANTECEDENTES | 8 |
| 5. OBJETIVOS | 8 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 9 |
| 6.1. Pacientes..... | 9 |
| 6.2. Técnicas | 10 |
| 6.2.1. FISH de espermatozoides..... | 10 |
| 6.2.2. Screening genético preimplantación mediante aCGH..... | 11 |
| 6.3. Análisis estadístico..... | 12 |
| 7. RESULTADOS..... | 13 |
| 7.1. Evaluación de la ploidía de los embriones mediante SGP..... | 13 |
| 7.2. Evaluación de la tasa de embarazo por transferencia | 16 |
| 8. DISCUSIÓN | 19 |
| 8.1. Evaluación de la ploidía de los embriones | 19 |
| 8.2. Evaluación de la tasa de embarazo por transferencia | 22 |
| 9. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA | 25 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 26 |
| 11. WEBGRAFÍA | 32 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Resultado del análisis de embriones por SGP..... | 13 |
| Tabla 2: Análisis estadístico comparando los resultados de las diferentes indicaciones clínicas: FISH de espermatozoides alterado, edad materna avanzada, translocación y grupo control A..... | 15 |
| Tabla 3: Análisis estadístico comparando los resultados de FISH de espermatozoides alterado y el grupo control A..... | 16 |
| Tabla 4: Resultado de la tasa de embarazo/ transferencia..... | 17 |
| Tabla 5: Análisis estadístico de la tasa de embarazo entre el grupo de estudio y el grupo control B..... | 18 |
| Tabla 6: Resultados del análisis de embriones de nuestro estudio comparados con otros revisados de la bibliografía..... | 21 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Resultado del análisis de embriones por SGP..... | 14 |
| Figura 2: Porcentaje de embriones aneuploides según la indicación clínica..... | 14 |
| Figura 3: Porcentaje de la tasa de embarazo por transferencia..... | 17 |
| Figura 4: Tipos de mosaicismo..... | 24 |

1. ABREVIATURAS

α : Nivel de significación.

μ l: microlitros.

aCGH: array CGH.

CGH: del inglés Comparative Genomic Hybridization (Hibridación Genómica Comparativa).

DAPI: 4 ,6-diamino-2-fenilindol.

DDT: ditiotreitól.

Dr: Doctor.

Dra: Doctora.

FISH: del inglés fluorescence in vitro hybridization (Hibridación fluorescente in vitro).

FSH: del inglés follicle-stimulating hormone (Hormona folículo estimulante).

FIV: fecundación in vitro.

ICE: del inglés interchromosomal effect (Efecto intercromosómico).

ICM: del inglés inner cell mass (masa celular interna).

ICSI: del inglés intracytoplasmic sperm injection (inyección intracitoplasmática de espermatozoides).

Ha: Hipótesis alternativa.

H₀: Hipótesis nula.

ml: mililitros.

NP-40: Nonidet P-40.

Núm: número.

SGP: screening genético preimplantación.

SSC: del inglés saline-sodium citrate (sal de citrato de sodio).

TE: Trofoectodermo.

TFG: Trabajo de Fin de Grado.

TRA: técnicas de reproducción asistida.

2. RESUMEN

Este trabajo de fin de grado, consiste en una revisión bibliográfica del screening genético preimplantación (SGP) en pacientes de la Unidad de Genética y Reproducción del Hospital HLA Vista Hermosa con factor masculino severo revelado por un análisis de FISH de espermatozoides alterado. El objetivo de esta revisión es analizar la utilidad del SGP en los tratamientos de reproducción asistida; para ello, se ha estudiado la ploidía de los embriones producidos por estos pacientes y se ha medido el impacto del SGP sobre la tasa de embarazo. Los resultados confirman que el porcentaje de embriones aneuploides depende de la indicación de cada paciente y además es mayor en nuestro grupo de estudio que en la población general; sin embargo, no se ha conseguido aumentar la tasa de embarazo en nuestro grupo de estudio con respecto al grupo control. Finalmente, hemos determinado proyecciones futuras que permitan ofrecer un mejor asesoramiento a los pacientes.

Palabras clave: FISH de espermatozoides, screening genético preimplantación, aneuploidía, embrión, infertilidad, aCGH.

ABSTRACT

This final degree project consists of a bibliographic review of the preimplantation genetic screening (PGS) in patients of the Unidad de Genética y Reproducción of the Hospital HLA Vista Hermosa with a severe male factor revealed by an altered sperm FISH analysis. The objective of this review is to analyse the utility of PGS in assisted reproduction treatments, and for this purpose, we have studied the embryos ploidy produced by these patients and we have also studied the impact of PGS on pregnancy rate. The results confirm that the percentage of aneuploidy embryos depends on the indication of each patient and it is also higher in our study group than in the general population; however, it has not been possible to increase the pregnancy rate in our study group respect to the control group. Finally, we have determined future projections that allow us to offer better advice to patients.

Keywords: sperm FISH, preimplantation genetic screening, aneuploidy, embryo, infertility, aCGH.

3. INTRODUCCIÓN

La infertilidad es una enfermedad que se caracteriza por la imposibilidad de darse un embarazo clínico tras doce meses de relaciones sexuales regulares y sin protección (1). Actualmente, más de 186 millones de personas sufren esta enfermedad (2), estimándose que afecta al 8-12% de las parejas en edad reproductiva en todo el mundo (3).

El factor masculino contribuye en el 50% de los casos de infertilidad, siendo el único responsable del 20-30% de casos totales (4). Las anomalías genéticas del espermatozoides son comunes y se reconocen como indicadores de la infertilidad masculina (5)(6), de hecho se ha determinado que los gametos de pacientes infértiles muestran una mayor tasa de anomalías cromosómicas que en los de la población general (7). Las aneuploidías son las anormalidades cromosómicas más frecuentes en humanos y se detectan en el 35% de los abortos espontáneos, el 4% de los nacidos muertos y el 0,3% de los nacidos vivos (8).

En hombres portadores de anomalías cromosómicas sexuales numéricas se ha visto aumentada la disomía sexual en sus espermatozoides, debido a que se crea un microambiente testicular anormal relacionado con un aumento de la hormona folículo estimulante (FSH) que afecta a la segregación cromosómica de los espermatozoides que producen. Además, en hombres que poseen anomalías cromosómicas estructurales como inversiones y/o translocaciones puede darse el efecto intercromosómico (ICE) y afectar a otros cromosomas provocando errores en la producción de gametos (9). En ambos casos hay un mayor riesgo de producir espermatozoides cromosómicamente desequilibrados y de padecer problemas de fertilidad debido a que se produce generalmente una meiosis anómala (10)(11)(12), donde es especialmente sensible la etapa de paquitenio (9). Por tanto, el estudio del cariotipo se incluye en la evaluación clínica básica de los estudios de fertilidad.

Por otro lado, varios estudios demuestran una relación entre la infertilidad masculina, la calidad del semen y el aumento de la presencia de aneuploidías en los espermatozoides (13)(14)(15)(16); sin embargo, no está bien establecido cuál de los tres parámetros que se estudian en un seminograma (número, motilidad y morfología) está relacionado en mayor medida con la tasa de aneuploidías, ya que en muchas ocasiones aparecen dos e incluso los tres parámetros combinados. Aun así de estos tres está muy clara la relación existente entre la tasa de aneuploidías y un bajo conteo de espermatozoides

(oligozoospermia) (17)(18)(19), esto se puede explicar sabiendo que en la espermatogénesis existen diferentes puntos de control que tienen como objetivo detener a las células con anomalías cromosómicas lo que supondría una menor producción de gametos. En cuanto a la morfología, hay estudios que describen que en los espermatozoides morfológicamente anormales la tasa de aneuploidías es mayor (28)(29); sin embargo, también se ve reflejado en otros estudios que los espermatozoides con unas dimensiones y forma normal, pueden presentar aneuploidías (30); por lo tanto, la selección de espermatozoides basada en morfología no sería fiable como tampoco lo es la relación con la motilidad la cual resulta ser controvertida habiendo artículos que la confirman y otros que la desacreditan.

Por estos motivos, tanto en pacientes con cariotipo alterado y/o con seminograma alterado es importante llevar a cabo un análisis de espermatozoides mediante técnicas como la hibridación fluorescente in vitro (FISH), la cual también está indicada cuando existen fallos previos de implantación y/o abortos de repetición. Esta técnica nos permite marcar una serie de cromosomas mediante sondas fluorescentes, determinar el número de cada uno de ellos y de esta forma estudiar la posible presencia de aneuploidías en los gametos. Por último, también hay pacientes con normozoospermia y cariotipo normal que producen un mayor número de espermatozoides anormales durante la espermatogénesis que la población general; la explicación para estos casos probablemente también reside en que poseen una meiosis anómala, por ejemplo algún fallo en los mecanismos de control, como la no identificación de células anormales, fallos en la eliminación de éstas o simplemente que el número de células anormales sea demasiado alto para que sean eliminadas por completo.

La capacidad de los espermatozoides aneuploides para fertilizar ovocitos está demostrada (20)(21) y esta fertilización se relaciona con abortos espontáneos (22)(23)(24)(25) y fracasos repetitivos de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)(26), debido a que estas anomalías presentes en los espermatozoides tienen un efecto directo sobre la constitución cromosómica de los embriones y que además parece variar según el tipo de anomalía que posea el esperma (27); también existe la posibilidad de que se dé una descendencia anormal por ejemplo niños con síndrome de Down o Klinefelter entre otros. Para determinar qué embriones tienen mayor calidad tenemos técnicas invasivas y otras que no lo son. Estudiar la morfología de los embriones es una técnica no invasiva, el problema de ésta es que muchos de los embriones que tienen

una morfología correcta son aneuploides y por tanto su potencial de implantación disminuye, además existe una gran subjetividad en la selección, que se acentúa sabiendo que la apariencia de estos cambia rápidamente en los primeros días de desarrollo (31). Por otro lado, el uso de técnicas invasivas como el SGP lleva a cabo un análisis más eficaz que el anterior ya que hay técnicas que permiten estudiar los 23 pares de cromosomas antes de la selección y transferencia del embrión. El SGP empezó a utilizarse en 1990 para seleccionar embriones femeninos con el fin de prevenir el nacimiento de niños con enfermedades ligadas al cromosoma X (32). En la actualidad esta técnica ha evolucionado hacia 3 ramas: selección de embriones sanos procedentes de parejas con alguna enfermedad genética, selección de embriones histológicamente compatibles y por último, la selección de embriones euploides que aumenten las tasas de éxito en las técnicas de reproducción asistida (TRA). Las principales indicaciones para realizar este screening incluyen edad materna avanzada, fallos repetidos de implantación, abortos involuntarios recurrentes y el factor masculino severo.

Entre las diferentes indicaciones mencionadas anteriormente, la edad materna avanzada está confirmada por muchos estudios (33)(34)(35)(36) como la que más claramente se beneficia de esta técnica, de hecho en esos estudios se aumentó la tasa de embarazo tras aplicar el SGP con respecto a un grupo control; también están confirmados los beneficios de la aplicación del SGP en las indicaciones de fallos repetidos de implantación (37)(38) y los abortos recurrentes (39) como motivos para realizar un SGP. Sin embargo, el factor masculino severo no ha sido ampliamente estudiado, además hay estudios que directamente obvian esta indicación (40). El motivo de esto podría ser que la infertilidad masculina sigue siendo un tema tabú, de hecho se prevé que aproximadamente el 27% de los hombres infértiles nunca serán evaluados; también hay numerosos estudios que informan de que las mujeres a menudo son culpadas de infértiles incluso cuando el problema lo tiene su pareja (41)(42), a pesar de que como ya dijimos el factor masculino afecta a la mitad de los casos de infertilidad. Sin embargo, este pensamiento está cambiando y cada vez más se está reconociendo la infertilidad masculina (2), por este motivo intentaremos demostrar que un diagnóstico de FISH de espermatozoides alterado que revela un caso de factor masculino severo, debe considerarse como una indicación que se podría beneficiar del uso de SGP.

4. ANTECEDENTES

El SGP, es una técnica que empezó a utilizarse en 1990 para seleccionar embriones femeninos con el fin de prevenir el nacimiento de niños con enfermedades ligadas al cromosoma X. En la actualidad tiene como objetivo aumentar la tasa de embarazo ya que nos permitirá seleccionar aquellos embriones euploides y por tanto con más capacidad para implantar. Anteriormente se realizaba el screening mediante la técnica de FISH que permitía estudiar un número limitado de cromosomas, por lo tanto, un embrión analizado por FISH y que no presentara ninguna alteración en los cromosomas estudiados no significaba que no pudiera tener alterado un cromosoma no estudiado. Estas limitaciones quedan resueltas con el uso de otras técnicas como aCGH (array Comparative Genomic Hybridization), SNP (Single nucleotide polymorphism) o NGS (Next generation sequencing) ya que nos permiten analizar los 22 cromosomas autosómicos y los sexuales.

La Unidad de Genética y Reproducción del Hospital HLA Vista Hermosa empezó a realizar el SGP mediante aCGH en 2012, desde entonces el número de pacientes que han decidido analizar sus embriones por SGP ha aumentado anualmente. De estos pacientes, la indicación de FISH de espermatozoides alterado que revela un diagnóstico de factor masculino severo es numerosa; de hecho desde 2014, 79 de los 118 casos totales se deben a esta indicación. Por este motivo, consideramos hacer esta revisión clínica con el fin de obtener conclusiones que puedan ayudar en el asesoramiento a los pacientes con este tipo de indicación clínica.

5. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es intentar demostrar que el factor masculino severo revelado por un FISH de espermatozoides alterado es una indicación para realizar un SGP; para conseguirlo se intentará confirmar:

- Un FISH de espermatozoides alterado está relacionado con una mayor tasa de embriones aneuploides.
- La combinación de FISH+SGP aumenta la tasa de embarazo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Pacientes

Se trataron 118 casos desde 2014 hasta 2017 de pacientes de la Unidad de Genética y Reproducción del Hospital HLA Vistahermosa, de los cuales 79 de ellos presentaban FISH alterado de espermatozoides como indicación clínica. De estos tuvimos que descartar 8 casos por tener otras indicaciones como edad materna avanzada (3 casos), cariotipo alterado (2 casos), translocación robertsoniana (2 casos) y endometriosis. Por tanto, tuvimos un total de 71 casos, que forman nuestro grupo de estudio, donde el hombre posee factor masculino severo revelado por un diagnóstico de FISH de espermatozoides alterado y que no incluía ninguna otra indicación; además los ovocitos usados para obtener embriones eran de calidad, siendo donados, o propios sin ninguna indicación que pudiese comprometer la fertilidad de la mujer. Los embriones de nuestro grupo de estudio se obtuvieron por fecundación in vitro (FIV) y fueron analizados por SGP mediante array CGH.

Grupo control: Hemos usado dos grupos controles, ambos formados por pacientes de la misma unidad que nuestro grupo de estudio; los embriones de estos grupos control también fueron obtenidos por FIV.

- Grupo control A, para determinar el porcentaje de embriones aneuploides en la población general, formado por 5 casos en los que el hombre no tiene ningún diagnóstico que indique esterilidad y con FISH de espermatozoides normal; junto con ovocitos donados y de calidad. De estos 5 casos se obtuvieron 30 embriones que se sometieron a SGP para determinar su ploidía. En tres de estos casos se sometieron a realizar esta prueba por motivos sociales y los otros dos restantes fueron donantes de espermatozoides para hacer embriones.
- Grupo control B, para determinar la tasa de embarazo sin SGP, en casos donde el hombre posee un FISH de espermatozoides alterado, junto con ovocitos donados y de calidad. Los embriones obtenidos no se sometieron al SGP y fueron transferidos tras ser analizados morfológicamente al útero de la mujer. Este grupo control está formado por 29 casos.

6.2. Técnicas

6.2.1. FISH de espermatozoides

Descripción de la técnica: El FISH de espermatozoides es una prueba diagnóstica que permite saber la fracción que hay de espermatozoides con alteraciones cromosómicas; para ello se marcan a través de una sonda fluorescente ciertos cromosomas y después se analizan mediante un microscopio de fluorescencia. En este estudio se han marcado los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, puesto que son los que tienen más probabilidades de estar alterados, usando sondas centroméricas y específicas de locus.

Procedimiento:

A. Preparación de la muestra: Para la realización de la técnica se usa 0,5-1 ml de muestra. Se preparan 5 jarras Coplin con diferentes soluciones; tras ello, se añaden 5 ml de cloruro potásico a 0,5 ml de la muestra y se incuba a 37° durante 30 minutos. Después se centrifuga y se desecha el sobrenadante, se resuspende el pellet y se añaden 8 ml de Carnoy frío. Volvemos a centrifugar, desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 0,5-1ml de Carnoy. Una vez realizado esto, echamos una o más gotas (hasta obtener la densidad deseada) sobre un portaobjetos. Después sumergiremos el portaobjetos en 4 soluciones diferentes, dejamos secar y descondesamos en DDT, tras esto volvemos a sumergir el portaobjetos en las 4 soluciones y dejamos secar. De esta forma tendremos la muestra preparada.

B. Hibridación de la muestra: Con la sonda descongelada, aplicamos 5µl de ella en la muestra y seguido ponemos un cubreobjetos, finalmente tratamos el portaobjetos primero a 77° y después incubamos a 37° en una cámara húmeda de 16-24 horas.

C. Lavados post-hibridación: Sumergir el portaobjetos durante 2 minutos en una solución 0,4xSSC-NP40 a 72°, seguido de 30 segundos en una solución 2xSSC-NP40. Dejamos secar en la oscuridad y finalmente aplicamos 10µl de DAPI y lo ponemos a una temperatura de -20° durante 30 minutos.

Tras realizar este procedimiento se guarda en oscuridad y frío hasta el momento de su estudio.

6.2.2. Screening genético preimplantación mediante aCGH

Descripción de la técnica: Consiste en analizar el número de cromosomas presentes en los embriones antes de transferirlos a la mujer; de esta forma nos permite seleccionar los embriones euploides y descartar los aneuploides que tienen un menor potencial de implantación.

Un ciclo de reproducción asistida con SGP consta de: estimulación ovárica controlada, fecundación in vitro; tras esto se lleva a cabo la biopsia del embrión, que en nuestro estudio se hizo en día tres, cuando el embrión se encuentra en estado de 8 células llamadas blastómeras obteniendo de esta forma una de ellas a la cual ya se puede someter al SGP mediante el siguiente procedimiento.

Procedimiento: Para realizar el SGP se ha seguido el protocolo 24Sure de Illumina que consta de las siguientes etapas:

A. Preparación de la muestra: Se lleva a cabo una amplificación del genoma completo, siguiendo el protocolo SurePlex el cual debe llevarse a cabo en una cabina de flujo laminar estéril para evitar contaminaciones; ya que este es un paso crucial y una contaminación con ADN externo podría amplificarse en esta etapa y dar un error en el diagnóstico.

B. Marcaje: Las muestras y controles son marcados con los fluoróforos Cy3 y Cy5 usando primers random.

C. Hibridación: El ADN de la muestra se desnaturaliza a 75^o durante 10 minutos, se centrifuga durante 20 segundos y se deja enfriar a temperatura ambiente, tras esto se pasa a la hibridación con el ADN control.

D. Lavado: Este proceso se realiza para quitar el ADN no hibridado. Se lleva a cabo a alta temperatura para una correcta astringencia

E. Análisis: Se analiza la muestra mediante array CGH usando el software BlueFuse.

Tras este procedimiento, se seleccionan los embriones euploides y se transfieren a la mujer en día 5. En casos en los que se obtienen varios embriones euploides se transfirieron como máximo dos de ellos.

6.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos tanto para el número de embriones aneuploides según la indicación clínica, como los resultados de la tasa de embarazo en pacientes con FISH alterado que sometieron sus embriones a SGP, fueron comparados con sus respectivos grupos controles explicados anteriormente usando dos análisis estadísticos en cada uno de ellos, llevados a cabo mediante el software XLSTAT en Excel. También se analizaron con las mismas pruebas los resultados de comparar nuestro estudio con otros, en el apartado "8.Discusión".

- **Prueba del chi-cuadrado:** Refleja la distancia entre los datos reales y teóricos, calculando de esta forma las frecuencias teóricas y obteniendo un valor de "p".
- **Test exacto de Fisher:** Obtiene un valor de "p" utilizando la distribución hipergeométrica, que refleja la probabilidad de tener los datos observados.

Ambas pruebas plantean una hipótesis nula (H_0) donde las dos variables son independientes y una hipótesis alternativa (H_a) donde estas son dependientes. En ambos casos el nivel de significancia (α) fue de 5%; por tanto, cuando el valor de "p" obtenido es menor que 0,05 se rechaza la hipótesis nula con un riesgo "p" de equivocarse. En cambio, cuando el valor de "p" es mayor que 0,05, se acepta la hipótesis nula.

7. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en este estudio los cuales se dividen en dos secciones: evaluación de la ploidía de los embriones analizados mediante SGP (7.1), y la evaluación de la tasa de embarazo por transferencia (7.2).

7.1. Evaluación de la ploidía de los embriones mediante SGP

Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 1 y quedan reflejados en la Figura 1 y Figura 2.

Tabla 1: Resultado del análisis de embriones por SGP.

| | FISH de espermatozoides alterado | Edad materna avanzada ¹ | Translocación ² | Grupo control A |
|--|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------|
| Núm. casos | 71 | 11 | 10 | 5 |
| Núm. embriones obtenidos | 375 | 38 | 44 | 30 |
| Núm. fallos de amplificación (%) | 40 (10,67) | 3 (7,89) | 5 (11,36) | 0 (0) |
| Núm. embriones estudiados | 335 | 35 | 39 | 30 |
| Núm. embriones euploides (%) | 121 (36,12) | 2 (5,71) | 10 (25,64) | 17 (56,67) |
| Núm. embriones aneuploides (%) | 214 (63,88) | 33 (94,29) | 29 (74,36) | 13 (43,33) |
| Núm. Embriones caóticos (%) ³ | 68 (31,78) | 4 (12,12) | 3 (10,34) | 0 (0) |

¹ Consideramos la indicación clínica de edad materna avanzada en casos donde la mujer tiene una edad ≥ 38 años y usa sus propios ovocitos.

² No diferenciamos entre los distintos tipos de translocaciones.

³ Consideramos que un embrión es caótico cuando posee 4 o más anomalías cromosómicas. Además, estos están incluidos en el porcentaje de embriones aneuploides. El porcentaje que se da de ellos es con respecto a los embriones aneuploides y no a la totalidad de embriones.

Figura 1: Resultado del análisis de embriones por SGP.

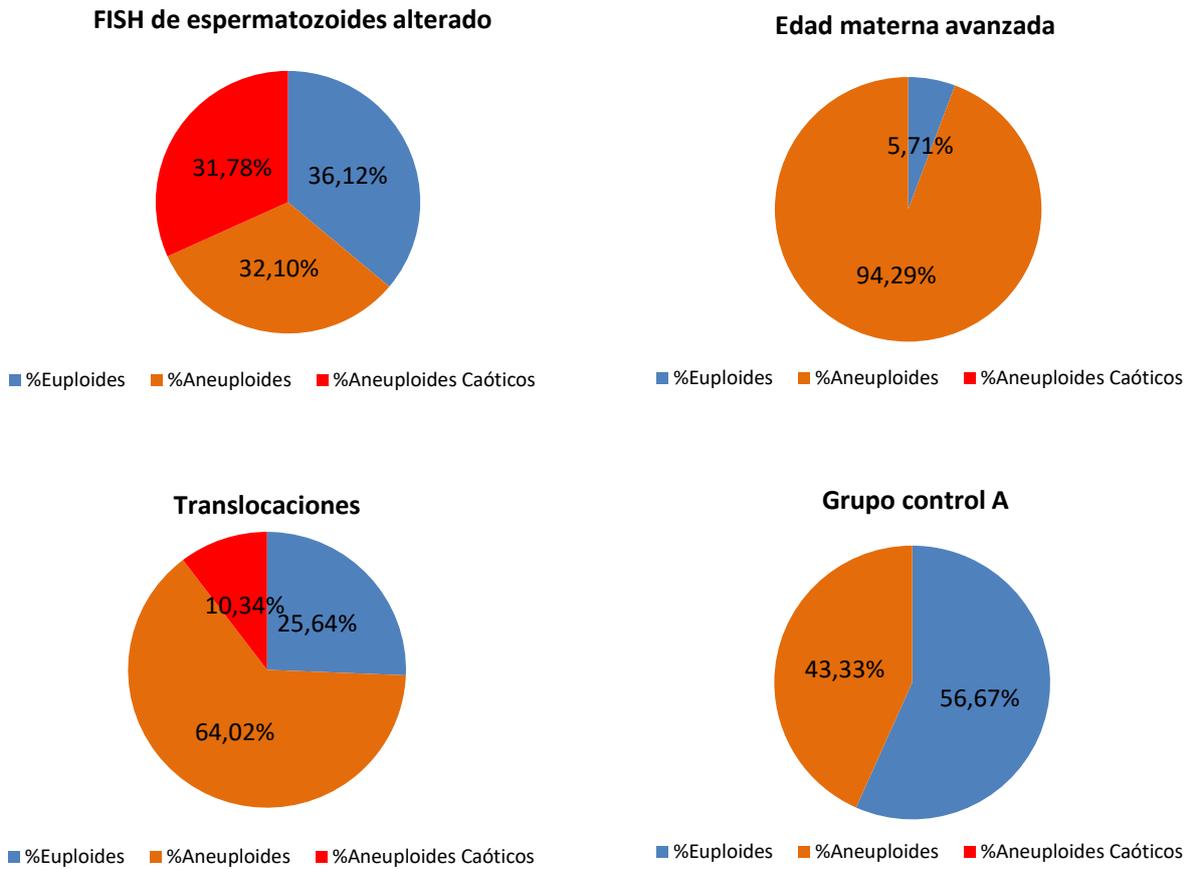
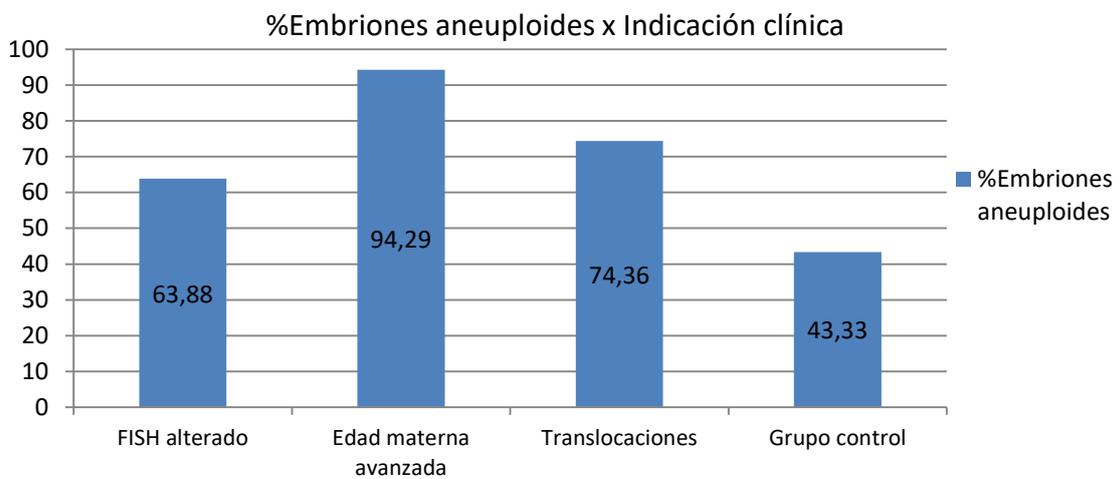


Figura 2: Porcentaje de embriones aneuploides según la indicación clínica.



Para comprobar si las diferencias en el porcentaje de embriones aneuploides entre las distintas indicaciones eran significativas se hicieron dos análisis estadísticos explicados en el apartado de “6. Materiales y métodos> 6.3. Análisis estadístico”. Los resultados que obtuvimos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Análisis estadístico comparando los resultados de las diferentes indicaciones clínicas: FISH de espermatozoides alterado, edad materna avanzada, translocación y grupo control A.

| | Prueba de chi-cuadrado | | Test exacto de Fisher | | | |
|--|------------------------|---------------|-----------------------|---------------|---------------|------------|
| Valor de α (%) | 0,05 (5%) | | 0,05 (5%) | | | |
| Valor de p (%) | < 0,0001 (<0,01%) | | < 0,0001 (<0,01%) | | | |
| Riesgo de rechazar H0 cuando es verdadera | <0,01% | | <0,01% | | | |
| Frecuencias teóricas | | FISH alterado | Edad materna avanzada | Translocación | Grupo control | Total |
| | Embriones euploides | 114,465 | 11,959 | 13,326 | 10,251 | 150,000 |
| | Embriones aneuploides | 220,535 | 23,041 | 25,674 | 19,749 | 289,000 |
| | Total | 335 | 35 | 39 | 30 | 439 |
| Proporciones/Columna | | FISH alterado | Edad materna avanzada | Translocación | Grupo control | Total |
| | Embriones euploides | 0,361 | 0,057 | 0,256 | 0,567 | 0,342 |
| | Embriones aneuploides | 0,639 | 0,943 | 0,744 | 0,433 | 0,658 |
| | Total | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Además, como uno de los objetivos de nuestro trabajo es evaluar si pacientes con FISH de espermatozoides alterado producen un mayor porcentaje de embriones aneuploides que la población general, se repitieron los análisis estadísticos comparando solamente los resultados de esta indicación con los del grupo control A para ver si la diferencia es significativa, se representan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: Análisis estadístico comparando los resultados de FISH de espermatozoides alterado y el grupo control A.

| | Prueba de chi-cuadrado | Test exacto de Fisher | | |
|---|------------------------|-----------------------|---------------|---------|
| Valor de α (%) | 0,05 (5%) | 0,05 (5%) | | |
| Valor de p (%) | 0,043 (4,3%) | 0,031 (3,1%) | | |
| Riesgo de rechazar H0 cuando es verdadera | 4,27% | 3,11% | | |
| Frecuencias teóricas | | FISH alterado | Grupo control | Total |
| | Embriones euploides | 126,658 | 11,342 | 138,000 |
| | Embriones aneuploides | 208,342 | 18,658 | 227,000 |
| | Total | 335 | 30 | 365 |
| Proporciones/Columna | | FISH alterado | Grupo control | Total |
| | Embriones euploides | 0,361 | 0,567 | 0,378 |
| | Embriones aneuploides | 0,639 | 0,433 | 0,622 |
| | Total | 1 | 1 | 1 |

7.2. Evaluación de la tasa de embarazo por transferencia

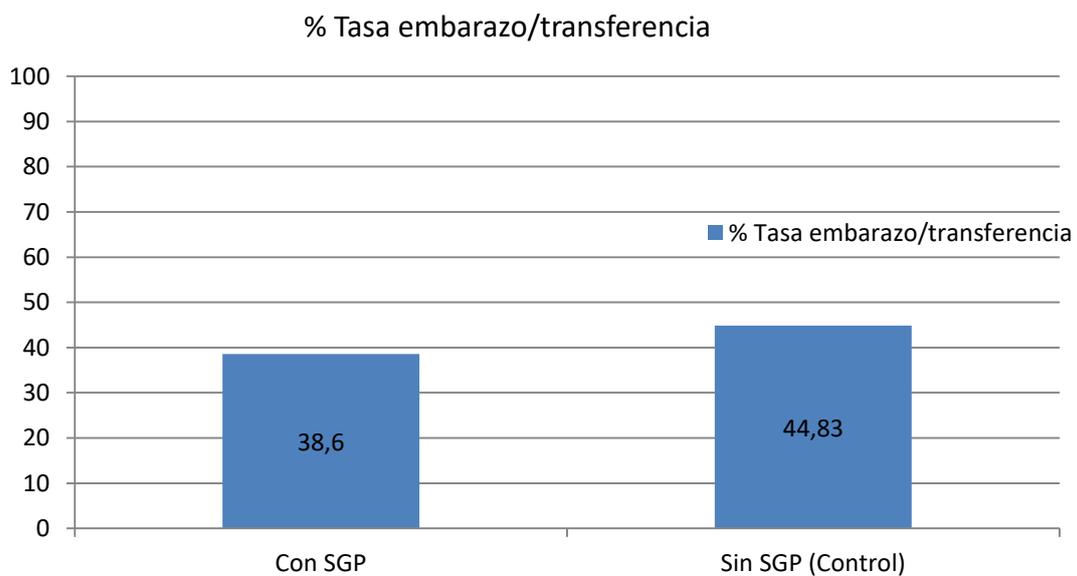
Nuestro grupo de estudio está formado por 71 casos, de los cuales se obtuvieron embriones euploides en 57 de ellos, y se llevó a cabo la transferencia. Se estudió la tasa de embarazo conseguida; que se puede ver en la Tabla 4 y queda reflejada en la Figura 3, comparándola con un grupo control explicado en el apartado “6.Materiales y métodos>6.1.Pacientes>Grupo control B”.

Tabla 4: Resultado de la tasa de embarazo/ transferencia.

| | Con SGP | Sin SGP ¹ |
|---------------------------------|---------|----------------------|
| Núm. transferencias | 57 | 29 |
| Núm. Embarazos | 22 | 13 |
| Núm. No embarazos | 35 | 16 |
| Tasa embarazo/transferencia (%) | 38,6% | 44,83% |

¹Los embriones transferidos sin llevar a cabo el SGP, hacen referencia al grupo control B.

Figura 3: Porcentaje de la tasa de embarazo por transferencia



Para determinar si la diferencia obtenida en la tasa de embarazo entre el grupo de estudio y el grupo control B es significativa, se han llevado a cabo dos análisis estadísticos explicados en el apartado de “6. Materiales y métodos> 6.3. Análisis estadístico”. En la Tabla 5 se muestra el resultado de estos.

Tabla 5: Análisis estadístico de la tasa de embarazo entre el grupo de estudio y el grupo control B.

| | Prueba de chi-cuadrado | | Test exacto de Fisher | |
|--|------------------------|--------|-----------------------|--------|
| Valor de α (%) | 0,05 (5%) | | 0,05 (5%) | |
| Valor de p (%) | 0,578 (57,8%) | | 0,646 (64,6%) | |
| Riesgo de rechazar H0 cuando es verdadera | 57,82% | | 64,55% | |
| Frecuencias teóricas | | SGP | Sin SGP | Total |
| | Embarazos | 23,198 | 11,802 | 35,000 |
| | No embarazos | 33,802 | 17,198 | 51,000 |
| | Total | 57 | 29 | 86 |
| Proporciones/Columna | | SGP | Sin SGP | Total |
| | Embarazos | 0,386 | 0,448 | 0,407 |
| | No embarazos | 0,614 | 0,552 | 0,593 |
| | Total | 1 | 1 | 1 |

8. DISCUSIÓN

En este TFG se ha hecho una revisión clínica del SGP en casos de pacientes con factor masculino severo revelado por un FISH de espermatozoides alterado.

La indicación de FISH de espermatozoides alterado confirma una mayor presencia de aneuploidías en los espermatozoides de estos pacientes. Estas alteraciones cromosómicas afectan a los embriones que producen, pudiendo empeorar la tasa de embarazo y por tanto causando problemas de fertilidad. El SGP, por su parte, nos permite seleccionar los embriones euploides frente a los aneuploides ya que está demostrado que los primeros tienen un mayor potencial de implantación. Al igual que los resultados, la discusión de los mismos se va a dividir en dos secciones.

8.1. Evaluación de la ploidía de los embriones

Los embriones obtenidos de pacientes con diferente indicación clínica fueron sometidos a SGP analizando todos sus cromosomas mediante array CGH para evaluar el porcentaje de embriones aneuploides. Algunos de los embriones obtenidos no pudieron ser analizados debido a fallos de amplificación, por lo que quedaron sin diagnóstico; esto no es anormal, de hecho en nuestro estudio el mayor porcentaje de fallos de amplificación es de 10,67% y se dio en pacientes con FISH de espermatozoides alterado, aunque la indicación clínica en este sentido no tiene importancia y la diferencia probablemente se deba a que también es la indicación con mayor número de embriones biopsiados; este porcentaje está por debajo del que se da en la literatura consultada (43), donde se producen fallos de amplificación en un 12,6% (23/183) de los embriones biopsiados.

Centrándonos en los resultados presentados anteriormente en la Tabla 1 e ilustrados en la Figura 1 y 2, vemos que el porcentaje de embriones aneuploides varía dependiendo de la indicación del paciente. En nuestro caso se obtuvo un mayor número de embriones aneuploides en pacientes con edad materna avanzada (94,29%), seguido de pacientes con translocaciones (74,36%), FISH de espermatozoides alterado (63,88%) y del grupo control A (43,33%). Estos resultados fueron evaluados por dos análisis estadísticos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 2, donde obtuvimos en ambos un valor $p < 0,0001$ que es menor que el nivel de $\alpha = 0,05$; esto significa que se rechaza la H_0 con un riesgo menor al 0,01%; por lo tanto, se acepta la H_a que confirma que el porcentaje de embriones aneuploides depende

de la indicación clínica del paciente. Además, se dan las frecuencias teóricas que nos dice cómo deberían ser los datos para que se cumpliera la H_0 , podemos observar que estas son distintas con respecto a las frecuencias observadas y nos da fiabilidad aceptar la prueba del chi cuadrado ver que ninguna de estas frecuencias es menor que 5, nivel de significación. Por otro lado, también se presentan las proporciones/columna en las que vemos una diferencia notable entre las distintas indicaciones.

Uno de los objetivos que nos marcamos en este TFG fue evaluar la producción de embriones aneuploides en pacientes con FISH de espermatozoides alterado, por tanto pese a haber confirmado ya anteriormente que esto varía según la indicación clínica, quisimos confirmar por separado los resultados de esta indicación comparándolos con los del grupo control A y ver si la diferencia era significativa. Por tanto, realizamos de nuevo los dos análisis estadísticos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3, donde se obtiene un valor de "p" inferior al nivel de $\alpha = 0,05$ tanto en la prueba de chi cuadrado (0,043) como en el test exacto de Fisher (0,031); esto significa que se rechaza la H_0 con un riesgo de 4,27% y 3,11% respectivamente, por lo que se acepta la H_a , que confirma que el porcentaje de embriones aneuploides es mayor en pacientes con FISH de espermatozoides alterado que en el grupo control A formado por pacientes sin ningún problema de fertilidad. Además, se dan las frecuencias teóricas que muestran cómo deberían ser los datos para que se cumpliera la H_0 , podemos observar que estas son distintas con respecto a las frecuencias observadas y nos da fiabilidad aceptar la prueba del chi cuadrado ver que ninguna de estas frecuencias es menor que 5. Por otro lado, también se presentan las proporciones/columna en las que vemos una diferencia notable entre las dos indicaciones ya que para FISH alterado la proporción de embriones aneuploides es 0,639 y para el grupo control A 0,433.

Para validar nuestros resultados los hemos comparado con otros estudios de la bibliografía que han sido revisados, esto queda reflejado a continuación en la Tabla 6:

Tabla 6: Resultados del análisis de embriones de nuestro estudio comparados con otros revisados de la bibliografía.

| | FISH de espermatozoides alterado | | Edad materna avanzada | | Translocaciones | | Grupo control A | |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------------|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|----------------|
| | Nuestro estudio | Otro (54) | Nuestro estudio | Otro (53) | Nuestro estudio | Otro (44) | Nuestro estudio | Otro (55) |
| Núm. casos | 71 | 13 | 11 | 83 | 10 | 47 | 5 | 55 |
| Núm. embriones estudiados | 335 | 85 | 35 | 563 | 39 | 402 | 30 | 425 |
| Núm. embriones aneuploides (%) | 214 (63,88%) | 64 (75,3%) | 33 (94,29%) | 484 (85,97%) | 29 (74,36%) | 229 (57%) | 13 (43,33%) | 191 (44,9%) |

- FISH de espermatozoides alterado:** La diferencia observada entre los dos estudios no es estadísticamente significativa, confirmado por la prueba de chi-cuadrado y el test exacto de Fisher; aun así, hay cierta diferencia en la metodología de ambos estudios ya que en el nuestro se trata de pacientes con factor masculino severo revelado por FISH de espermatozoides alterado, sin embargo, en el otro estudio (54) los pacientes poseen factor masculino severo indicado por un seminograma alterado.
- Edad materna avanzada:** Comparando nuestros resultados con los de otro estudio (53) vemos que no hay una diferencia notable en cuanto al porcentaje de embriones aneuploides. Las características de este otro estudio son muy similares al nuestro, la edad media de las mujeres es de 41 años que es muy cercana a la edad media de las mujeres del nuestro, 40,5 años; además se hace la biopsia en la etapa de escisión y se analiza mediante aCGH.

- **Translocaciones:** Comparando los resultados de ambos estudios vemos que hay diferencia entre ellos, confirmado por la prueba de chi-cuadrado y el test exacto de Fisher. La razón de ello puede que sea que en nuestro estudio tenemos una población muy pequeña; además no hemos diferenciado entre los distintos tipos de translocaciones.
- **Grupo control A:** Nos resultó muy importante comparar los resultados de nuestro grupo control A con otro similar que fuese más grande, ya que el nuestro era reducido. Al comparar los resultados con los de otro estudio (55) vemos que son muy similares. Aun así, hay que añadir que en este otro estudio los embriones se biopsiaron en día 5 a diferencia de nuestro estudio que fue en día 3.

8.2. Evaluación de la tasa de embarazo por transferencia

De los 71 casos que formaban nuestro grupo de estudio se obtuvieron embriones euploides y por tanto aptos para la transferencia en 57 de ellos; por tanto, obtuvimos una tasa de transferencia de 80,28%. Tal y como muestra la Tabla 4, de estos 57 casos donde fue posible la transferencia hubo 22 embarazos obteniendo una tasa de embarazo por transferencia de 38,6%, mientras que en el grupo control B se hicieron 29 transferencias y se dieron 13 casos en los que hubo embarazo, de esta forma, la tasa de embarazo por transferencia en este grupo control fue de 44,83%.

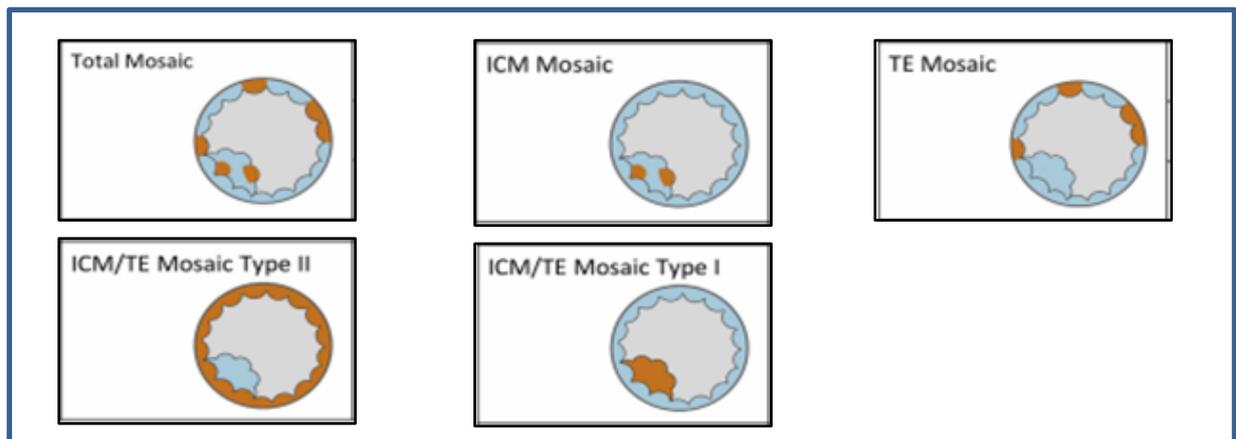
Comparando la tasa de embarazo/transferencia del grupo de estudio (38,6%) y del grupo control B (44,83%), podemos observar que en pacientes con FISH de espermatozoide alterado cuyos embriones no habían sido sometidos a SGP se obtiene una tasa de embarazo por transferencia de 6,23% mayor que en pacientes con FISH de espermatozoides alterado cuyos embriones habían sido analizados por SGP.

Para validar estos resultados se hicieron dos análisis estadísticos, cuyos resultados están en la Tabla 5, y nos muestra que el valor de “p” tanto para la prueba del chi cuadrado (0,578) como en el test exacto de Fisher (0,646) es mayor que el nivel de significación=0,05 por lo que se acepta la H₀, que viene a decir que el número de embarazos es independiente del uso del SGP. Además, se dan las frecuencias teóricas que muestran cómo deberían ser los datos para que se cumpliera la H₀, podemos observar que estas son similares a las

frecuencias observadas y nos da fiabilidad aceptar la prueba del chi cuadrado ver que ninguna de estas frecuencias es menor que 5. Por otro lado, también se presentan las proporciones/columna en las que no vemos una diferencia notable entre nuestro grupo de estudio y el control B. Con estos análisis se concluye que la diferencia observada en la tasa de embarazo por transferencia no es significativa.

Estos resultados nos indican que el uso del SGP no ha sido capaz de aumentar la tasa de embarazo en nuestro estudio; esta afirmación, es acorde con otras revisiones bibliográficas consultadas (45) que concluyen que no se han obtenido claros beneficios del uso de esta técnica. Sin embargo, para entender esto, hay que tener en cuenta que el SGP es un screening cuyo objetivo es seleccionar los embriones euploides puesto que tienen mayor potencial de implantación. Se ha demostrado que los embriones biopsiados en día 3 pueden ser discordantes con la ploidía que tendrán en día 5, es decir, que en ocasiones embriones con alteraciones cromosómicas en día 3, diagnosticados como aneuploides, son euploides en día 5. Se puede explicar, entre otras cosas, por la existencia de mosaicismo, es decir, en el embrión pueden coexistir líneas celulares diferentes, (algunas euploides y otras aneuploides) como podemos ver en la Figura 4. Si realizamos la biopsia en día 3, solo analizamos una célula, por lo que no podemos conocer el estado de mosaico del embrión; de hecho, hay estudios (47) donde se afirma que el 50% de embriones informados como aneuploides presentan mosaicismo. Además, haciendo referencia a casos donde se ha indicado un FISH de espermatozoides alterado, también se sabe que el ovocito puede reparar los errores que transmite el espermatozoide en fases de desarrollo embrionario posteriores al análisis mediante SGP, y que esta capacidad reparadora depende de la calidad del ovocito que va empeorando a medida que aumenta la edad (48); esto concuerda con nuestros resultados donde vemos que la edad materna avanzada es la indicación clínica donde se obtiene un mayor porcentaje de embriones aneuploides. Por todos estos motivos, puede que la tasa de embarazo no experimente un aumento, ya que se podría estar subestimando el número de embriones con un alto potencial de implantación, cosa que no ocurre en pacientes que no se realizan el SGP, aunque cabe decir que el número de pacientes de nuestra población control (control B) es pequeño, por lo que estos resultados podrían variar a medida que aumentemos el número de casos.

Figura 4: Tipos de mosaicismo



En esta imagen se representa la línea celular euploide en azul, y en naranja la aneuploide. Se puede ver que existen diferentes tipos de mosaicos dependiendo de la zona donde se encuentran las células aneuploides, en la masa celular interna (ICM) o en trofoectodermo (TE).

Vera-Rodriguez.(56)

9. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Haciendo referencia a los objetivos que marcamos en este TFG se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado que el porcentaje de embriones aneuploides depende de la indicación que tengan los pacientes. Especialmente se ha estudiado la indicación de FISH de espermatozoides alterado y podemos concluir que está relacionada con una mayor tasa de embriones aneuploides en comparación con la población general.
- La tasa de embarazo por transferencia obtenida en pacientes con FISH de espermatozoides alterado cuyos embriones fueron analizados por SGP no muestra diferencias significativas con la que se obtiene en pacientes con la misma indicación y que por el contrario no sometieron los embriones a SGP.

Por tanto, tras ver estas dos conclusiones se puede confirmar que el factor masculino severo revelado por un FISH de espermatozoides alterado es una indicación para realizar el SGP; sin embargo, para obtener un beneficio en la tasa de embarazo usando esta técnica, se ha propuesto desde la Unidad de Genética del Hospital HLA Vistahermosa la biopsia en día 5 de todos los embriones, ya nos permitiría detectar los embriones mosaicos, además el número de embriones anormales se reduce en la fase de blastocisto debido a que los embriones anormales tienden a bloquear su desarrollo antes de llegar al día 5; con esto, cabe esperar un aumento de la tasa de embarazo y con ello mayor éxito del ciclo de reproducción asistida.

Otra mejora que se plantea junto a la biopsia del día 5, es la utilización de NGS para llevar a cabo el screening. Esta tecnología, se ha convertido en una mejor alternativa frente a aCGH, ya que nos permite una mayor resolución en el estudio y una mayor rapidez en la obtención de resultados, pudiendo estudiar aneuploidías y translocaciones de todos los cromosomas (48).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Mélodie VB, Christine W. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem [Internet]. 2018;#pagerange#. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912018302200>
2. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. Hum Reprod Update. 2014;21(4):411–26.
3. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. Hum Reprod Update. 2008;14(6):605–21.
4. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. Reprod Biol Endocrinol [Internet]. 2015;13:37. Available from: ???
5. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. Hum Reprod. 2008;23(12):2663–8 ST–Sperm DNA damage is associated with a.
6. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation . 2018;(2007):2018.
7. Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility - A review. Placenta. 2003;24(SUPPL. B):2001–4.
8. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. Nat Rev Genet. 2001;2(4):280–91.
9. Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. EMBO J. 1997;16(9):2262–70.
10. Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, Egozcue S, Oliver-Bonet M, Blanco J, et al. Meiotic abnormalities in infertile males. Cytogenet Genome Res. 2005;111(3–4):337–

42.

11. Martin RH. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod Toxicol*. 2006;22(2):142–7.
12. Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2008;16(4):523–31.
13. Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. *Asian J Androl*. 2005;7(3):227–36.
14. Tempest HG, Griffin DK. The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet Genome Res*. 2004;107(1–2):83–94.
15. Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, et al. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod*. 2005;20(8):2140–52.
16. Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Bahce M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1709–17.
17. Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L. Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet*. 1998;102(2):129–37.
18. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Hum Reprod*. 2001;16(4):703–8.
19. Nagvenkar P, Zaveri K, Hinduja I. Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril*. 2005;84(4):925–31.
20. Samura O, Miharu N, He H, Okamoto E, Ohama K. Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods.

- Hum Reprod. 1997;12(11):2437–42.
21. Van Dyk Q, Lanzendorf S, Kolm P, Hodgen GD, Mahony MC. Incidence of aneuploid spermatozoa from subfertile men: selected with motility versus hemizona-bound. Hum Reprod [Internet]. 2000;15(7):1529–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875861>
 22. Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: Relationship with sperm quality and ICSI outcome. Hum Reprod. 2001;16(10):2084–92.
 23. Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, Al-Deery M, Jaroudi K, Coskun S. Sperm Chromosomal Abnormalities In Patients With Unexplained Recurrent Abortions. Arch Androl [Internet]. 2005;51(1):69–76. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/014850190518062>
 24. Giorlandino C, Calugi G, Iaconianni L, Santoro ML, Lippa A. Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. Fertil Steril. 1998;70(3):576–7.
 25. Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, Gianaroli L, Magli MC, Venturini PL, et al. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. Reprod Biomed Online. 2004;9(3):312–20.
 26. Nicopoullou JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? Hum Reprod. 2008;23(2):240–50.
 27. Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, et al. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. Fertil Steril. 2010;94(4):1380–6.
 28. Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Warter S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. Hum Reprod [Internet]. 2000;15(12):2563–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11098027>
 29. Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, et al. Study of

- aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod*. 1998;13(12):3406–13.
30. Strassburger D, Reichart M, Kaufman S, Kasterstein E, Komarovskiy D, Bern O, et al. Morphology assessment and fluorescence in situ hybridization of the same spermatozoon using a computerized cell-scanning system. *Hum Reprod*. 2007;22(1):201–9.
 31. Montag M, Toth B, Strowitzki T. New approaches to embryo selection. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2013;27(5):539–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.05.013>
 32. Chen H-F, Chen S-U, Ma G-C, Hsieh S-T, Tsai H-D, Yang Y-S, et al. Preimplantation genetic diagnosis and screening: Current status and future challenges. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2017;4–10. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092966461730579X>
 33. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trengia V, Farfalli V, et al. The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2005;10(5):633–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61671-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61671-9)
 34. Milán M, Cobo AC, Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendía P, et al. Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(5):649–57.
 35. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. *Fertil Steril*. 2005;84(2):319–24.
 36. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;92(1):157–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.029>
 37. Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, et al.

- Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2008;17(6):848–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60414-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60414-2)
38. Greco E, Bono S, Ruberti A, Lobascio AM, Greco P, Biricik A, et al. Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated Implantation Failure Treatment: A Pilot Study. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 39. Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005;84(2):331–5.
 40. Lee E, Illingworth P, Wilton L, Chambers GM. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): Systematic review. *Hum Reprod*. 2015;30(2):473–83.
 41. Wischmann T, Thorn P. (Male) infertility: What does it mean to men? New evidence from quantitative and qualitative studies. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2013;27(3):236–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.002>
 42. Cui W. Mother or nothing: the agony of infertility. *Bull World Health Organ*. 2010;88(12):881–2.
 43. Cellular UDB. Article Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities. 2004;8(4):470–6.
 44. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Iammarone E. Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J Endocrinol Invest*. 2000;23(10):711–6.
 45. Gleicher N, Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res* [Internet]. 2017;10(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13048-017-0318-3>
 46. Israel B, Medical D. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;373(21):2087–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1511634>

47. Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Limitations of embryo selection methods. *Semin Reprod Med.* 2014;32(2):127–33.
48. Liss J, Chromik I, Szczyglińska J, Jagiełło M, Łukaszuk A, Łukaszuk K. Current methods for preimplantation genetic diagnosis. *Ginekol Pol* [Internet]. 2016;87(7):522–6. Available from: https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/48288
49. Garrisi JG, Colls P, Ferry KM, Zheng X, Garrisi MG, Munné S. Effect of infertility, maternal age, and number of previous miscarriages on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for idiopathic recurrent pregnancy loss, *Fertil Steril* in press.
50. Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
51. Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril.* 2011;95(3):953–8.
52. Łukaszuk K, Pukszta S, Wells D, [et al.]. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *J Fertil Steril.* 2015, Jan 23.
53. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet.* 2013;132(9):1001–1013. doi: 10.1007/s00439-013-1309-0.
54. Kotdawala, Aditi P. et al. "Aneuploidy screening by array comparative genomic hybridization improves success rates of in vitro fertilization: A multicenter Indian study." *Journal of human reproductive sciences* (2016).
55. Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular Cytogenetics.* 2012;5:24. doi:10.1186/1755-8166-5-24.

56. Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. Fertil Steril [Internet]. 2017;107(5):1107–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.019>

11. WEBGRAFÍA

<https://www.reproduccionasistida.org/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

<http://www.sefertilidad.net/>

<https://help.xlstat.com>

<https://www.pediatriaintegral.es>