



**Universidad
Europea**



TRABAJO FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

Estudio del impacto de la edad materna sobre las
tasas de aneuploidías embrionarias

Autor: Javier Sandoval Hernández

Tutor: Raquel Herrer Saura

Alcobendas, Septiembre 2022

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
LISTA DE SIGLAS	5
ORIGEN Y ESTRUCTURA DEL TFM	6
INTRODUCCION	7
1. Efecto de la edad materna en las aneuploidías embrionarias.....	7
2. Necesidad de tratamientos de RA en EMA	10
3. Relación entre EMA y tasa de aneuploidías	11
3.1 Comparación de tasa de RNV en ciclos con y sin PGT-A.....	11
3.2 Relación de aneuploidías embrionarias con EMA	13
3.3 Análisis de la incidencia de los diferentes tipos de aneuploidías embrionarias en relación con la edad materna.....	16
3.4 Análisis de los cromosomas más afectados por euploidias.....	18
3.5 Análisis del porcentaje de blastocistos aneuploides/euploides obtenidos en función de la edad materna.....	20
3.6 Calidad embrionaria	23
HIPOTESIS	25
OBJETIVO	26
MATERIAL Y MÉTODOS	26
1. Diseño del Trabajo de Fin de Máster	26
2. Diseño del Proyecto	27
3. Metodología estadística	27
3.1 Base de datos.....	27
3.2 Variables de estudio	28
3.3 Tamaño muestral y potencia del estudio	30
3.4 Análisis descriptivo	30
3.5 Análisis de homogeneidad	30
3.6 Plan de trabajo.....	31
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFIA	33

RESUMEN

Durante las últimas décadas, y debido a las nuevas oportunidades laborales, educativas y a la evolución de los nuevos planteamientos familiares, se ha observado que la edad en la que las parejas deciden tener descendencia ha aumentado considerablemente. En la actualidad, la edad materna avanzada (EMA) es una de las principales causas de infertilidad en las mujeres, ya que el riesgo de generar embriones aneuploides se va incrementando de forma exponencial con los años. Como consecuencia, estas pacientes presentan mayor dificultad para conseguir gestación, aumento en la tasa de aborto, así como mayor riesgo de nacidos con alguna alteración cromosómica. Con el fin de evitar la transferencia de embriones aneuploides en los tratamientos de FIV, se recurre al Test Genético Preimplantacional para la detección de Aneuploidías (PGT-A), técnica que permite analizar el estado cromosómico de los embriones mediante la biopsia en estadio de células o de trofoectodermo (TF).

Esta relación entre la EMA y las aneuploidías embrionarias ha suscitado, en la comunidad científica, una nueva ventana de investigación, cuyo objetivo reside en comprender y estudiar los mecanismos que provocan el incremento de las tasas de aneuploidías embrionarios en base a la edad materna.

Por todo esto, el objetivo de esta revisión es examinar los datos más actualizados obtenidos bibliográficamente, acerca del impacto de las aneuploidías en base a la edad materna y poder ofrecer así una visión lo más cercana posible a la realidad acerca del comportamiento de las anomalías cromosómicas. Con esto, se espera poder brindar a parejas con deseo de conseguir descendencia, en especial a parejas pertenecientes al grupo de EMA (mayor de 35 años), el mejor asesoramiento posible durante su tratamiento de reproducción asistida, pero sobre todo, conseguir un recién nacido vivo (RNV) sano en casa.

Palabras clave: Edad Materna Avanzada (EMA), Test Genético Preimplantacional para la detección de Aneuploidías (PGT-A), Anomalías cromosómicas, Recién Nacido Vivo (RNV).

ABSTRACT

During the last decades, and due to new employment and educational opportunities and the evolution of new family approaches, it has been observed that the age at which couples decide to have children has increased considerably. Currently, advanced maternal age (AMA) is one of the main causes of infertility in women, since the risk of generating aneuploid embryos increases exponentially over the years. As a consequence, these patients present greater difficulty in achieving pregnancy, an increased rate of abortion, as well as a greater risk of being born with some chromosomal alteration. In order to avoid the transfer of aneuploid embryos in IVF treatments, the Preimplantation Genetic Test is used for the detection of Aneuploidy (PGT-A), a technique that allows the chromosomal state of the embryos to be analysed by biopsy at the cell stage or trophectoderm (TF).

This relationship between AMA and embryonic aneuploidy has given rise to a new window of research in the scientific community, the aim of which is to understand and study the mechanisms that cause the increase in embryonic aneuploidy rates based on maternal age.

For all these reasons, the objective of this review is to examine the most up-to-date data obtained in the literature on the impact of aneuploidies based on maternal age and thus be able to offer a vision as close as possible to reality about the behaviour of chromosomal abnormalities. With this, it is hoped to be able to provide couples who want to have children, especially couples belonging to the AMA group (over 35 years of age), the best possible advice during their assisted reproduction treatment, but above all, to get a new-born alive (NBA) healthy at home.

Keywords: Advanced Maternal Age (AMA), Preimplantation Genetic Test for the detection of Aneuploidies (PGT-A), Chromosomal abnormalities, New-Born alive (NBA).

LISTA DE SIGLAS

AE	Aborto Espontáneo
AR	Aborto de Repetición
aCGH	Array de Hibridación Genómica Comparada
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
BFS	British Fertility Society
CGH	Hibridación Genómica Comparativa
CEI	Comité Ético de Investigación
D3	Día 3
D5	Día 5
EMA	Edad Materna Avanzada
FISH	Hibridación Fluorescente <i>in-situ</i>
FIV	Fecundación <i>in-vitro</i>
ICSI	Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides
mCGH	Hibridación Genómica Comparada en Metafase
MCI	Masa Celular Interna
NGS	Secuenciación Masiva de Nueva Generación
PGT-A	Test Genético Preimplantacional para la detección de aneuploidías
qPCR	Reacción de la Polimerasa Cuantitativa
RNV	Recién Nacido Vivo
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
TF	Trofoectodermo
TFM	Trabajo de Fin de Máster
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
UAGI	Unidad de Apoyo y Gestión de la Investigación

ORIGEN Y ESTRUCTURA DEL TFM

Este TFM forma parte del proyecto *2111-ZAR-102-RH 'Análisis del impacto de la calidad embrionaria sobre el conjunto de procesos de los ciclos de PGT-A. Influencia sobre la tasa de Recién Nacido Vivo'*. Es un estudio retrospectivo desarrollado por la clínica IVI Zaragoza, liderado por la investigadora principal, Raquel Herrer Saura, con la ayuda de varios investigadores colaboradores. En lo referido a la publicación y desarrollo del proyecto, actualmente, ha sido aprobado por la Unidad de Apoyo y Gestión de la Investigación (UAGI) y se encuentra pendiente de la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación (CEI).

El objetivo principal de este proyecto es analizar la probabilidad de obtener un Recién Nacido Vivo (RNV) en pacientes sometidos a tratamientos de Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), biopsia de trofoectodermo y diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A) con NGS, en función de la calidad embrionaria del blastocisto (Clasificación de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, ASEBIR, 2015) y de los procesos implicados en el ciclo de PGT-A.

Además de este objetivo principal, se han planteado varios objetivos secundarios. Uno de ellos es estudiar la relación entre la edad materna y el incremento de anomalías cromosómicas por embrión. Este TFM es el resultado de la revisión bibliográfica de dicho objetivo del proyecto y del planteamiento estadístico de las variables a analizar.

INTRODUCCION

1. Efecto de la edad materna en las aneuploidías embrionarias

La relación entre la edad materna avanzada (EMA) y el aumento de aneuploidías embrionarias es reconocida desde hace más de 50 años, consolidándose como uno de los factores etiológicos con mayor impacto a la hora de desencadenar finalmente una pérdida temprana del embarazo en humanos (1).

Los primeros estudios que notificaron esta relación se remontan al año 1933, en el que el genetista Lionel S.P descubrió que la incidencia del Síndrome de Down en la descendencia era más común en mujeres de edad avanzada. A lo largo de las siguientes décadas, entre 1960 y 1980, múltiples estudios corroboraron y ampliaron estas observaciones (Risch et al., (1986) y Morton et al., (1988)); hasta tal punto que, en la actualidad, se reconoce que el aumento de la edad en las mujeres incrementa la probabilidad de aparecer alteraciones cromosómicas en los embriones, dando como consecuencia una descendencia alterada (2).

Una de las aneuploidías más estudiadas a lo largo de estas décadas fue la trisomía que afecta al par 21. En el 1992, se desarrolló un proyecto de estudio sobre esta trisomía, llegando a la conclusión de que los errores se deben a la falta o alteración de recombinaciones durante la meiosis, a errores en múltiples mecanismos y rutas que provocan la no disyunción correcta de los cromosomas. Un factor determinante en este proceso es la edad materna avanzada, que conduce finalmente a una mala segregación genética, reforzando así la hipótesis planteada hasta la fecha (2).

Uno de los retos a los que se ha enfrentado la comunidad científica, desde la aparición de esta relación, fue conocer cuáles son las causas subyacentes del efecto de la edad en la aparición de las aneuploidías. Medio siglo de investigación ha conseguido arrojar una gran cantidad de información acerca de la incidencia, el origen y la etiología de las aneuploidías humanas. Sin embargo, el verdadero reto al que se enfrenta ahora la ciencia es conseguir identificar la base molecular de la no disyunción meiótica, comprender los mecanismos responsables del incremento de anomalías mitóticas

relacionadas con la edad y finalmente desarrollar terapias para reducir o eliminar errores a nivel cromosómico para evitar embriones aneuploides **(2)**.

En cuanto al impacto de las aneuploidías en el desarrollo embrionario, el trabajo publicado en 2015 por Kathy et al. intentó proporcionar una visión más precisa acerca de la relación entre el aborto del primer trimestre, las aneuploidías embrionarias y la edad materna, mediante la revisión bibliográfica de los estudios publicados hasta la fecha **(3)**. Los estudios citogenéticos que se realizaron en esta revisión incluyeron diversas técnicas como Hibridación Fluorescente in-situ (FISH), Hibridación genómica comparativa (CGH), la reacción de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y como técnica más novedosa secuenciación masiva de nueva generación (NGS).

Los resultados obtenidos mostraron una estrecha relación entre las anomalías cromosómicas, la incidencia de aborto y la edad materna, independientemente de la técnica genética utilizada. En primer lugar, se observó que el 76% de los embarazos finalizados en abortos fueron causados por aneuploidías cromosómicas, mientras que el resto de los casos se debieron a anomalías uterinas, defectos en la fase lútea en el ciclo menstrual, diabetes mellitus o problemas en la tiroides **(3)**.

De este modo, también se observó que madres entre los 20 y 24 años presentaron apenas una tasa de aborto del 8,9%, en comparación con las madres de 40 a 42 años, en cuyo caso, más de la mitad de sus embarazos finalizaron en abortos (52,5%); y por último, las mujeres a partir de los 45 años cuyas las tasas de aborto fueron las más altas (74,7%) **(3)**.

Como último objetivo en este trabajo, se estudió el tipo de aneuploidías que provocaban estos abortos. La evidencia encontrada puso de manifiesto que las trisomías en los pares 16, 22, 21, 18 y 13 fueron las más presentes, siendo su incidencia del 14,3%, 11,7%, 9,1%, 7,8% y 7,8%, respectivamente **(4)**.

Cuando se compararon estos resultados con la calidad embrionaria, se observó que, aquellos embriones afectados con las aneuploidías más compatibles con la vida, como las trisomías en los pares 13, 18 o 21, fueron los que presentaron una mejor calidad embrionaria. En contraposición, aquellos embriones afectados con trisomías 15 o 22, las cuales no son compatibles con la vida, obtuvieron una peor calidad embrionaria **(4)**.

Sin embargo, otros autores como Byrne et al., (1985) encontraron otras relaciones entre las diferentes aneuploidías y calidad embrionaria. En este estudio, en contraposición con Kathy et al., (2015) embriones con trisomías en los pares 13 y 18 se relacionaron con dimorfismos severos y bajas calidades embrionarias **(4)**.

En este sentido, el estudio de Pellicer et al., (2020), realizado en un total de 9.803 embriones, muestra el desarrollo embrionario in vitro hasta día 9 de cultivo, y lo relaciona con las aneuploidías cromosómicas. Las diversas técnicas de Test Genético Preimplantacional para la detección de aneuploidías (PGT-A) utilizadas para el análisis embrionario, incluyeron microarrays, qPCR y NGS a partir de biopsias de trofoectodermo obtenidos bien en día 5 (D5) o día 6 (D6), dependiendo de cuando el embrión alcanzó una etapa de desarrollo considerada adecuada para la biopsia. Aunque los resultados del estudio no fueron muy concluyentes, ya que el comportamiento de los embriones con la misma aneuploidía no era el mismo en todos los casos, se pudieron observar ciertas tendencias acerca de su desarrollo. Los embriones con trisomías en el par 15 y 21, fueron capaces de llevar a cabo un desarrollo similar al de un embrión euploide. Sin embargo, embriones con monosomía en el par 21 mostraron altas tasas de detención durante desarrollo y finalmente, embriones con trisomías en el par 16 mostraron una hipoproliferación del trofoblasto **(5)**.

Viendo todo el esfuerzo realizado en las últimas décadas por intentar comprender el alcance y el impacto de las aneuploidías en embriones humanos, nos damos cuenta del conocimiento limitado y de los resultados no concluyentes entre los diferentes estudios publicados. Además, cuestiones como la etapa de desarrollo embrionario donde comienzan las aneuploidías a provocar fallos en el desarrollo, o el punto exacto donde el crecimiento embrionario cesa y se convierte en un feto no viable, siguen siendo una incógnita.

En definitiva, de todos los estudios mostrados, se puede deducir que cualquier aneuploidía cromosómica afecta negativamente al desarrollo embrionario (tanto de llegada a blastocisto como de gestación a término) en mayor o menor medida dependiendo de la gravedad de la misma.

Si focalizamos el estudio del impacto de aneuploidías durante el desarrollo embrionario in-vitro (hasta día 14) exclusivamente, surgen más limitaciones para poder llevarlo a cabo. Limitaciones de ámbito ético, técnico y fisiológico, son las que hoy en

día se enfrenta la ciencia para poder comprender el verdadero comportamiento de los embriones aneuploides.

Por encima de todas ellas, destaca el hecho de que el cultivo embrionario in-vitro solo se ha conseguido mantener en los laboratorios de reproducción asistida hasta día 7 después de la fecundación, aunque existen trabajos como el realizado por Shahbazi et al., (2016) en los que se ha llegado a conseguir un crecimiento embrionario in-vitro hasta día 13. El experimento no se pudo prologar durante más días debido al límite ético internacionalmente reconocido para el cultivo de embriones humanos, que solo permite el cultivo hasta el día 14 o hasta los primeros signos de desarrollo de la racha primitiva (6).

Asimismo, los experimentos in-vivo no son factibles legalmente y no existe ningún sistema para cultivar embriones humanos ex-vivo durante un tiempo prolongado, además de los límites legales comentados anteriormente (6).

Este incremento de anomalías cromosómicas de los embriones asociados a la EMA supone en la actualidad una de las causas de infertilidad más frecuentes en los ciclos de Fecundación In Vitro (FIV).

2. Necesidad de tratamientos de RA en EMA

A lo largo de las últimas décadas, las nuevas oportunidades educativas, la incorporación de la mujer al mundo laboral, así como los nuevos modelos familiares, han provocado que la edad en la que las parejas decidan tener descendencia haya aumentado notablemente.

Existen múltiples factores de riesgo derivados de este retraso en la maternidad: la disminución en la reserva ovárica y la calidad ovocitaria, el aumento del riesgo en la supervivencia de la descendencia, la menor capacidad de receptividad endometrial, etc. Por encima de todos los factores de riesgo, destaca el incremento de aneuploidías cromosómicas en los embriones, que tiene como consecuencia una menor probabilidad de gestación, y mayor riesgo de aborto. Por ello, cada vez es más común que parejas que planean empezar una familia y se encuentren dentro del grupo considerado de EMA (mayores de 35 años), tengan que recurrir a Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) como recurso para poder formar una familia (7).

Estudios acerca del impacto de las aneuploidías en embriones según la edad materna como el publicado por Munne et al., (2007) y Rabinowitz et al., (2012), muestran claramente el aumento de aneuploidías en embriones de mujeres de edad avanzada.

Munné et al., (2007) realizaron un estudio de más de 6.000 embriones biopsiados en D3 y analizados mediante FISH. Los resultados obtenidos en todos los grupos analizados, establecieron una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre la EMA y el porcentaje de embriones con aneuploidías cromosómicas. Así, en pacientes menores de 35 años, el 40% de los embriones analizados fueron euploides; en el grupo de 35 a 38 años el 37%; en el grupo de 38 a 40 años el 28% y finalmente en el grupo de más de 41 años apenas un 20% **(8)**.

Un trabajo similar publicado por Rabinowith et al., (2012) donde se analizaron 274 embriones en D3 por SNP microarrays, mostró resultados similares a los de Munné: la tasa de embriones euploides en mujeres menores de 36 años fue significativamente mayor que la de las mayores de 36 (34,3% vs 23,8%, $p < 0,01$) **(9)**.

En definitiva, tanto el aumento de las tasas de embriones aneuploides como todos factores de riesgo biológicos anteriormente nombrados, ha provocado que cada vez más parejas recurran a las TRA. Según datos de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), que proceden de 319 centros de Reproducción Asistida en España, se llevaron a cabo un total de 148.165 ciclos de FIV en 2019, lo que conlleva un aumento del 6% respecto al año 2017, y un 28% más con respecto al año 2014.

De esta manera, parece más que evidente que las TRA son una de las herramientas más potentes a la hora de poder conseguir que familias con EMA consigan descendencia. Como punto esperanzador, los datos arrojan un pronóstico muy positivo ya que entre el 40% – 65% de tratamientos de FIV son exitosos.

3. Relación entre EMA y tasa de aneuploidías

3.1 Comparación de tasa de RNV en ciclos con y sin PGT-A

Un estudio retrospectivo multicéntrico dirigido por Gary et al., (2013) quiso evaluar la relación entre la edad materna, las anomalías cromosómicas y su efecto sobre

las tasas de RNV en base al uso de PGT-A. Para ello, utilizaron una base de datos de 3.412 biopsias en D3 y 2.467 en D5, procedentes de diversos centros de FIV en Estados Unidos, analizadas mediante aCGH **(10)**.

En primer lugar se dividió la población en dos grupos, pacientes menores a 35 años y pacientes de entre 35 y 42 años, para posteriormente estudiar en esta última población las tasas de RNV en base al uso o no de PGT-A previo a la implantación embrionaria.

En esta franja de edad las tasas de RNV en pacientes con biopsias en D3 variaron de 38,1% a 48,5% y en el grupo de biopsia en D5, de 54,5% a 64,4%. El resultado del análisis estadístico Chi-cuadrado ($p < 0,01$) mostró la importancia de este valor, ya que, indicó que hubo una asociación significativa entre las tasas de RNV y el cribado genético previo a la implantación teniendo un efecto positivo el uso de PGT-A sobre las tasas de RNV **(11)**.

Gracias a estos resultados podemos comprender la importancia de incorporar en los ciclos de FIV las diversas técnicas de PGT-A, especialmente en pacientes de EMA, ya que podemos llegar a conseguir tasas de RNV similares a las de grupos de mujeres entre los 20 y 35 años **(11)**.

Cuatro años más tarde, un ensayo clínico multicéntrico, prospectivo y aleatorizado desarrollado por Rubio et al., (2007), y focalizado solamente en pacientes de entre 38 y 41 años, buscó también comparar las tasas de RNV entre una población en la que se realizó PGT-A (aCGH) previo al transfer mientras que la otra población se sometió a transferencia de blastocistos sin análisis cromosómico **(12)**.

El número de pacientes pertenecientes al grupo de PGT-A fue de 138 mientras que en el grupo donde no se realizó PGT-A fue de 140 pacientes. Respecto a la tasa de RNV en el grupo de PGT-A fue del 31,9% frente al 18,6% en el grupo sin PGT-A, siendo estos valores significativos al obtenerse un valor de $p = 0,0031$ **(12)**.

Es importante tener en cuenta la edad avanzada de ambos grupos de estudio, en cuyo caso se trataba de (pacientes entre los 38 y 41 años). El hecho de conseguir un 15% más de RNV en el grupo de PGT-A permite que muchas familias logren su deseo de conseguir descendencia, siendo más destacado este logro, conociendo a priori las bajas tasas de RNV en EMA **(12)**.

Otro dato a tener en cuenta en este trabajo es el número medio de transferencias que se habría requerido para lograr un RNV. En el grupo de PGT-A fueron necesarios un total de 1,8 transferencias, mientras que en el grupo sin PGT-A resultó de 3,7 **(12)**.

Estos resultados, además del gran beneficio clínico que supone reducir el número de transferencias hasta conseguir un RNV, también reduce considerablemente los gastos económicos por parte de la pareja por los múltiples tratamientos necesarios, así como los daños psicológicos que pueden acarrear varios abortos recurrentes **(12)**.

Valorando críticamente ambos trabajos, el hecho de obtener estos datos de pacientes procedentes de diversos centros de FIV evita obtener conclusiones sesgadas. Este sesgo tendría su origen en las metodologías de trabajo o acontecimientos puntuales característicos de cada clínica. Sin embargo, el hecho de partir de bases de datos procedentes de múltiples clínicas diferentes permite minimizar este efecto. Por consiguiente, tanto la procedencia de los datos como la extensa muestra de población, permiten tomar las conclusiones obtenidas como representativas de la población y como una imagen de la realidad.

Partiendo de esta premisa, los resultados obtenidos suponen una importante y directa repercusión en la RA ya que, refuerza la idea de implantar en el uso diario, las técnicas de PGT-A en los TRA. Asimismo, el hecho de mejorar las tasas de RNV en pacientes con EMA con la ayuda de PGT-A supone un logro muy destacado para la medicina reproductiva.

En definitiva, los resultados aportados por ambos trabajos, nos dan una idea bastante clara acerca de la importancia a nivel clínico, biológico, económico y psicológico de las ventajas que supone realizar técnicas de PGT-A previas al transfer embrionario en pacientes de edad avanzada **(12)**.

3.2 Relación de aneuploidías embrionarias con EMA

El trabajo retrospectivo de Jason et al., (2014) permitió determinar la relación entre la edad de la paciente y la prevalencia y naturaleza de la aneuploidía embrionaria humana. Para ello, se realizaron un total de 15.169 biopsias de trofoectodermo (D5) para posteriormente ser analizadas mediante qPCR o SNP **(13)**.

Prevalencia de las aneuploidías en relación con la edad materna

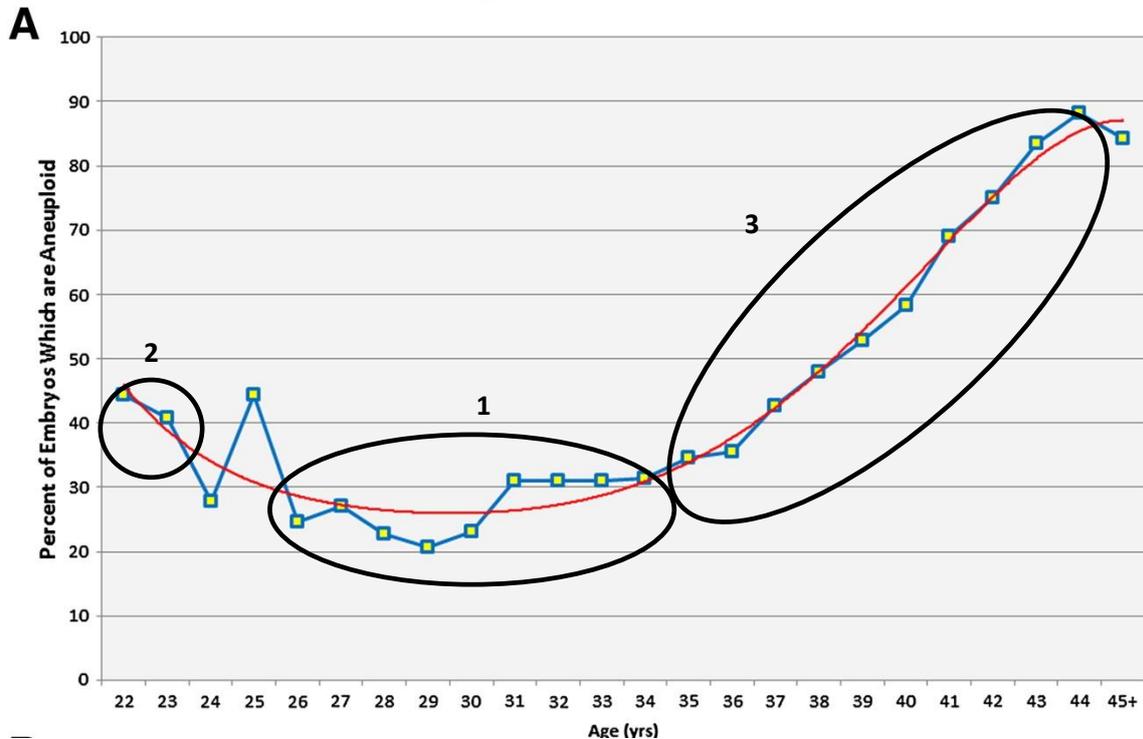


Figura 1. Tomado de “The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening” Fransiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott Jr, R. T. (2014). *Fertility and sterility*, 101(3), 656-663.

En la Figura 1, se observa el porcentaje de embriones aneuploides con respecto a la edad materna. A primera vista, se puede evidenciar la hipótesis de partida de la revisión, donde las tasas de aneuploidías embrionarias aumentan al igual que lo hace la edad materna (13).

Examinando con detenimiento la figura, se observan tres grupos bien diferenciados. El primer grupo lo conformarían las pacientes en el rango de edad entre los 26 y 34 años, en los que la prevalencia de embriones aneuploides es la más baja, oscilando entre el 20% y 30%. El segundo grupo estaría formado por los pacientes entre 22 y 23 años, donde, sorprendentemente, las tasas de embriones aneuploides fueron superiores al 40% llegando a coincidir con datos obtenidos en pacientes de 42 años. Y finalmente, el grupo de entre 35 y más de 45 años cuya prevalencia de embriones aneuploides tendería a aumentar constantemente hasta llegar aproximadamente el 85%.

Los resultados aportados por el primer y tercer grupo, en el que observamos un aumento constante de las tasas de aneuploidías desde los 26 hasta los 45 años, coinciden con los datos publicados en trabajos anteriormente. Sin embargo, el segundo grupo se

obtienen porcentajes excesivamente elevados para la edad de los pacientes. En un intento de resolver esta incógnita, se especula el hecho de una mayor probabilidad de creación de anomalías cromosómicas o una menor capacidad para corregir y/o prevenir la propagación de errores en mujeres menores de 23 años. Pese a estas suposiciones, a día de hoy no están claras las razones de estos resultados.

Estos hallazgos no solo nos permiten mejorar el asesoramiento al paciente y conseguir una mejor comprensión de la naturaleza humana, sino que también son una herramienta valiosa que nos permite reforzar la idea de la gran importancia que tienen las técnicas de PGT-A en las TRA (13).

Probabilidad de no obtener blastocistos euploides en una cohorte en relación a la edad materna

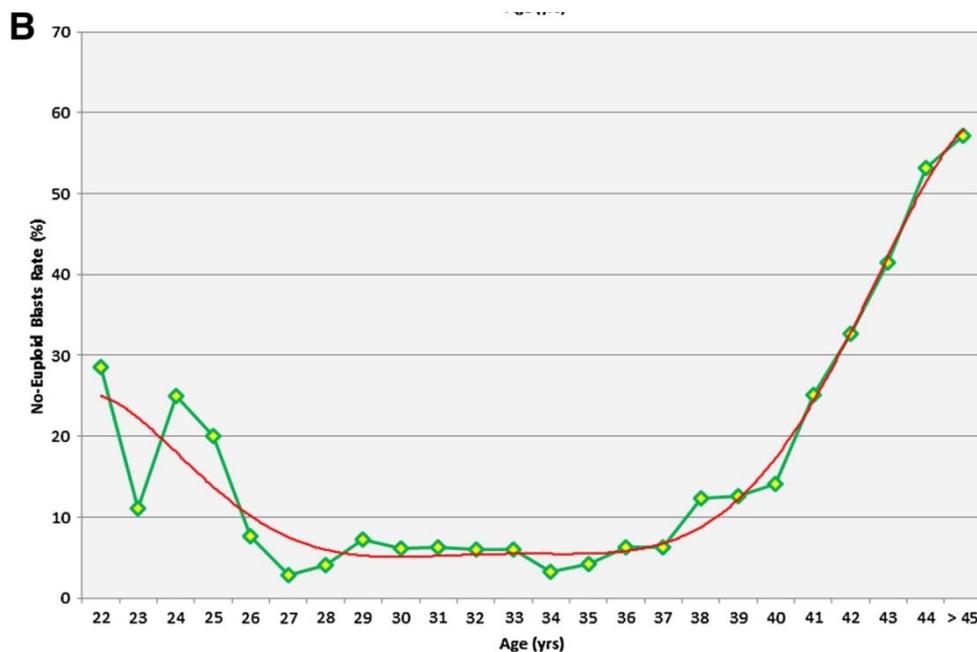


Figura 2. Tomado de “The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening” Frasiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott Jr, R. T. (2014). Fertility and sterility, 101(3), 656-663.

En la figura 2, se muestra la relación entre la probabilidad de que no haya ningún blastocisto euploide dentro de una sola cohorte y la edad materna. Los resultados indican, un bajo riesgo de no obtener un blastocisto euploide entre las edades de 26 y 37 años, oscilando entre el 5% y 10%, mientras que los riesgos más altos se encuentran en las edades presentes en pacientes más jóvenes y de mayor edad.

Esta evidencia mostrada en esta figura, concuerda con la propuesta en la figura 1, donde la probabilidad de no conseguir ningún blastocisto euploide es similar en mujeres entre 22-25 años y mujeres de 40 años.

De este modo, es importante destacar la gran importancia de valorar detenidamente la edad materna a la hora de conseguir un RNV ya que, como muestran los datos, la probabilidad de no encontrar un embrión euploide en una cohorte aumenta considerablemente a partir de los 40 años, edad donde, cada vez es más común encontrar parejas con deseos de buscar descendencia.

3.3 Análisis de la incidencia de los diferentes tipos de aneuploidías embrionarias en relación con la edad materna

Una revisión bibliográfica retrospectiva desarrollada por Rubio et al., (2019) acerca de las aplicaciones clínicas de las pruebas de aneuploidías embrionarias, permitió analizar en profundidad la incidencia de los diferentes tipos de aneuploidías embrionarias en base a la edad materna. Esta revisión constaba de un total de 130.000 biopsias de trofoectodermo (D5) analizadas genéticamente mediante NGS (14).

Incidencia de las diferentes aneuploidías en relación con la edad materna

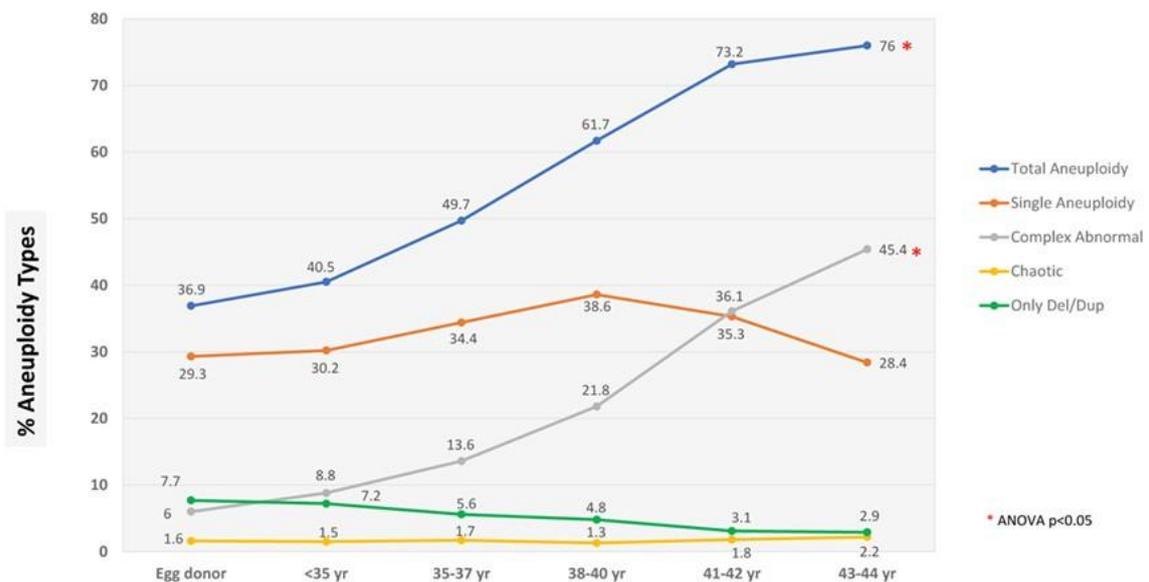


Figura 3. Tomado de “Aplicación clínica de las pruebas de aneuploidía embrionaria mediante secuenciación de última generación” Rubio, C., Rodrigo, L., Garcia-Pascual, C., Peinado, V., Campos, I., Garcia., Simon, C. (2019). Biología de la reproducción. Vol 101. N°6. Pág 1083-1090.

En la Figura 3, se observa como las tasas totales de aneuploidías embrionarias aumentaron según la edad materna, al igual que lo observado en los apartados anteriores. Sin embargo, al no proporcionar los datos separados por franjas de edades más pequeñas, no se pudo apreciar si en esta revisión también se encontraron tasas excesivamente elevadas en los grupos de entre 22 y 23 años, observados anteriormente en las publicaciones de Jason et al., (2014).

Los tipos de aneuploidías se diferenciaron en dos grupos; simples y complejas. En ambos casos la tendencia fue aumentar su incidencia a medida que aumenta la edad materna. Sin embargo, en el caso de las aneuploidías simples, estos valores comenzaron a disminuir a partir de los 38-40 años, en contraposición con las aneuploidías complejas que siguieron una tendencia creciente constante.

Este estudio nos permite evaluar el peso de las aneuploidías por embrión a medida que aumenta la edad de la paciente. El hecho de que a edades más avanzadas sea más común la presencia de aneuploidías complejas, refuerza la idea de que la capacidad de conseguir descendencia se ve disminuida a medida que aumenta la edad de la pareja.

Otra revisión retrospectiva desarrollada por Franasiak et al., (2014) consiguió realizar un análisis genético de 15.169 biopsias de trofoectodermo (D5) mediante qPCR y SNP, mostrando un enfoque muy similar al propuesto por el artículo anterior (13).

Complejidad de las aneuploidías embrionarias en base a la edad materna

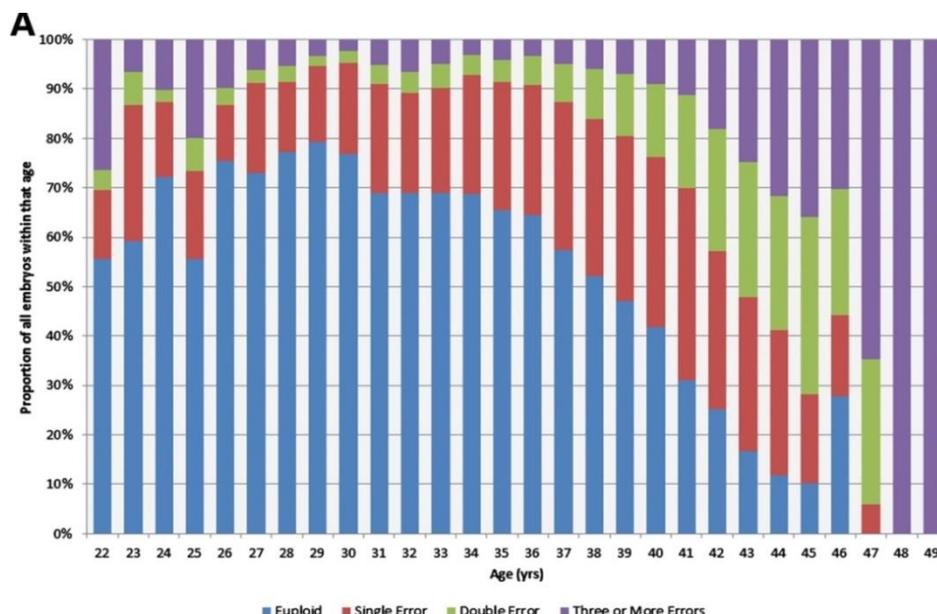


Figura 4. Tomado de “The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening” Franasiak, J. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott Jr, R. T.

Analizando los resultados en la figura 4, se puede observar como efectivamente la hipótesis de partida de esta revisión, una vez más se ve reforzada, observando el aumento del porcentaje de aneuploidías en base al crecimiento de la edad materna.

Al observar detenidamente la evolución de las aneuploidías simples, la gráfica muestra una tendencia a mantener relativamente constantes sus valores a lo largo de todo el abanico de edades, desde los 22 hasta los 44. Excepto, entre los 47 y 49 años, en los que prácticamente desaparecen y son reemplazadas por aneuploidías provocadas por dos o más errores.

Tomando como aneuploidías múltiples las afectadas por dos o más errores, se observa cómo van consiguiendo un mayor protagonismo con el paso de los años, especialmente a partir de los 35-36 años, justamente coincidiendo con lo que se considera EMA.

Es importante destacar que la tendencia acerca de que las tasas de aneuploidías entre las edades de 22 y 25 años sean mayores que en los años posteriores, vuelve a mostrarse en esta revisión una vez más. Interpretando la figura podemos apreciar que mayoritariamente estas aneuploidías presentes entre los 22 y 25 años se deben a aneuploidías ocasionadas por errores múltiples. De este modo, en esta franja de edad no solo encontramos mayores tasas de aneuploidías sino que las anomalías cromosómicas complejas se encuentran en mayor proporción que las simples.

En definitiva, ambas publicaciones muestran unas conclusiones muy similares, destacando el creciente impacto de las aneuploidías con la edad provocando una disminución de la probabilidad a la hora de encontrar embriones euploides. Además, las aneuploidías complejas, formadas por dos o más errores, cobran un mayor impacto especialmente a partir de los 36 años, incrementando su incidencia desde un 10% hasta un 100%, a partir de los 40 años.

3.4 Análisis de los cromosomas más afectados por euploidias

El trabajo retrospectivo de Rubio et al., (2017) aportó datos acerca de 538 embriones biopsiados en D3 mediante aCGH, en los que se analizaron qué cromosomas

fueron los más afectados por las aneuploidías en un grupo de pacientes de entre 38 y 41 años (11).

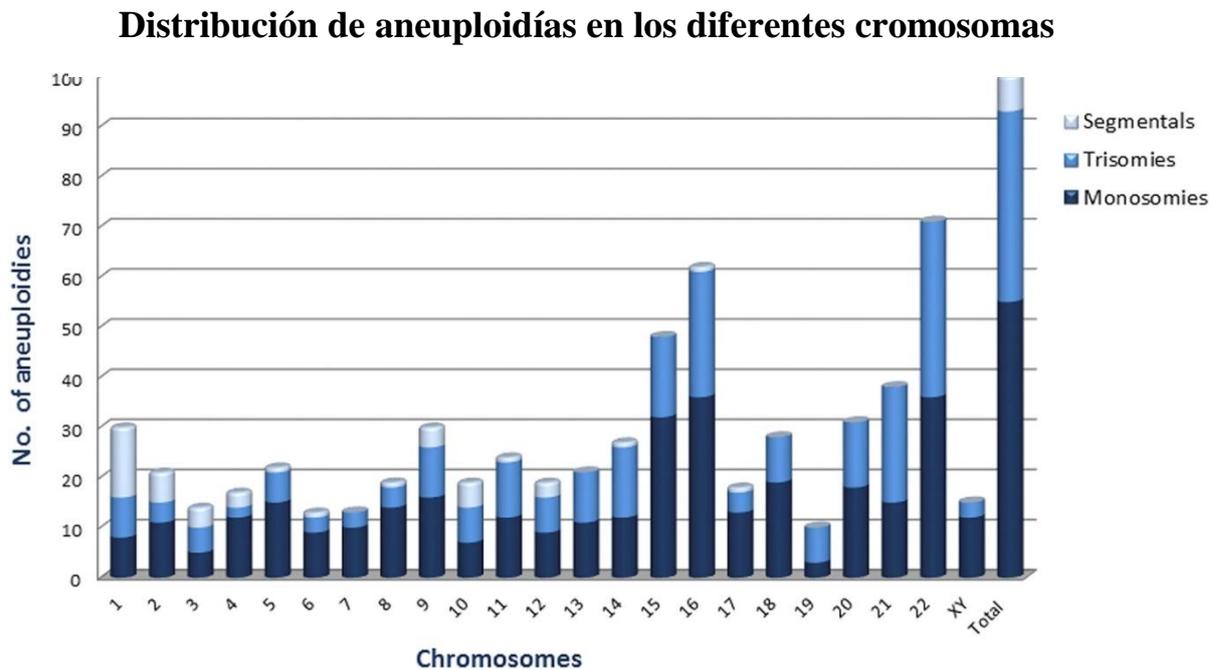


Figura 5. Tomado de “In Vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study” Rubio, C., Bellver, J., Rodrigo, L., Castellón, G., Guillén, A., Vidal, C., ... & Simón, C. (2017). *Fertility and sterility*, 107(5), 1122-1129.

Los resultados mostraron que los cromosomas con mayores tasas de aneuploidías fueron los siguientes: cromosoma 22 (13,6 %), 16 (11,8 %), 15 (9,2%) y 21 (7,1 %).

Estos resultados también fueron corroborados mediante la publicación de Fan et al., (2020), donde se analizó las distribuciones de las aneuploidías en los diferentes cromosomas que conllevaban a abortos en el primer trimestre mediante NGS (12).

De entre los pacientes con abortos espontáneos (AS), el cromosoma más afectado fue el 16, seguido del X, 22, 15 y 21. Además, en el caso de pacientes con abortos de repetición (AR) también fue el 16 el más afectado, seguido de 22, X, 15 y 21 (12).

Si observamos de una forma global los resultados en ambos estudios, se observa que no todas las aneuploidías afectan a todos los cromosomas por igual; de hecho, los

cromosomas 15, 21 y 22, comunes entre ambos estudios, son los que sufren mayores tasas de aneuploidías.

A día de hoy, sigue siendo una incógnita el motivo de por qué algunos cromosomas se ven más afectados por las aneuploidías que otros. Sin embargo, lo que si se ha podido concluir hasta la fecha es que no es fruto del azar el hecho de que ciertos cromosomas presentan mayores tasas de aneuploidías frente a otros.

Por ello, gracias a estos estudios publicados hasta la fecha surge una nueva ventana de investigación que podría llevar a resolver muchas dudas acerca de la naturaleza y el motivo de la aparición de aneuploidías a lo largo del desarrollo embrionario.

3.5 Análisis del porcentaje de blastocistos aneuploides/euploides obtenidos en función de la edad materna

Un estudio retrospectivo dirigido por Demko et al., (2016) acerca de los efectos de la edad materna en las tasas de euploidía supuso una gran fuente de información para conocer el número y porcentaje de embriones euploides recuperados durante la obtención de ovocitos como parte de un tratamiento de FIV (15).

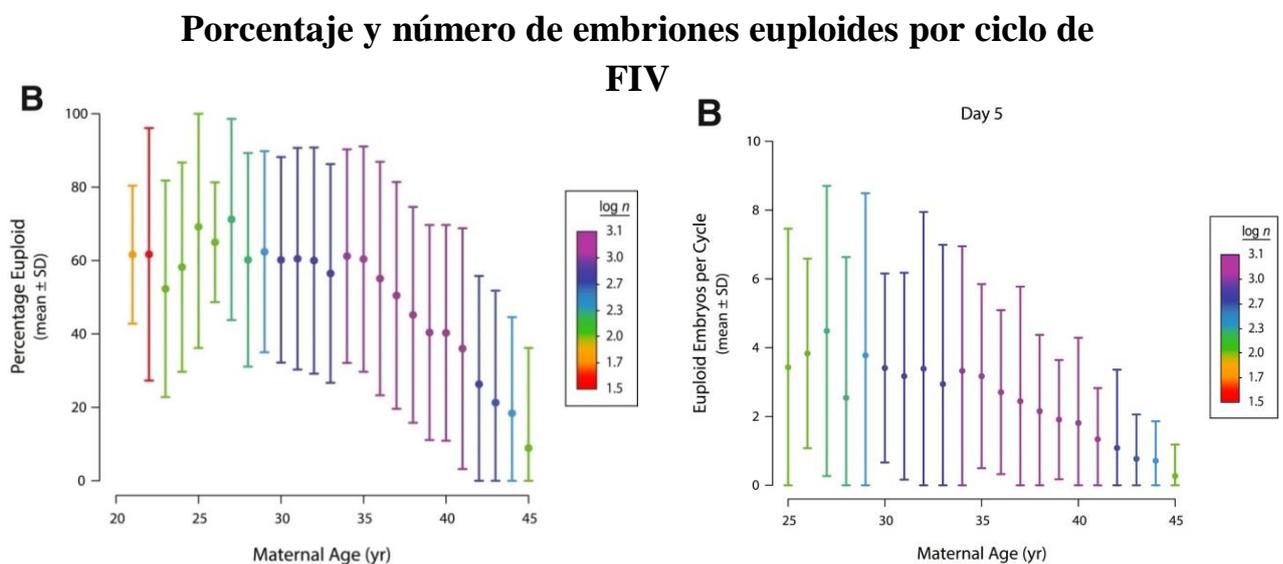


Figura 6. Tomado de “Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism–based preimplantation genetic screening” Demko, Z. P., Simon, A. L., McCoy, R. C., Petrov, D. A., & Rabinowitz, M. (2016). Fertility and sterility, 105(5), 1307-1313.

Según lo previsto y en base a todos los proyectos anteriormente nombrados, el porcentaje y número de embriones euploides obtenidos en cada tratamiento de FIV disminuye a medida que aumenta la edad materna.

En un primer lugar, entre los 20 y 30 años, el porcentaje de embriones euploides obtenidos se mantiene constante oscilando entre los 55% y 65%, dato que coincide con toda la información bibliográfica junto con el rango de edad mayor fertilidad. Sin embargo, según lo esperado, a partir de los 35 años el porcentaje de embriones euploides recuperados sufrió un descenso brusco, llegando hasta valores del 20% de embriones euploides.

Esta tendencia también se ve reflejada al estudiar el número de embriones euploides obtenidos por ciclo de FIV según la edad materna, donde hasta los 35 años se obtienen entre 3 y 5 embriones euploides de media, frente a los 40 años que apenas se obtienen 2 embriones y a los 45 años en los que rondan sobre un único embrión euploide.

En vista de los resultados obtenidos en este estudio, junto con los obtenidos en la revisión de Franasiak et al., (2014) (13), mostrada en la figura 2, se observa también el descenso, aunque más leve, tanto del porcentaje como del número de embriones euploides por ciclo en los pacientes de entre 20 y 25. Asimismo, al igual que Franasiak et al., (2014), ninguno de los trabajos pudo encontrar la razón por la que se dan estos valores excesivamente elevados para la edad de las pacientes.

El hecho de poder conocer tanto los porcentajes como el número de embriones euploides/aneuploides obtenidos según la edad materna permite conseguir trasladar estos conocimientos a la clínica y generar así una mejora en el asesoramiento individualizado al paciente.

Además de lo anteriormente expuesto, una métrica importante para las parejas que se someten a tratamientos de FIV es, conocer la probabilidad de tener al menos un embrión euploide en un ciclo de FIV.

Probabilidad de recuperar al menos un embrión euploide en una cohorte

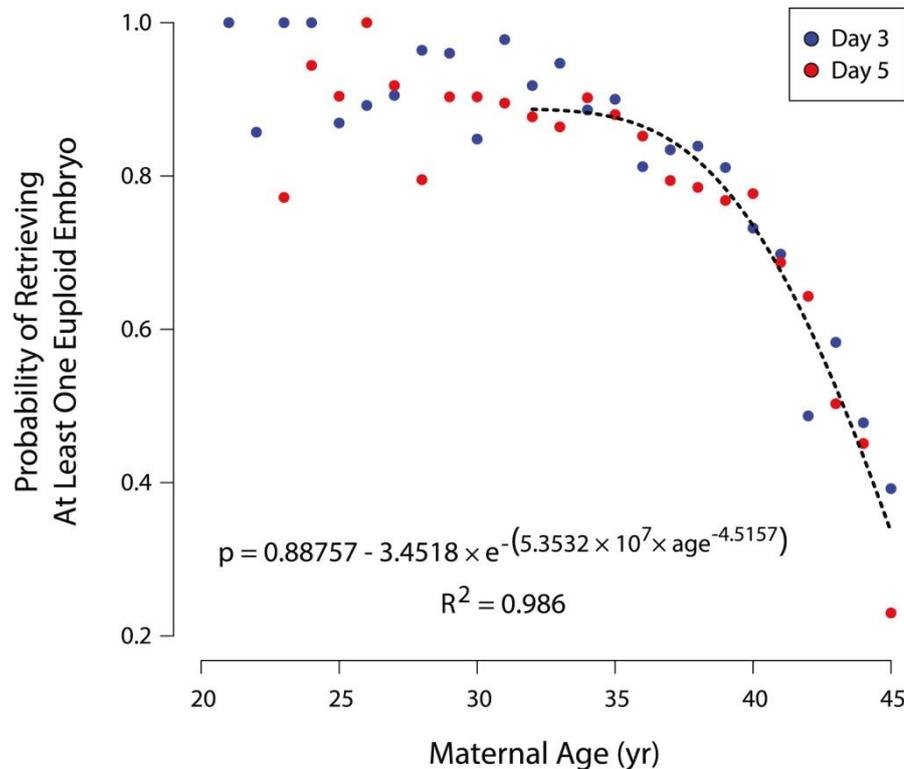


Figura 7. Tomado de “Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism–based preimplantation genetic screening” Demko, Z. P., Simon, A. L., McCoy, R. C., Petrov, D. A., & Rabinowitz, M. (2016). *Fertility and sterility*, 105(5), 1307-1313.

Los resultados expuestos en la figura 7 muestran la probabilidad de recuperar al menos un embrión euploide en una cohorte de embriones en base a la edad materna. Como era de esperar, la probabilidad de recuperar al menos un embrión en mujeres menores a los 35 años fue relativamente alta, entre el 80% y el 100%. Sin embargo, esta tendencia disminuyó drásticamente en mujeres mayores a 35 años, obteniendo valores desde un 80% de probabilidad de obtener un embrión euploide en mujeres de 37 años hasta un 50% en mujeres de 44 años.

Las conclusiones obtenidas por todos estos trabajos son de vital importancia para el asesoramiento clínico de las pacientes de RA. En este sentido, la recopilación y contraste de resultados nos permite predecir con más rigor la probabilidad de éxito, entendida como RNV en casa, de las parejas que por sus características son candidatas a someterse a un ciclo de PGT-A. De este modo, se podría valorar mejor cada caso de forma individual, teniendo en cuenta las variables estudiadas.

3.6 Calidad embrionaria

La edad materna es un factor importante que puede llegar a afectar al resultado de un tratamiento de RA debido a su efecto negativo sobre la calidad embrionaria. Una publicación de Patanayak et al., (2008), evaluó los efectos de la edad sobre la calidad del embrión dividiendo la población (156 embriones evaluados en D3) en tres grupos, <35 años (A), 35-40 años (B) y >40 años (C) **(16)**.

En su estudio, Patanayak, concluyó que la calidad embrionaria disminuía a medida que se incrementaba la edad de los pacientes. Así, la tasa de embriones de mejor calidad (tipo A) fue del 88,2% en el grupo A, del 97,8% en el grupo B y del 58,2% en el grupo C ($p < 0,01$). Asimismo, la tasa de embarazo también disminuyó con el avance de la edad: 33,2% para el grupo A, 28,1% para el B y 16,9 para el C **(16)**.

Otro aspecto interesante a tener en cuenta es si la calidad embrionaria se relaciona con la tasa de aneuploidías. De este modo, un proyecto dirigido por Capalbo et al., (2014), quiso evaluar la correlación entre la morfología del blastocisto, la euploidia y las tasas de implantación. Para ello, analizaron un total de 956 biopsias de trofoectodermo en D5 mediante aCGH, valorando la calidad embrionaria como A, B ó C según la morfología de la Masa Celular Interna (MCI) y Trofoectodermo (TF), en base a los criterios ASEBIR 2013 **(17)**.

De todas las variables embriológicas (morfología embrionaria, día de la biopsia, tamaño del embrión, tiempos de desarrollo entre fases, puntajes de MCI y TE, etc.) analizadas con su posible relación con tasas de aneuploidías, solo la morfología del blastocisto mostró una correlación significativa. Aquellos embriones con las puntuaciones morfológicas más altas mostraron una mayor tasa de euploidía en comparación con los embriones de peor calidad. Las tasas de euploidias fueron de 56,4%, 39,1%, 42,8% y 25,5% en los grupos de morfología excelente, buena, media y mala, respectivamente ($p = 0,01$) **(17)**.

En referencia a la asociación entre la calidad embrionaria y la tasa de implantación tanto Capalbo et al., (2014) **(17)** como González et al., (2019) **(18)** no hallaron diferencias significativas ni en las tasas de gestación ($P > 0,05$) ni en las tasas de RNV ($P > 0,05$), entre embriones de alta y baja calidad.

En definitiva, una alta calidad embrionaria es indicativa de una mayor probabilidad de obtener un embrión euploide, pero no supone un incremento en las tasas de implantación frente a embriones de baja calidad. No obstante, estos análisis no son muy sólidos, ya que el número de embriones euploides de baja calidad transferidos fue bastante pobre, por lo que los resultados no pueden tomarse como representativos.

Otra línea de investigación en relación a la calidad embrionaria fue la desarrollada por Eaton et al., (2009), en la que se estudiaron los parámetros morfológicos embrionarios predictores de euploidía. A priori, de los 703 embriones en D3 analizados mediante PGT-A, parece que tanto la fragmentación, como la multinucleación y grandes asimetrías entre blastómeras durante el desarrollo temprano hasta el D3 de cultivo, sugirieron ser predictores de aneuploidías. Por otro lado, estos autores también encontraron un porcentaje significativamente elevado de embriones aneuploides con morfología de buena calidad en D3. Este hallazgo puede explicarse por el hecho de que el genoma embrionario se activa a partir de D3 de desarrollo, lo que implica que embriones de buena calidad en D3 pueden bloquearse en D5 debido a una carga genética defectuosa, lo que explicaría el alto porcentaje de embriones euploides de buena calidad en D3. Por otro lado, la biopsia de TF ha mostrado el riesgo de mosaicismo en los embriones, por lo que los resultados obtenidos en D3 en algunos embriones no serían del todo válidos **(19)**.

Por otro lado, la calidad embrionaria se puede medir también en función del día en el que el embrión alcanza el estadio de blastocisto (D5, D6, D7), la cual puede influir tanto en las tasas de aneuploidía de los blastocistos como en tasas de RNV y de implantación. Un estudio realizado por Irani et al., (2019), mostró que las transferencias únicas de blastocistos euploides en D5 presentaron una mayor tasa de RNV en comparación con los de día 6 (60,4% frente a 44,8%; $P < 0,001$), así como una mayor tasa de implantación (66,7% frente a 44,6%; $P < 0,001$) **(20)**.

El hecho de obtener tasas de implantación significativamente más altas en transferencias de blastocistos de D5 que en D6, podría ser debido a una mayor sincronía embrión/endometrio o bien que los blastocistos de D6 sean de peor calidad debido a que su desarrollo es más lento **(21)**.

Teniendo en cuenta únicamente la calidad embrionaria, este grupo observó que los embriones con una calidad más alta dieron lugar a tasas mayores de RNV en comparación con los de baja calidad (67,8% frente al 29,5%; $P < 0,001$), así como una mayor tasa de implantación (71,8% frente al 59,3%). Es más, los embriones de peor calidad tuvieron tasas más altas de abortos espontáneos (21,4% frente a 5,6%) (26).

Estos resultados chocan con los expuestos por Capalbo et al., (2014) y González et al., (2019), pero como se ha expuesto anteriormente estos últimos no fueron representativos a diferencia de los mostrados por Irani et al., 2019.

En los últimos años cultivar embriones in-vitro hasta día de blastocisto ha permitido encontrar predictores más fuertes de aneuploidías, concretamente los referidos con el análisis la calidad de la MCI y TF. Minasi et al., (2016) afirma que blastocistos con una calidad B y C de la MCI presentan 0,6 y 1,5 ($P = 0.001$ y $P < 0.001$) veces más de aneuploidías que un blastocisto con una MCI de calidad A. Asimismo, blastocistos con un TF de calidad B y C, presentaron, un 0,8 y 1,2 veces ($P < 0.001$ y $P < 0.001$), respectivamente, más aneuploidías que blastocistos con TF de tipo A (21).

HIPOTESIS

La disminución de la fertilidad en la población femenina es un hecho real que hoy en día llega a afectar a millones de personas alrededor del mundo. Dentro de los múltiples factores que disminuyen la fertilidad, los aspectos genéticos han generado un gran interés en su estudio. Por ello, la realización de una revisión bibliográfica acerca del impacto de la edad materna sobre las aneuploidías embrionarias tiene gran cabida en esta época actual.

El incremento de la incidencia de embriones aneuploides con la edad materna es una evidencia científica ampliamente reportada. Además, parece que también hay un aumento en el número de cromosomas afectos por embrión; sin embargo, los resultados publicados son más heterogéneos. Por ello, nuestra hipótesis es que aquellos pacientes que se han sometido a un ciclo de PGT-A y han tenido embriones aneuploides con un solo cromosoma alterado, podrían optar a un segundo ciclo de PGT-A, porque cabría la

posibilidad de que en dicho ciclo al menos uno de los embriones analizados fuese euploide.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es analizar la incidencia de anomalías cromosómicas por embrión en los ciclos de PGT-A de IVI Zaragoza, para poder establecer la relación entre EMA y tasa de aneuploidías, y proponer un modelo predictivo de probabilidad de tener un embrión euploide dependiendo de la incidencia de cromosomas afectos por embrión en cada pareja.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del Trabajo de Fin de Máster

La revisión bibliográfica del presente Trabajo de Fin de Máster ha sido realizada mediante la búsqueda de artículos científicos publicados entre los años 2007 y 2022. Para la recopilación de artículos científicos han sido consultadas diversas bases de datos de información científica como Web of Science, PubMed, Google Scholar, Fertility and Sterility, NCBI, SciELO, el Registro Nacional de Actividad de la SEF y artículos publicados en la revista ASEBIR. Asimismo, para realizar la búsqueda de artículos científicos se utilizaron palabras claves como “day of biopsy”, “advanced maternal age”, “AMA and embryonic aneuploidies”, “PGT-A techniques”, “maternal age and chromosomal aneuploidies”.

Como criterios de inclusión en la búsqueda bibliográfica se incluyeron aquellos artículos publicados en los últimos 15 años (2007-2022). Sin embargo, en algunas ocasiones han sido incluidos artículos de mayor antigüedad debido a su importancia a la hora de realizar el presente trabajo, como por ejemplo a la hora de ver la evolución de las técnicas de PGT-A a lo largo de la historia. Además, se incluyeron todo tipo de artículos acerca de tasas de aneuploidías, tasas de RNV, tasas de implantación, tasas de abortos, calidad embrionaria y cualquier técnica de PGT-A utilizada para el análisis cromosómico embrionario, relacionado en todo momento con la edad materna de las pacientes.

La mayoría de los artículos a partir de los cuales se ha realizado esta revisión eran artículos experimentales tanto en inglés como en español cuyas conclusiones fueron fruto de resultados estadísticamente significativos, de esta manera las conclusiones de esta revisión fueron extraídos en base a resultados estadísticamente válidos.

2. Diseño del Proyecto

Una vez recopilada toda la información bibliográfica necesaria para el proyecto ***2111-ZAR-102-RH ‘Análisis del impacto de la calidad embrionaria sobre el conjunto de procesos de los ciclos de PGT-A. Influencia sobre la tasa de Recién Nacido Vivo’***, el siguiente apartado de este proyecto será proceder con el estudio retrospectivo, donde se analizará la información de los blastocistos biopsiados procedentes de pacientes con ciclos de PGT-A realizados en la clínica IVI Zaragoza durante el periodo de tiempo 2017-Junio y 2022-Junio, ambos incluidos.

Para ello, los embriones se dividen en función de su calidad embrionaria (A, B, C, D) según los criterios de ASEBIR y se calcula tanto las tasas de euploidia como de aneuploidía, para así observar si existe una relación entre calidad embrionaria e información genética, teniendo siempre en cuenta tanto la edad materna como el día de biopsia embrionaria. Asimismo se revisará si a medida que aumenta la edad de la paciente, el número de cromosomas alterados por embrión aumenta, así como el tipo de cromosoma afecto.

Finalmente, y con todos los datos proporcionados, se establecerá un modelo predictivo de éxito en función de si un embrión es de tipo A, B, C, D, modulado por la edad de la paciente y por el día de la biopsia embrionaria.

3. Metodología estadística

3.1 Base de datos

La base de datos se definirá rigurosamente con las variables destinadas a ser analizadas en función de los objetivos planteados. La información necesaria será incluida en una base de datos en formato Excel, donde se detallarán las variables a analizar.

Los datos de este estudio serán seudonimizados, puesto que el investigador recibirá los datos sin ninguna identificación, aunque la persona que los extraiga conservará la información que permita su reidentificación. Existe separación técnica y funcional entre el investigador y quien extraiga los datos, tal y como exige la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.

Serán aplicadas las «Buenas Prácticas Clínicas» (Good Clinical Practices o GCP), que se adoptaron en la UE en julio de 1996 y están impuestas por las Directivas 2001/20/CE, Directiva 2001/83/CE, 2005/28/CE y el art. 47 del Reglamento 536/2014, aplicando el conjunto de requisitos éticos y científicos de calidad reconocidos a escala internacional, que deberán cumplirse en la planificación, la realización, el registro y la comunicación de los ensayos clínicos en que participen seres humanos.

Su cumplimiento garantiza la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar de los sujetos del ensayo, así como la fiabilidad de los resultados del ensayo clínico.

Finalmente, y previo paso al estudio estadístico, se llevará a cabo un análisis exploratorio de datos para revisar la calidad de la información extraída.

3.2 Variables de estudio

3.2.1 Variables dependientes

Codificación	Tipología
RNV	Numérica discreta
N_EMBRIONES_TOTALES	Numérica discreta
N_EMBR_BIOPSIADOS	Numérica discreta
TASA DE EMBRIONES EUPLOIDES N_EMB_EUPLOIDES	Numérica discreta
TASA DE EMBRIONES ANEUPLOIDES N_EMBR_ANEUPLOIDES	Numérica discreta
TASA DE EMBRIONES MOSAICO N_EMB_MOSAICO	Numérica discreta
TASA DE EMBRIONES NO INFORMATIVOS N_EMB_NO_INFORMAT	Numérica discreta
TASA DE IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES EUPLOIDES IMPLANTACION_BT	Numérica discreta
TASA GEST_EVOL EMBRIONES EUPLOIDES	Dicotómica (0,1)

TASA DE ABORTO EMBRIONES EUPLOIDES	Dicotómica (0,1)
TASA REBIOPSIA EMBRIONES NI	Numérica discreta
TASA EUPLOIDÍA EMBRIONES REBIOPSIADOS	Numérica discreta
TASA ANEUPLOIDÍA EMBRIONES REBIOPSIADOS	Numérica discreta
TASA MOSAICISMO EMBRIONES REBIOPSIADOS	Numérica discreta
TASA DE SUPERVIVENCIA EMBRIONARIA EMB. EUPLOIDES TRAS DESVITRIFICAR	Dicotómica (0,1)
VALOR MAPD	Numérica discreta
TASA DE PULLING/FLICKINGTECNICA_BIOPSIA	Numérica discreta
TASA DE EMBRIONES EUPLOIDES EN FUNCIÓN DE PULLING/FLICKING	Categórica
TASA DE EMBRIONES ANEUPLOIDES EN FUNCIÓN DE PULLING/FLICKING	Categórica
TASA DE EMBRIONES NI EN FUNCIÓN DE PULLING/FLICKING	Categórica
TASA DE EMBRIONES MOSAICO EN FUNCIÓN DE PULLING/FLICKING	Categórica
TASA CALIDAD CÉLULAS BIOPSIADAS	Categórica
N_T_CROMOSOMAS AFECTOS EN FUNCION DE EDAD MATERNA	Numérica discreta
N_CROMOSOMAS AFECTADOS	Numérica discreta
TIPO_CROMOSOMAS_AFECTADOS	Numérica discreta

3.1.2 Variables independientes

Codificación	Tipología
EDAD_PACIENTE	Numérica discreta
EMBR_CALIDAD	Categórica ordinal
DÍA DE BIOPSIA EMBRIONARIA	Numérica discreta
ID_PACIENTE	Campo clave
ID_PRO_TTO	Campo clave
TRANSFER_DT	Fecha

3.3 Tamaño muestral y potencia del estudio

Dado que se trata de un estudio retrospectivo, no es necesario el cálculo del tamaño muestral propiamente dicho. No obstante, según búsquedas preliminares realizadas en la base de datos, se estiman en torno a 600 pacientes que cumplan con los criterios de selección indicados en este protocolo.

Dado este número de pacientes y el objetivo principal del estudio, se estima que la potencia estadística será superior al 87% y por lo tanto, será suficiente para extraer conclusiones fiables de los análisis que vamos a llevar a cabo.

3.4 Análisis descriptivo

Para las variables cuantitativas, se utilizarán los estadísticos de resumen habituales: medidas de localización como el máximo, mínimo, cuartiles, y medida de dispersión como la media y la desviación típica. Además, se presentarán intervalos de confianza al 95% para el valor de la media, y los coeficientes de asimetría de Pearson y el coeficiente de Curtosis, junto a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de la variable. Gráficamente, se representarán los datos mediante histogramas y diagramas de cajas y bigotes o diagramas de barras, dependiendo si la variable cuantitativa es continua o discreta.

Para las variables cualitativas se proporcionarán tablas de frecuencia y proporciones junto a intervalos de confianza al 95%. Gráficamente, se emplearán diagramas de barras para representar los datos.

3.5 Análisis de homogeneidad

Dada la naturaleza retrospectiva del análisis, es conveniente realizar comparaciones estadísticas de las medias y las proporciones mediante tests de T Student y Chi cuadrado entre las variables de control más relevantes, relacionadas con las medidas principales de éxito o resultados, para comprobar que no existen desviaciones en cada una de estas variables según el tratamiento que pretendemos comparar.

En el caso de comprobarse desviaciones significativas, estas variables entrarían a formar parte de los modelos de regresión y por tanto se usarían para ajustar la relación entre las variables de exposición y respuesta.

3.6 Plan de trabajo

FASE I: Revisión bibliográfica del tema de estudio.

FASE II: Propuesta de proyecto de investigación, aceptación por los organismos competentes.

FASE III: Exportación de datos, revisión y tratamiento estadístico.

FASE IV: Realización enmienda

FASE V: Nueva exportación de datos, revisión y tratamiento estadístico.

FASE VI: Resultados y conclusiones.

FASE VII: Publicación en revistas científica

		2022											
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Fase I													
Fase II													
Fase III													
Fase IV													
Fase V													

		2023											
		Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Fase I													
Fase II													
Fase III													
Fase IV													
Fase V													
Fase VI													
Fase VII													

CONCLUSIONES

En base a la bibliografía analizada en el presente TFM, cuyo objetivo principal ha sido estudiar el impacto en la tasa de aneuploidías cromosómicas por embrión en pacientes de EMA, se puede concluir que:

1. El uso de técnicas de PGT-A en RA ha permitido mejorar las tasas de RNV especialmente en pacientes con EMA donde se ha conseguido obtener tasas similares a las de grupos de entre 20 y 35 años. Gracias a ello, hoy en día PGT-A ha conseguido implantarse como técnica de uso diario en los laboratorios de RA.
2. Las tasas de aneuploidías embrionarias aumentan en base a la edad materna, especialmente a partir de los 35 años, edad en la que aumenta considerablemente la dificultad de obtener un RNV sano en casa.
3. Tanto las aneuploidías simples como las complejas aumentan su incidencia a medida que aumenta la edad materna. Sin embargo, las aneuploidías simples, disminuyen su incidencia a partir de los 38 años, en contraposición con las aneuploidías complejas que mantienen su tendencia de crecimiento constante.
4. Tanto el porcentaje como el número de embriones euploides recuperados por ciclo de FIV presentan una correlación negativa con la edad de las pacientes.
5. La edad materna disminuye la calidad embrionaria, al igual que, la mala calidad embrionaria influye negativamente sobre las tasas de RNV y de implantación, encontrando mayores tasas de abortos espontáneos en embriones de peor calidad.
6. Hacen falta más estudios que correlacionen la incidencia de anomalías cromosómicas por embrión en función de la edad materna, para poder ofrecer mejor consejo clínico a los pacientes de RA.

BIBLIOGRAFIA

1. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2007 [citado el 2 de septiembre de 2022];16 Spec No. 2(R2):R203-8. Disponible en: <https://academic.oup.com/hmg/article/16/R2/R203/2357411>
2. Hassold T, Hunt P. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2009 [citado el 2 de septiembre de 2022];21(6):703–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/MOP.0b013e328332c6ab>
3. Hardy K, Hardy PJ. 1(st) trimester miscarriage: four decades of study. *Transl Pediatr* [Internet]. 2015 [citado el 2 de septiembre de 2022];4(2):189–200. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2015.03.05>
4. Choi TY, Lee HM, Park WK, Jeong SY, Moon HS. Spontaneous abortion and recurrent miscarriage: A comparison of cytogenetic diagnosis in 250 cases. *Obstet Gynecol Sci* [Internet]. 2014 [citado el 2 de septiembre de 2022];57(6):518–25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25469342/>
5. Shahbazi MN, Wang T, Tao X, Weatherbee BAT, Sun L, Zhan Y, et al. Developmental potential of aneuploid human embryos cultured beyond implantation. *Nat Commun* [Internet]. 2020 [citado el 2 de septiembre de 2022];11(1):3987. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17764-7>
6. Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, Recher G, Hupalowska A, Bolton V, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2016 [citado el 2 de septiembre de 2022];18(6):700–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3347>
7. Palacios Ortega S, López Moratalla N. Retraso de la edad de la procreación, incremento de la infertilidad y aumento del recurso a la reproducción asistida. Consecuencias en la salud de los hijos. *Cuad Bioet* [Internet]. 2011;XXII(2):259–72. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87519895008>
8. Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2007;14(5):628–34. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310610577>

9. Rabinowitz M, Ryan A, Gemelos G, Hill M, Baner J, Cinnioglu C, et al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil Steril* [Internet]. 2012 [citado el 2 de septiembre de 2022];97(2):395–401. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(11\)02810-X/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(11)02810-X/fulltext)
10. Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, et al. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* [Internet]. 2013 [citado el 2 de septiembre de 2022];100(6):1695–703. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(13\)02811-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(13)02811-2/fulltext)
11. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castellón G, Guillén A, Vidal C, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril* [Internet]. 2017 [citado el 2 de septiembre de 2022];107(5):1122–9. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(17\)30254-6/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(17)30254-6/fulltext)
12. Fan L, Wu J, Wu Y, Shi X, Xin X, Li S, et al. Analysis of chromosomal copy number in first-trimester pregnancy loss using next-generation sequencing. *Front Genet* [Internet]. 2020 [citado el 2 de septiembre de 2022];11:545856. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2020.545856>
13. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* [Internet]. 2014 [citado el 2 de septiembre de 2022];101(3):656–663.e1. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(13\)03257-3/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(13)03257-3/fulltext)
14. Carmen Rubio, Lorena Rodrigo, Carmen Garcia-Pascual, Vanessa Peinado, Inmaculada Campos-Galindo, Sandra Garcia-Herrero, Carlos Simón, Aplicación clínica de las pruebas de aneuploidía embrionaria mediante secuenciación de última generación, *Biología de la reproducción*, volumen 101, número 6, diciembre 2019, páginas 1083–1090
15. Demko ZP, Simon AL, McCoy RC, Petrov DA, Rabinowitz M. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening. *Fertil Steril* [Internet]. 2016 [citado el 2 de septiembre de 2022];105(5):1307–13. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(16\)00066-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(16)00066-2/fulltext)

16. Patanayak MC. Correlation between embryo quality, age & IVF/ICSI outcome. *Fertil Steril* [Internet]. 2008 [citado el 2 de septiembre de 2022];90:S430–1. Disponible en: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(08\)02958-0/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(08)02958-0/fulltext)
17. Antonio Capalbo, Laura Rienzi, Danilo Cimadomo, Roberta Maggiulli, Thomas Elliott, Graham Wright, Zsolt Peter Nagy, Filippo Maria Ubaldi, Correlación entre la morfología estándar del blastocisto, la euploidía y la implantación: un estudio observacional en dos centros con 956 blastocistos examinados, *Reproducción humana* , Volumen 29, número 6, junio de 2014, páginas 1173–1181.
18. Viñals Gonzalez X, Odiá R, Naja R, Serhal P, Saab W, Seshadri S, et al. Euploid blastocysts implant irrespective of their morphology after NGS-(PGT-A) testing in advanced maternal age patients. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2019;36(8):1623–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-019-01496-9>
19. Eaton JL, Hacker MR, Harris D, Thornton KL, Penzias AS. Assessment of day-3 morphology and euploidy for individual chromosomes in embryos that develop to the blastocyst stage. *Fertil Steril* [Internet]. 2009 [citado el 2 de septiembre de 2022];91(6):2432–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440522/>
20. Irani M, Reichman D, Robles A, Melnick A, Davis O, Zaninovic N, et al. Morphologic grading of euploid blastocysts influences implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril* [Internet]. 2017 [citado el 2 de septiembre de 2022];107(3):664–70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28069172/>
21. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod* [Internet]. 2016 [citado el 2 de septiembre de 2022];31(10):2245–54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27591227/>