



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA



**APROXIMACIÓN AL ESTADO GENÉTICO DEL EMBRIÓN
MEDIANTE SU ESTUDIO MORFOLÓGICO
Y AL RESULTADO DE UN CICLO DE DIAGNÓSTICO
GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN FUNCIÓN DE LA
INDICACIÓN**

Memoria para optar al grado de Doctor
presentada por

M^a del CARMEN CAÑADAS GÁLVEZ

Directores

**PROF. Dr. JOSÉ MANUEL BAJO ARENAS
Dr. VICENTE BADAJOZ LIÉBANA**

MADRID, 2 016

“Quid Ultra Faciam?”

“If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants”

“Quod Natura non dat, Salmantica non praestat”

“Eppur si muove”

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que son “mi circunstancia” porque me hacen yo (que no vamos a discutir ahora a D. José Ortega y Gasset).

A mis compañeros de laboratorio porque para conseguir un embrión hace falta todo un equipo y para “vigilarlo” un buen equipo.

A mis asesores matemáticos por una ayuda “estadísticamente significativa”.

A mi soporte informático por no dejarme colgada.

A las chicas del CME por iluminarme (con sus sondas fluorescentes).

A los factores que ayudan y a los que no, porque todos me hicieron perseverar.

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

ÍNDICE

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

INTRODUCCIÓN	11
ESTADO ACTUAL DEL ARTE.	13
CRITERIOS DEL ANÁLISIS DE LOS EMBRIONES	14
DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODO	25
SELECCIÓN DE CASOS.	27
OBTENCIÓN DE EMBRIONES.	28
BIOPSIA EMBRIONARIA.	30
FIJACIÓN O ENTUBADO CELULAR.	31
RESULTADO DEL DIAGNÓSTICO.	32
TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	51
PERSPECTIVAS FUTURAS	63
CONCLUSIONES	67
ABREVIATURAS	71
ANEXOS	79
ANEXO 1: INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.	81
ANEXO 2: ESTIMULACIÓN OVÁRICA.	86
ANEXO 3: OBTENCIÓN Y BIOPSIA DE EMBRIONES.	86
ANEXO 4: FIJACIÓN O ENTUBADO CELULAR.	88
ANEXO 5: TRANSFERENCIA EMBRIONARIA.	88
ANEXO 6: RESULTADOS.	89
ANEXO 7: COMUNICACIONES PRESENTADAS.	143
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

INTRODUCCIÓN

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

ESTADO ACTUAL DEL ARTE

La publicación en 1978 –por parte de Edwards y Steptoe [4]- del caso de Louise Brown (Figura 1), habla no sólo del nacimiento de la primera persona concebida en un laboratorio sino de una nueva era: la era de la Reproducción Humana Asistida, que parece llegar a un punto álgido en 1992 con la realización de la primera ICSI [6]; aunque desde Aristóteles el asunto de la reproducción ha preocupado a la sociedad tanto desde el punto de vista práctico como desde el punto de vista ético [5].



Figura 1: Primer “niño probeta”.

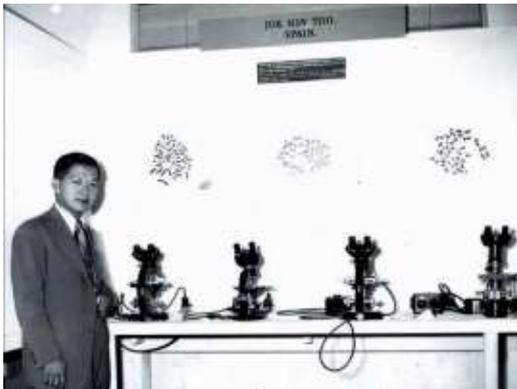


Figura 2: Primer cariotipo humano.

En el campo de la genética, son el descubrimiento de la estructura molecular del ADN (Watson y Crick, 1953) [7] y la determinación del número de cromosomas de nuestra especie (Tjio, 1956) [8] (Figura 2), lo que supone los mayores avances.

Finalmente ambos campos, la reproducción asistida y la genética, convergen en 1989, con el grupo de Handyside [9] (Figura 3) el primer estudio genético de un embrión humano -que ya en 1968 Edward y Harper llevaron a cabo con éxito sobre un embrión de conejo-, como alternativa al diagnóstico prenatal.

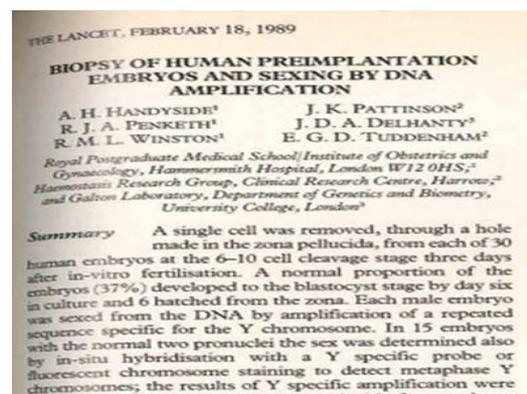


Figura 3: Publicación primeros DPI en humanos.

A día de hoy, la secuenciación completa del genoma de una única célula y la incubación embrionaria en condiciones de vigilancia continua ocupan nuestro empeño.

Podemos, por tanto, resumir que el estudio, comprensión y práctica de la reproducción humana no es sólo una disciplina que nació en 1978, sino que ha ocupado a la comunidad científica a lo largo de los años, forjando las sólidas bases que han permitido alcanzar el nacimiento de más de cinco millones de niños hasta el momento actual.

CRITERIOS DEL ANÁLISIS DE LOS EMBRIONES

La embriología es el estudio de la formación y el desarrollo de los embriones, basándose en parámetros clásicos relacionados con la viabilidad y potencial del embrión. La caracterización de dichos parámetros morfológicos, reflejo de su fisiología, sólo necesita de un microscopio invertido; es por eso que son de uso común en todos los laboratorios, ya que pese a la existencia de otras técnicas, como la metabolómica o la morfocinética, no todos los laboratorios tienen acceso a esos avances.

Diversos criterios, han sido propuestos por distintos grupos para ayudar a catalogar y, en último extremo, a elegir los embriones que serán transferidos prioritariamente.

Así, en cada etapa del desarrollo embrionario, los parámetros a tener en cuenta varían y son:

▪ **EN EL ZIGOTO**

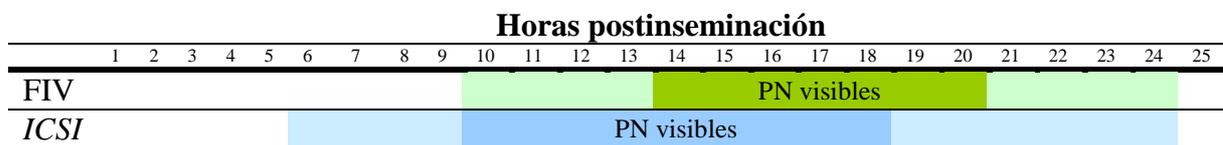
Aunque la fecundación es fácil de definir [15], implica infinidad de procesos y reacciones bioquímicas como la reacción acrosómica, la fusión de las membranas ovocitaria y espermática y finalmente la activación del ovocito [16-18] que conlleva:

1º.- Descondensación de la cabeza del espermatozoide y formación del PN masculino, en posición central en el ovocito. El 90% de los ovocitos

muestran ondas circulares de granulación en este momento, con una periodicidad de 20-53 minutos [21-22].

2º.- Culminación de la segunda división meiótica -extrusión del segundo CP- y formación del PN femenino cerca de dicho CP [19,22]. Posteriormente se da la polarización [19-20]; es decir, la migración del PN femenino hacia el masculino, aunque nunca llegan a fusionarse, mientras van aumentando de tamaño y se va dando la reordenación de los precursores de los CPN o “nucleolos” hacia la zona de contacto entre PN.

El proceso de la aparición y polarización de los PN es visible entre las 10-20 horas tras la inseminación ya sea por FIV o por ICSI [27]. (**Esquema 1**)



Esquema 1: Aparición de los pronúcleos después de inseminar (FIV) o microinyectar (ICSI) ovocitos humanos. Las barras de color más tenue representan el periodo de tiempo que tardan en aparecer 2PN en al menos el 10% de los ovocitos. Las de color más opaco representan el periodo de tiempo que tardan en aparecer 2PN en al menos el 90% de los ovocitos.

Pese a que la presencia de los 2 PN no es prueba absoluta de fecundación normal, los cigotos que presentan 3 o más PN son descartados, por inviabilidad, y los que muestran 1 PN se mantienen en observación para vigilar su evolución; la cronología, morfología y localización de los PN, así como la de los nucleolos e incluso su situación respecto a los CP, se emplea como factor de clasificación embrionaria, asumiendo que aquellos embriones de categoría 1ª y 2ª tienen mayor probabilidad de implantación.

La disolución de los PN, coincide en los mamíferos con la primera fase del comienzo del desarrollo del nuevo organismo, la condensación del material nuclear -apareamiento de los cromosomas- y la formación del huso mitótico de la primera división celular y el estado retrasado de los PN [76] está asociado a mal desarrollo embrionario, ya que estos defectos suelen asociarse a la capacidad organizadora de los microtúbulos por parte del centrosoma introducido por el espermatozoide.

❖ Bavister [58] fue el primero en buscar criterios de selección por “tiempos críticos” (16-18 h. postinseminación y 40 h., justo antes de la transferencia) frente a la examinación arbitraria que se daba hasta entonces.

❖ El tamaño y proximidad de los PN y número y localización de los nucleolos [24,26] (Figura 4):

Z1: Igual número de nucleolos o diferencia en menos de 3. Polarizados en la zona de contacto entre PN

Z2: Igual número de nucleolos pero despolarizados, en ambos PN.

Z3: Asincronía (la polarización se da sólo en uno de los PN) y distinto número de nucleolos (diferencia en más de 3).

Z4: Distinto tamaño de los PN, separación entre ellos o número de nucleolos de menos de 3 en alguno de los PN.

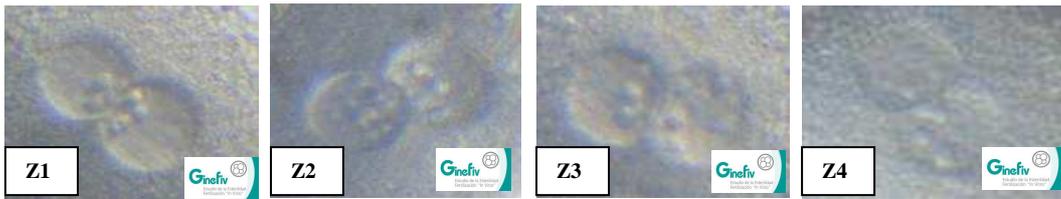


Figura 4: Ejemplos de pares de PN definidos por cada clasificación.

❖ La polaridad de los PN respecto a los CP y magnitud del ángulo comprendido entre la línea imaginaria que atraviesa ambos PN y el CP más alejado de esta línea. Los valores óptimos son menores de 50° [25] (Figura 5).

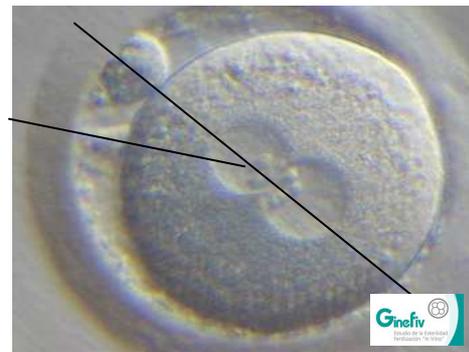


Figura 5: Ángulo entre el eje de los PN y los CP.



Figura 6: Escotadura en el cigoto para primera división celular y formación de la membrana intercelular.

❖ La rotura de la membrana nuclear (desaparición de los PN) y el “cleavage” temprano a 2 células. [23,40-41] (Figura 6).



Figura 7: Imagen del halo citoplasmático, señalado con una flecha.

❖ La presencia de una zona cortical clara (**Figura 7**) debida a condensación perinuclear en el cigoto [22-23,28].

▪ EN LA DIVISIÓN CELULAR (D+2 y D+3)

Una vez se inicia la división celular, los criterios de evaluación clásicos nos hablan de la “calidad” embrionaria; dichos parámetros son: número de células –lo que implica ritmo de división-, fragmentación celular –porcentaje y tipo-, vacuolización, número de núcleos por célula, tamaño de las células –simetría-, compactación celular...

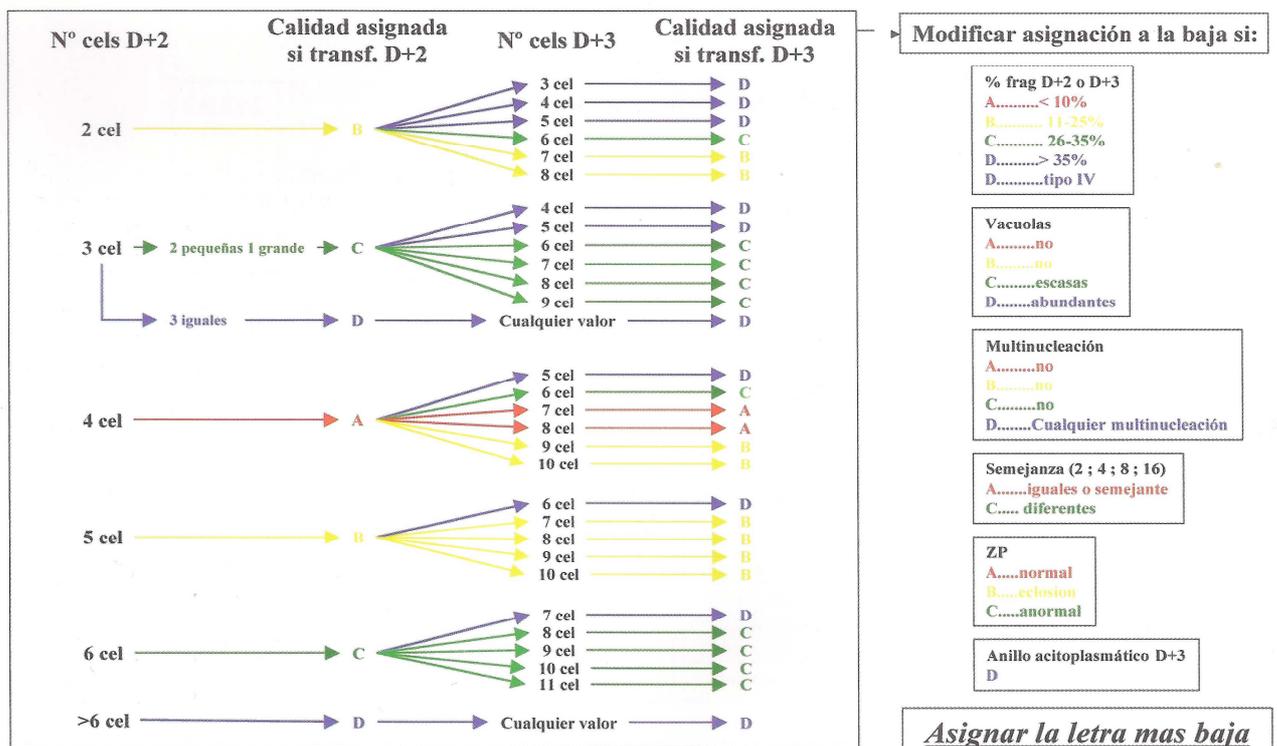
❖ El número de células nos habla del ritmo de división y éste del potencial de implantación embrionaria. Lo ideal es que las divisiones sean sincrónicas y simétricas [30,54-55].

❖ La formación de fragmentos es un hecho que se observa con frecuencia en el desarrollo “in vitro” de embriones humanos. Los fragmentos son vesículas citoplasmáticas, con membrana superficial –algo diferente a la de los blastómeros- y sin núcleo, que pueden estar relacionados con desórdenes de cario y citocinesis así como con procesos de apoptosis [21,45-49].

❖ La presencia de blastómeras multinucleadas suele considerarse el más inexacto de los criterios -al ser un fenómeno temporal y dependiente, en gran medida, del momento de revisión de los embriones- aunque puede hacer que se descarte un embrión, puesto que está asociado a bajas tasas de implantación [51-55].

Finalmente, dichos criterios pueden resumirse en el siguiente cuadro propuesto (**Esquema 2**) [54], que ayuda a clasificar los embriones viables en cuatro categorías.

¿Es predecible el estado genético de un embrión?



Esquema 2: Esquema de gradación propuesto, por ASEBIR, para el trabajo diario.

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

EL DPI se presenta como un método de prevención primaria que permite evitar la presencia de enfermedades o alteraciones genéticas antes incluso de que se produzca la gestación [12]; su procedimiento puede incluir diferentes modalidades de técnicas citogenéticas, como la hibridación “in situ” con sondas de fluorescencia (FISH)- para el estudio de reordenaciones cromosómicas o aneuploidías- o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -si se trata de detectar una mutación o marcador genético- para enfermedades monogénicas.

Siguiendo las indicaciones de la ley de reproducción asistida, la ESHRE y apoyados en numerosas publicaciones [11,82-87], el DPI se propone a las siguientes parejas:

- a) Pacientes de bajo riesgo, entre las que podemos incluir:
 - ↳ Mujeres con edad materna avanzada (EMA), mayores de 37 años [181-182].

- ↳ Pacientes estériles con 2 ciclos de FIV sin embarazo (Fallo de FIV) [243-244].
 - ↳ Abortadoras de repetición (2 o más abortos previos) [208-209].
 - ↳ Abortos previos con cariotipo alterado [217-218].
 - ↳ Factor masculino severo (azoospermias u oligozoospermias severas) [230-232,239].
 - ↳ Pacientes con meiosis patológica o resultado de FISH en espermatozoides alterado [233-235,237,240-241].
- b) Pacientes de alto riesgo para transmitir anomalías genéticas o cromosómicas:
- ↳ Monogénicas: autonómicas recesivas, dominantes y ligadas a X.
 - ↳ Estructurales: translocaciones, inversiones u otras aberraciones estructurales [205,219].

La técnica del DPI es el resultado de la combinación de la fecundación “in vitro” (realizada habitualmente por ICSI), la biopsia de células embrionarias por medio de la micromanipulación y las técnicas de diagnóstico genético. Tal como se comunica a las pacientes en el consentimiento informado de nuestro centro (Ginefiv, Madrid) (**Anexo 1**).

Las TRA tienen como finalidad fundamental la actuación médica para facilitar la procreación cuando otras terapéuticas se hayan descartado por inadecuadas o ineficaces.

También pueden utilizarse en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético o hereditario, cuando sea posible recurrir a ellas con suficientes garantías diagnósticas y terapéuticas, y estén estrictamente indicadas: con razonables posibilidades de éxito y sin riesgo grave para la salud de la mujer o de la posible descendencia.

El marco jurídico regulador del DPI está constituido básicamente por la Ley 14/2006 de 26 de mayo sobre TRA, regulada por el Real Decreto 42/2010 que establece que toda intervención sobre el embrión vivo, “in

vitro”, con fines diagnósticos, no podrá tener otra finalidad que la valoración de su viabilidad o la detección de enfermedades hereditarias en los embriones, a fin de tratarlas o de desaconsejar su transferencia. Asimismo, cuando los fines que se persiguen son terapéuticos, la intervención no puede tener otro propósito que el de tratar una enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas.

Debe significarse, igualmente, la relevancia para ésta técnica del Convenio de Oviedo sobre derechos humanos y biomedicina, de 1997, que limita las pruebas predictivas de enfermedades genéticas a fines médicos o de investigación médica y con un asesoramiento genético apropiado [2,3].

De cualquier modo, cabe hacer constar que la inmensa mayoría (>90%) de análisis realizados en nuestro estudio tenían como finalidad la detección de aneuploidías; y ante esto no se aplica tan estrictamente la imagen de consejo genético respecto a terapéutica de enfermedades sino al riesgo de su incidencia y consecuencias.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

HIPÓTESIS

Se sabe que las principales causas de fracaso reproductivo –tanto no gestación como aborto– son incorrecciones genéticas en el embrión; pero la actual Ley de Reproducción Asistida 14/2006 [1] no permite realizar diagnóstico preimplantacional (DPI) más que en determinados casos, en los que parece objetivo el riesgo de alteraciones genéticas.

Se baraja por tanto la hipótesis de que la observación clásica de factores morfológicos embrionarios nos permite hacer una aproximación al estado cromosómico de los mismos.

Mediante un estudio realizado en nuestro centro, **Ginefiv** (Centro para el Estudio de la Esterilidad y Fertilización “in vitro”, Madrid), trataremos de encontrar, si lo hay, el modo de correlacionar los criterios de clasificación convencionales con el estatus genético de los embriones, a fin de realizar la mejor de las selecciones posibles.

OBJETIVOS

Mediante este estudio observacional, de carácter prospectivo, transversal, intentaremos establecer como cierta la hipótesis de partida fijándonos los siguientes objetivos principales:

- a) Analizando, como objetivos principales, la relación del resultado del análisis genético:
 - 1) En función de las características del cigoto: Z-score, ángulo formado por los CPs y presencia de halo.
 - 2) En función de los primeros estados de división celular: n° de céls. en D+2 y D+3, porcentaje de fragmentación celular en D+3 y evolución en D+4, posterior a la biopsia.
 - 3) En función de los antecedentes clínicos e indicación para la realización del DPI.

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

b) Analizando, como objetivos secundarios:

- 4) En función de la indicación para la realización del DPI.
- 5) En función del nº de embriones biopsiados.
- 6) En función del nº de embriones normales.

MATERIAL Y MÉTODO

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

SELECCIÓN DE CASOS

En este estudio se analizan 1425 embriones, obtenidos en ciclos de TRA realizados en nuestro centro (Ginefiv, Madrid) entre el 1 de enero de 2007 y el 31 de diciembre de 2011, biopsiados para la realización de DPI, en los que se determina tanto la clasificación pronucleolar (“Z-score”) como otros factores de evolución clásicos (número y simetría de blastómeras, porcentaje de fragmentación celular) y, finalmente, la integridad cromosómica o el “estado genético”.

Todas las pacientes, con rango de edad entre 25 y 46 años (media de $36,49 \pm 3,98$ años), presentaban alguna de las indicaciones para el tratamiento incluidas entre los casos aceptados por la ley.

La estimulación ovárica se realiza, según los protocolos establecidos en la clínica, atendiendo a las necesidades de cada paciente (**Anexo 2**); que se distinguen según los indicadores de reserva ovárica en: altas respondedoras, más de 15 folículos antrales en ecografía basal o criterios de ovario poliquístico (PCOS) según los Criterios Internacionales de Rotterdam; bajas respondedoras, según los criterios internacionales del Consenso de Bologna 2011, y pacientes normo respondedoras, con ciclos regulares, ovulatorios, ovarios ecográficamente normales y niveles hormonales normales en analítica basal (TSH, prolactina, FSH, LH y estradiol).

Durante la estimulación ovárica se emplean análogos de la GnRH para prevenir los picos endógenos de LH y evitar ovulaciones prematuras. Así se utilizan pautas con agonistas de la GnRH, en pauta larga o corta, y antagonistas de la GnRH en pauta multidosis en inducción el día que el folículo de mayor tamaño alcanza 13 mm.

Se utiliza tratamiento con FSH recombinante o HMG, iniciado desde día 2-3, con una dosis entre 150-225 UI en el grupo de normo respondedoras, 75-150 UI en el grupo de PCOS, y 300-450 UI en el grupo de baja reserva, según los protocolos establecidos en el centro. Tras el tercer día de tratamiento se realizó ecografía de control para ajustar la dosis según la respuesta de la paciente.

Una pauta larga con agonistas de la GnRH conlleva un refrenado ovárico previo a la regla (iniciado a los 21 días) y posteriormente se añaden las gonadotropinas para la estimulación del ciclo, una vez que comienza la siguiente menstruación. Finalmente se induce la ovulación con hCG recombinante. Esta pauta se empleó en pacientes con reserva ovárica normal.

La pauta corta, con análogos de la GnRH, empieza con su administración desde el primer día de regla; el tercero se añaden gonadotropinas hasta la inducción de la ovulación. Esta pauta se usó con mujeres bajas respondedoras.

La pauta multidosis, con antagonistas, empieza con estimulación con gonadotropinas el segundo día del ciclo y, cuando se miden folículos mayores de 13 mm, se inicia el uso de los antagonistas hasta la inducción de la ovulación.

La inducción de la ovulación siempre se realiza con 6500 UI de hCG recombinante cuando se observan 3 folículos de al menos 17mm y 36 h después se lleva a cabo la punción ovárica.

En todos los casos se apoyó la fase lútea con progesterona, 200 mg/8 h vía vaginal, desde el día de la punción ovárica hasta la determinación del nivel de la subunidad β -hCG en sangre periférica para confirmar o no la gestación.

OBTENCIÓN DE EMBRIONES

Tras la punción ovárica, realizada en el quirófano, los líquidos foliculares llegan al laboratorio donde se procede a la captación de los CCCO



Figura 8: Complejo cúmulo-corona-ovocito.

(Figura 8) (Anexo 3). El proceso se desarrolla bajo un microscopio estereoscópico, incluido en una cabina de flujo laminar con superficie calefactada y sistema de CO₂ acoplado.

Los ovocitos se mantienen en incubación a 37° C, 6% de CO₂ y 95% de humedad relativa, hasta que se realiza la decumulación previa a la ICSI; dicha decumulación es un proceso en parte químico y en parte mecánico, puesto que se emplea una solución de hialuronidasa para facilitar su disgregación al hacerlos pasar por unos capilares de entre 135-150 µm, acoplados a los correspondientes sistemas de aspiración. Este proceso se da en las mismas condiciones que la captación ovocitaria.

Una vez decumulados se confirma, al microscopio, el estado de madurez de los ovocitos (**Figura 9**). Este estado puede ser:

- ✓ Metafase-II (M-II): apto para la microinyección. Pasada la metafase de la segunda división meiótica, presenta claramente el primer CP en el EP.
- ✓ Metafase-I (M-I): no muestra CP ya que sigue en la primera división meiótica. Se mantienen en incubación a la espera de la extrusión del CP, lo que permitiría su ICSI. El porcentaje de fecundación de estos ovocitos, si es que evolucionan a M-II, es inferior a aquellos que se encuentran en M-II en el momento de la punción.
- ✓ Profase-I (P-I): Están en la primera profase y permiten ver la vesícula germinal (VG). Su tasa de evolución, en incubación, es muy baja; por lo que su pronóstico es malo en los ciclos de TRA.

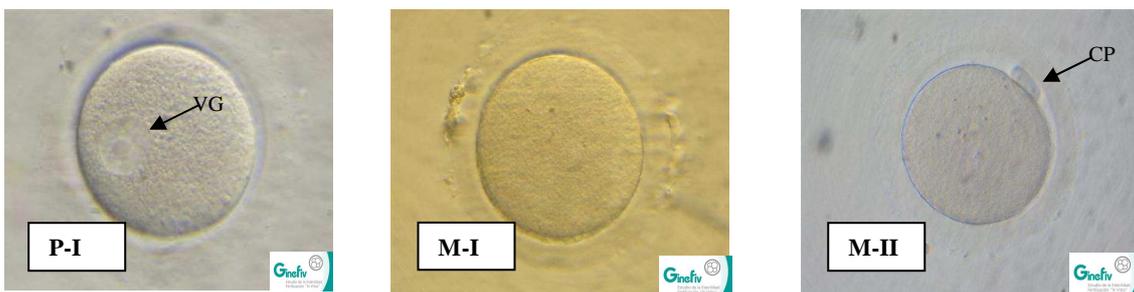


Figura 9: Estados de madurez ovocitaria.

El proceso de la microinyección de los ovocitos que se encuentran en M-II se realiza en un microscopio invertido, de superficie calefactada, con micromanipuladores en los que se acoplan micropipetas Holding e ICSI, para la sujeción y microinyección del ovocito respectivamente (**Figura 10**); mientras, los ovocitos permanecen en gotas de 20 µl de medio y los

espermatozoides se inmovilizan en un medio de alta viscosidad, que ralentiza el movimiento de los espermatozoides para facilitar su selección y recogida, todo ello cubierto por aceite.

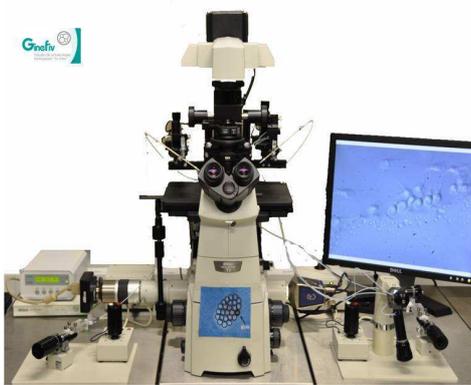


Figura 10: Microscopio de microinyección.

Pasadas 16-20 horas, se comprueba la fecundación (en un microscopio similar al de microinyección), otorgando a cada cigoto existente su clasificación (Z1, Z2, Z3 o Z4) y descartando, para este estudio, aquellos que muestren 3 o más PN, ya que los ovocitos con 1 único PN y 2 CP o sólo 2 CP se mantienen en incubación y, en caso de evolucionar correctamente en día +3, podrán someterse a la biopsia igualmente.

BIOPSIA EMBRIONARIA

Pasados 3 días en incubación se comprueba la evolución de los embriones y, si cuentan con 6 células o más, se procede a la extracción de una o dos blastómeras, según sea necesario en cada caso.

Para ello se prepara una placa por cada embrión que se va a biopsiar, con 2 gotas de medio de biopsia (**Anexo 3**); dicho medio rompe las uniones celulares, permitiendo así la extracción de una única célula sin arrastrar el resto ni, por tanto, interrumpir la correcta evolución del embrión. En dicho medio se mantiene el embrión durante el proceso de la biopsia.

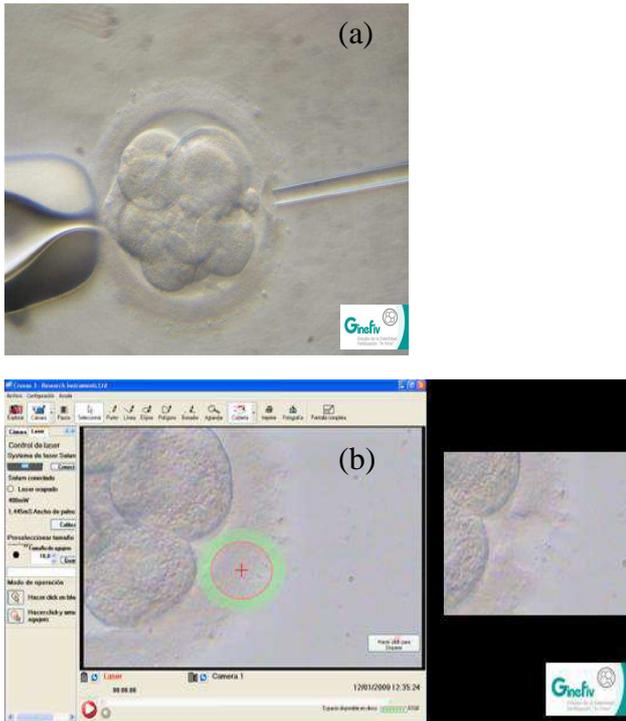


Figura 11: Orificio en la ZP ("hatching"). (a) Método químico. (b) Con láser.

La hendidura en la ZP (Figura 11) se puede realizar tanto utilizando el método químico –para lo que se incorpora en la placa una gota de ácido tyrodes con el que, mediante una pipeta de “hatching”, se realiza un pequeño orificio– como mediante láser, omitiendo entonces la gota de tyrodes al preparar la placa. Por la abertura conseguida se introducirá la micropipeta de biopsia para extraer la célula

(Figura 12).

Finalmente, el embrión biopsiado se devuelve al medio de cultivo, manteniéndose en su ubicación, perfectamente individualizado, para poder ser distinguido e identificado con el resultado del estudio genético.



Figura 12: Extracción de una blastómera

FIJACIÓN O ENTUBADO CELULAR

Una de las cuestiones más importantes del estudio genético embrionario es la trazabilidad, que permitirá identificar en todo momento la célula estudiada correspondiendo así el resultado que arroje con el embrión del que procede. La célula extraída del embrión, debe ser etiquetada claramente.

El procesamiento de la célula (Anexo 4) viene definido por el análisis que necesite realizarse:

- Si va a ser sometida a análisis mediante sondas de hibridación, debe fijarse sobre un portaobjetos de vidrio; utilizando, en primer lugar un medio hipotónico y posteriormente una solución (modificación del método de Carnoy) que, dejando caer una gota desde una altura de 5 cm aprox., producirá la rotura de las membranas celulares dejando el material genético al alcance de las sondas de hibridación que, en el laboratorio de genética, permitirán el reconocimiento de los cromosomas a estudiar.

- Si, en cambio, el estudio genético va a ser realizado mediante análisis molecular de PCR, en lugar de su fijación en el portaobjetos, debe entubarse según un protocolo que intenta mantener aislados los materiales que formarán parte de la determinación genética, evitando contaminación de ADN y ARN. Para ello, en una placa petri estéril, con varias gotas de buffer de lavado por cada embrión, se irá pasando la blastómera (arrastrando el menor volumen de medio posible), hasta colocarla en el tubo de PCR, donde se añadirá el buffer de lisis (combinación de detergentes y proteinasa K, que irá degradando las proteínas de las membranas celulares) y finalmente una gota de aceite mineral para prevenir la evaporación del buffer y proteger la muestra durante su traslado al laboratorio de genética. En paralelo, para cada célula, se debe preparar su control negativo para asegurar que el proceso de lavado ha sido correctamente realizado, eliminando todos los posibles contaminantes; dicho control negativo consiste, básicamente, en seguir los pasos de entubado propiamente dicho – añadiendo un volumen de la última gota de lavado por la que se pasó la blastómera-, adición del buffer de lisis y aceite en un tubo que se rotulará con el mismo número de su “tubo problema hermano” y la referencia “NEG”.

RESULTADO DEL DIAGNÓSTICO

Según el tipo de estudio que se realice se pueden emitir unos resultados u otros:

- **Estudio cromosómico -Mediante FISH-** Se determinan anomalías numéricas o estructurales.

En este análisis, llevado a cabo en el laboratorio de genética, se realiza el recuento de determinados pares de cromosomas (**Figura 13**) entre los que se encuentran aquellos que, estadísticamente, han demostrado darse en un mayor porcentaje de casos de malformaciones fetales, abortos, etc. o todos los cromosomas:

- Par 18, X e Y: para sexado.
- Pares 13, 18, 21, X e Y: pares cuyas alteraciones son compatibles con la vida.
- Pares 13, 16, 18, 21, 22, X e Y: alteraciones de los pares 16 y 22 aparecen, con alta frecuencia, en casos de aborto.
- Pares 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y: se dan hasta en el 85% de casos de anomalías cromosómicas
- Pares 2, 4, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y: en casos de meiosis patológica suelen verse implicados los pares 2, 4 y 9
- Todos los pares, los 22 pares comunes además de los cromosomas X e Y. Nos permiten alcanzar un hipotético 100% de información sobre la integridad cromosómica de la blastómera analizada.

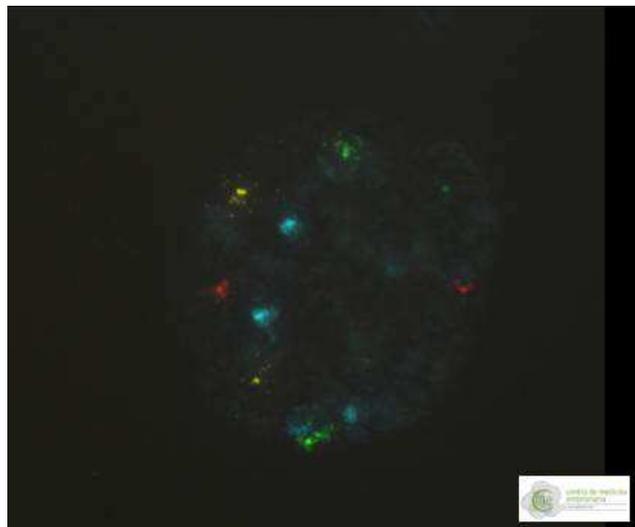


Figura 13: Imagen de un núcleo analizado por FISH.

También se buscan partes de cromosomas que se saben alterados en la historia familiar de los pacientes (translocaciones, inversiones, etc.).

Así, según el resultado, se puede determinar el “estado cromosómico” y caracterizar 10 categorías:

- ♣ Normal: Cuando es posible localizar 2 copias de cada uno de los cromosomas que forman los pares cromosómicos buscados o muestran equilibrio en el material genético.
- ♣ Monosomía: Cuando uno de los pares cromosómicos estudiados presenta una única copia (1 cromosoma).
- ♣ Trisomía: Cuando uno de los pares cromosómicos cuenta con una copia extra (3 cromosomas).
- ♣ Monosomía + trisomía: Aparece un caso de monosomía y otro de trisomía en la blastómera analizada.
- ♣ Nulisomía: Cuando no aparece ninguna de las copias de uno de los pares cromosómicos (0 cromosomas).
- ♣ Cromosopatías múltiples: Cuando más de 2 de los pares cromosómicos muestran alteración (monosomía, trisomía, nulisomía... en cualquier combinación posible).
- ♣ Desequilibrado: Cuando lo que se busca no es cuantificar el número de copias cromosómicas sino la “cantidad” de información genética. Este resultado sólo define anomalías estructurales.
- ♣ Heteroploidías: Cuando en todos los pares cromosómicos aparece el mismo tipo de anomalía cromosómica (monosomía, trisomía, cuatrismía,...) debido a la falta o sobra de un juego cromosómico completo. Puede ser haploidía, cuando falta, o poliploidía, cuando sobra.
- ♣ Mosaico: Ocurre en los casos en los que ha sido necesario analizar más de una célula del embrión con resultado distinto en cada una de ellas.
- ♣ Sin diagnóstico: Cuando por alguna razón ha sido imposible analizar la blastómera.

- **Estudio molecular -Mediante PCR-** Se determinan mutaciones puntuales. Se basa en la realización de varias rondas de PCR.

En la primera, de amplificación, se añaden los 4 nucleótidos (dNTPs), polimerasa (ADN polimerasa Taq), $MgCl_2$, un tampón que mantendrá el pH en los valores óptimos y los cebadores (“primers”) externos, que son determinados, identificados y diseñados previamente, mediante el estudio de informatividad (análisis de los haplotipos) realizado a la “pareja problema”.

Posteriormente se realizarán nuevas rondas de PCR que será -según el requerimiento de cada caso, enfermedad o pareja- con digestión por enzimas de restricción, anidada, de minisequenciación, etc. y que nos proporcionarán unas figuras de picos, referentes a cada marcador genético, que nos permitirán interpretar el resultado del análisis de la blastómera. (Figura 14)

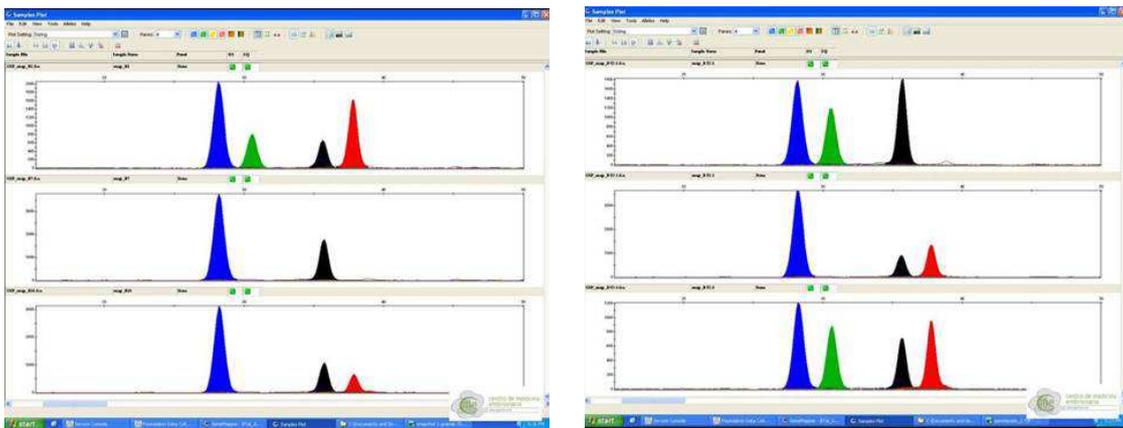


Figura 14: Imagen del resultado de un análisis genético molecular de semisequenciación.

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Una vez recibido el resultado del estudio se procede a la transferencia embrionaria. Para ello se seleccionará aquel embrión o embriones con diagnóstico normal/equilibrado/no afecto (según la indicación) otorgándoles además una graduación siguiendo los parámetros de valoración morfológica de ASEBIR [54], visto en el Esquema 2.

Los embriones se transfieren en el día de la fase secretora adecuado, según su desarrollo celular (D+4 o D+5 de desarrollo), con el correspondiente apoyo de fase lútea (**Anexo 5**).

El proceso de la transferencia se realiza bajo control ecográfico, empleando sondas de tipo flexible o rígido, según la facilidad de acceso al útero.

En caso de contar con más embriones viables de aquellos que la pareja, ya por decisión propia ya por consejo médico, está dispuesta a transferir, se procede a su criopreservación mediante procedimientos de congelación lenta o de vitrificación.

Dichos embriones podrán ser transferidos en sucesivos ciclos de transferencia embrionaria, para los cuales la paciente ya no tendrá que ser sometida a hiperestimulación ovárica controlada sino, simplemente, a preparación endometrial en ciclo sustituido con estradiol, vía oral o transdérmica, desde el segundo día del ciclo. Se considera endometrio adecuado al objetivarse, mediante ecografía vaginal, al menos 7 mm de grosor.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Realizamos un tratamiento de los datos obtenidos en el seguimiento de cada uno de los embriones, de los que tendremos en cuenta su clasificación zigótica (Z1, Z2, Z3 y Z4), la división celular (número de células en D+2 y D+3, tasa de fragmentación); es decir, los parámetros de selección tradicionales, no invasivos, y el resultado del DPI. Así como los datos del ciclo (cantidad de embriones disponibles para la biopsia, número de embriones normales, gestación o no).

Llevamos a cabo, haciendo uso de herramientas estadísticas del paquete SPSS (Statistical Package for Social Sciences- SPSS® 15.0 for Windows) y del proyecto R (www.r-project.org, R Development Core Team), un estudio con análisis descriptivos, de frecuencias: porcentajes, medias y medianas y tablas de contingencia, χ^2 de Pearson, análisis de varianzas (ANOVA) y curvas COR.

RESULTADOS

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

A lo largo de estos meses (enero 2007- diciembre 2011) se analizan 1425 embriones obtenidos en 266 ciclos de DPI, lo cual supuso un 2,16% de los ciclos realizados en la clínica (266/12290).

Con los datos obtenidos en ese tiempo, se realizan análisis estadísticos: descriptivos, tablas de contingencia, χ^2 de Pearson y de ANOVA, que arrojan los resultados tanto por embrión como por ciclo (**Anexo 6**):

ANÁLISIS POR EMBRIÓN

Según la estadística descriptiva (**Anexo 6: I-XX**):

- La mayoría de los cigotos (94,4%) presentan 2 pronúcleos al revisar la fecundación a las 18-20 h postinseminación; de ellos, la proporción mayor (42,2%) corresponde con una distribución uniforme de los nucléolos a lo largo de los PN (Z_2).
- El 51,9% de los cigotos tiene una localización de los CP según el formato de ángulo β , seguido del 28,8% en γ .
- En el 91,4% de los casos analizados se aprecia halo citoplasmático.
- De las vacuolas reseñadas, en el 84,9% de los casos aparecen sólo en el estado de cigoto.
- Al revisar la primera división celular (“cleavage” temprano), a las 27 h postinseminación, sólo en el 26,1% de los casos se ha producido. Se confirma la persistencia pronuclear en el 51,8% de los casos y en un 22% de los casos su desaparición. En un 3,1% de los casos, en los que hay división, la primera división celular es a más de 2 céls.
- En la revisión del D+2 (a las 44 h aprox.) el 60,5% de los embriones presenta una situación de 4 céls. El 24,6% tienen menos de 4 céls. (15,3% permanece en 2 céls.) y el 14,9% tiene más (10,7% está en 5 céls.).
- En el momento de la biopsia (D+3, 72 h aprox.), el 38,4% de los embriones presenta 8 céls. El 46,8% tienen menos de 8 céls. (7

céls.- 19,1% y 6 céls.- 13,8%) y el 14,8% tiene más (6,5% tiene más de 10).

- También en el momento de la biopsia, D+3, el 51,3% de los embriones muestran una situación de baja fragmentación celular, <10%, con una incidencia decreciente a medida que aumenta la tasa de fragmentación, hasta alcanzar >50% de fragmentación, en el 0,4% de los embriones.
- Cuando analizamos la capacidad de evolución de los embriones después de la biopsia, en D+4, encontramos que el 71% muestra una evolución significativa (estado de compactación, 3 o más células nuevas), 4,2% una evolución poco significativa (1-2 células nuevas) y sólo el 24,8% no muestra ningún tipo de evolución.
- En el 87,9% de los embriones, se observa un único núcleo en cada blastómera, en el 7,8% de los embriones no se visualiza el núcleo en alguna célula y en el 4,3% al menos una de las blastómeras presenta 2 o más núcleos.
- En la fijación del núcleo, para su posterior hibridación, se observa un núcleo único en el 83,7% de los casos, en el 5,6% se visualizan 2 núcleos y en el 3,2% es un núcleo acompañado de un micronúcleo.
- Los embriones con resultado normal son el 31,3%, seguido de los embriones con resultado de cromosomopatías múltiples, con un 25,8%. En un 3,8% de los embriones no se consiguió un diagnóstico concluyente tras el estudio genético.
- Respecto a los cromosomas analizados, no se aprecian datos reseñables; salvo en el hecho de la gran incidencia de resultados “no informativos” para el cromosoma 16.
- De los embriones con resultado normal, el 73,9% de los embriones se transfirieron en el ciclo de estudio (“en fresco”), el 14,2% no se llegó a transferir.
- El 17,7% se clasificaron como de categoría 1, el 44,8% de categoría 2, el 32,9% de categoría 3 y el 4,7% de categoría 4.

- El 70,4% de los embriones transferidos no produjeron gestación, el 10,4% sí, y un 19,2% de los embriones fueron transferidos en grupo, de modo que no se puede identificar de cuál se dio la gestación.
- De las gestaciones logradas, el 59,4% evolucionaron hasta el parto, el 25,5% evoluciona con aborto bioquímico y el 6,6% en aborto tras haber sido constatada ecográficamente la implantación.

Resultados en relación a los parámetros morfológicos

Al realizar análisis de contraste y de varianzas, relacionando el resultado del DGP con los parámetros morfológicos encontramos los siguientes resultados (**Anexo 6. XXV-XXXV**). Para dichas comparaciones algunos datos –tanto los de embriones que en D+2 tienen menos de dos células como los que en D+3 tienen menos de cinco células- se obvian en el análisis para evitar relaciones espurias, ya que podría darse la apariencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) sin serlo.

Tomando como referencia la morfología que presentan los embriones que tienen una dotación genética normal, realizamos comparaciones:

- Morfología del **zigoto**:
 - Al relacionar el Z-score –clasificación de los pronúcleos, según su aspecto- observamos que la mayoría de los casos (42,2%) presenta una distribución uniforme de los nucléolos a lo largo de los PN (Z_2), aunque no hay diferencias significativas en la morfología de los PN. Sí se observan, en cambio, diferencias significativas entre los embriones normales, donde ambos PN están presentes, y aquellos en los que no aparecen, con mayor incidencia en embriones con cromosomopatías múltiples, poliploides y aquellos en los que no presentan resultado.
 - Respecto al ángulo de los CP, no se aprecian diferencias en absoluto, debido a su gran dispersión, y aunque la mayoría (aprox. 52%) presentan ángulo β , hay una cierta tendencia al ángulo α entre los embriones normales.

- En relación al halo, tampoco observamos diferencias entre grupos de resultados, aunque la diferencia es altamente significativa respecto a la presencia de halo, puesto que es algo generalizado en todos los ciclos.

- De las vacuolas, la gran mayoría (cerca del 85%) aparecen en el cigoto, como rasgo temporal, ya que desaparecen en las sucesivas divisiones celulares; sin mostrar diferencias significativas entre grupos de resultado.

- **Primera división** celular (o “cleavage” temprano):

- No se encuentran diferencias significativas entre las distintas situaciones observadas a las 27 h postinseminación, en función de la dotación genética de los embriones.

- Morfología del **embrión en D+2**:

- De los embriones normales, el 36,85% tienen 4 céls., el 28,09% tienen 2-3 céls. y sólo el 17,71% tienen 5-6 céls.

- Hay diferencias altamente significativas entre los embriones normales y los que presentan cromosomopatías múltiples o son poliploides, que relacionan situaciones distintas a la presencia de 4 células con los embriones alterados. También con los embriones de los que no se consigue diagnóstico concluyente.

- En los embriones analizados por enfermedades monogénicas no se observan diferencias en ningún caso.

- Aunque en los datos de vacuolas durante las divisiones celulares se aprecian diferencias significativas, cuando se pormenoriza el estudio se confirma que no hay diferencias entre grupos sino entre la presencia o ausencia de dichas vacuolas, que, por otro lado, están poco presentes ya que sólo en el 6% de los embriones analizados se reseñó su presencia.

- Respecto a los núcleos observados en D+2, no se observan diferencias significativas, pero sí se puede encontrar que hay mayor incidencia de céls. sin núcleo en casos de cromosomopatías múltiples.

- Morfología del **embrión en D+3**:
 - El número de céls. en D+3, muestra también diferencias significativas, aunque en menor número de situaciones. Así, entre los casos en los que el resultado del diagnóstico es normal, hay más embriones con 8 células que en el resto de resultados; además, entre aquellos casos en los que el número de céls. es >8 hay diferencias que si bien no siempre son significativas si marcan una tendencia a ser embriones alterados, siendo claramente significativas en aquellos embriones con cromosopatías múltiples, poliploides o con más de un tipo de alteración, sobre todo cuando el número de céls. es >10.
 - La fragmentación celular de los embriones en D+3 no suele superar el 10% y muy ocasionalmente es mayor del 30% (poco más del 7%), por lo que no se encuentran diferencias significativas salvo en casos en los que el porcentaje de frag. es >50%, cuando los embriones suelen presentar cromosopatías múltiples, trisomías o están desequilibrados (en casos de translocación).
 - En la fijación, en el procesamiento de la célula para su estudio, aunque se encuentran diferencias altamente significativas, éstas son respecto a que la inmensa mayoría de las veces sólo se visualiza un núcleo; pero cuando se encuentra otra situación, es altamente probable que el resultado de esa blastómera no sea normal. Y llama la atención que en el resultado de cromosopatías múltiples se puede observar una mayor diversidad de núcleos en la fijación.
- Evolución del **embrión en D+4**:
 - Cuando analizamos la capacidad de evolución de los embriones después de la biopsia, observamos diferencias significativas. Así vemos que es más probable que los embriones normales evolucionen y que los no evolutivos, pasado el D+3, tengan algún tipo de alteración.

- Respecto al estado evolutivo de los embriones en D+4, también podemos reseñar que hay diferencias estadísticamente significativas entre la evolución de los embriones en los que se biopsió una sola célula y aquellos en los que, por no conseguir una fijación adecuada del núcleo en el portaobjetos, se vio necesaria la biopsia de una segunda o incluso tercera célula.

Aunque la razón inicial del estudio era intentar relacionar los parámetros clásicos de clasificación morfológica de los embriones con su estatus genético, la práctica clínica diaria, el trato con los pacientes, crea otras necesidades: a los pacientes no les interesa tanto cómo serán sus embriones sino cómo será su ciclo. Así que también se han realizado análisis estadísticos relacionando, según la indicación, el resultado, los factores morfológicos además del número de ciclos realizados, el número de embriones obtenidos, embriones transferibles y las tasas de gestación.

Resultados en relación a la indicación

Relacionamos la indicación para hacer DPI con el resultado de dicho diagnóstico (**Anexo 6. XXXVI**) y en este caso, según tomemos como referencia la totalidad de los embriones analizados o la relación de embriones con resultado normal, podemos encontrar pequeñas diferencias.

Como en el estudio según el número de céls., se obvian del análisis estadístico para evitar relaciones espurias, los datos referidos a la indicación “electivo” al tratarse de un ciclo solo; tampoco se tendrán en cuenta las relaciones de los resultados “afecto” y “desequilibrado” con indicaciones distintas a monogénicas y translocaciones o inversión, respectivamente, de las que son exclusivas, porque podría darse la apariencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) sin serlo.

- En el grupo de EMA, se encuentran diferencias altamente significativas a favor de cualquier tipo de alteración y en contra de la presencia de embriones euploides, salvo para las monosomías y los casos de embriones sin diagnóstico.

- En los casos de aborto previo cariotipado, se aprecian diferencias significativas en el grupo de embriones que presentan monosomías con trisomías asociadas (aneuploidías complejas).

Por otro lado, en los abortos de repetición aparece un incremento significativo de monosomías. Además, en estos casos de aborto de repetición, si bien no se llega a dar significación estadística, sí se aprecia una tendencia al alza en embriones trisómicos ($p=0.07$).

- En el grupo de fallo repetido de FIV se observa una gran proporción de embriones con monosomías.

- En el factor masculino, cuando se unifican todas las indicaciones, nos encontramos con diferencias significativas en el resultado de cromosomopatías múltiples.

- Podemos observar que cuando se analizan embriones de parejas afectas de enfermedades monogénicas aparecen sin diagnóstico un número significativamente alto de embriones, pero además podemos comprobar que el diagnóstico no sólo será afecto o sano sino que se pueden determinar monosomías si se comprueba la ausencia de uno de los alelos paternos esperables.

- En las translocaciones vemos diferencias altamente significativas en contra de embriones normales en la indicación de translocación recíproca.

Parámetros morfológicos en relación a la indicación

Finalmente, si intentamos relacionar la indicación con los parámetros morfológicos (**Anexo 6. XXXVII-XLVIII**), tomamos como referencia la morfología que presentan los embriones que se analizan por enfermedades monogénicas, ya que en la mayoría de esos casos las parejas no tienen un factor de infertilidad asociado.

- Morfología del **zigoto**:
 - Al valorar el Z-score, como en relación al resultado del DGP, se observa que la gran mayoría son Z2, seguidos de Z3; pero

llama la atención que en EMA se da la gran mayoría de la aparición de cigotos con un único PN en su revisión a las 17-20 h, así como en los casos de FISH alterado.

- Respecto al ángulo de los CP, no se aprecia nada en absoluto debido a su gran dispersión.

- En relación al halo, cuando se analiza según la indicación, no se ven diferencias.

- Las vacuolas, al igual que cuando se analiza por resultado, se aprecian como rasgo temporal y no muestran diferencias significativas.

- **Primera división** celular (o “cleavage” temprano):

- La primera división celular, al menos en los embriones donde llegó a analizarse, no suele darse; siendo la situación mayoritaria a las 27 h la de persistencia de los PN.

- La primera división celular sólo muestra diferencias en el grupo de fallo de FIV, en donde se aprecia un mayor número de embriones que ya habían realizado la primera división a las 27 h.

- Morfología del **embrión en D+2**:

- El número de células en D+2 refleja diferencias significativas pero no entre indicaciones sino entre aquellos embriones que presentan 4 células, que son la mayoría (60,5%), seguidos de aquellos que sólo han hecho una división celular, y están en 2 céls., o los que ya tienen 5. En los casos de cariotipo alterado, abortos de repetición, fallo de FIV y meiosis patológica, los embriones más lentos (<4 céls.) son más incidentes. Por el contrario, los embriones más evolucionados (>4 céls.) se observan en las translocaciones y abortos de repetición.

- En relación a la multinucleación, no encontramos diferencias significativas en cuanto a la multinucleación en D+2 y en el número de núcleos en la fijación, al procesar la muestra para su estudio mediante FISH, tampoco muestra diferencias ya que se ve claramente en la inmensa mayoría de los casos solo un núcleo se

confirma, seguido de 2 núcleos (no siempre en casos donde se visualizó multinucleación) o un núcleo acompañado de micronúcleos.

- Morfología del **embrión en D+3**:
 - El número de céls. en D+3 muestra diferencias significativas, en cuanto a que la mayoría (38,4%) tienen 8 céls. en el momento de la biopsia, seguido de 7 y 6 céls. Los casos de fallos de FIV parecen de los que presentan embriones más lentos; en cambio los de FISH alterados suelen ser más rápidos y en los casos de EMA se ve una mayor dispersión, ya que se observan tanto lentos como muy evolucionados.
 - La fragmentación celular de los embriones en D+3 no suele superar el 10% y muy ocasionalmente es mayor del 30%, donde la mayoría son de translocación robertsoniana, EMA y FISH alterado.
- Evolución del **embrión en D+4**:
 - Cuando analizamos la capacidad de evolución de los embriones después de la biopsia, en relación a la causa por la que se realiza el diagnóstico, no se observan diferencias significativas más que en un par de situaciones: en Fallo de FIV, con menos casos de evolución poco significativa, y en FISH alterado, con mayor incidencia de evolución poco significativa. Pero, si aunamos las situaciones de evolución y las enfrentamos a no evolución, no se observa absolutamente ninguna diferencia.
 - Respecto a los embriones transferidos, la mayoría son en fresco; y, aunque parece que hay diferencias significativas estas sólo se ven en la transferencia de embriones vitrificados, siendo significativamente menor en los ciclos de translocaciones recíprocas –lo que se puede relacionar con el hecho de que es de las indicaciones con menor número de embriones normales, por lo que finalmente no se consiguen suficientes para poder vitrificarse- al contrario que en las translocaciones robertsonianas.

- No se aprecian diferencias significativas respecto a la clasificación de los embriones transferidos.

Ya que contamos con los datos de la dotación cromosómica, intentamos encontrar patrones de distribución de anomalías en cada indicación (**Anexo 6. XLIX**) pero no encontramos diferencias significativas; salvo en la distribución del par sexual, no siendo esta diferencia intergrupos sino intragrupo, ya que las situaciones normales XX o XY aventaja enormemente a cualquier otra. Por lo que, finalmente, no se considera un dato definitorio.

ANÁLISIS POR CICLO

Si lo que hacemos es analizar los ciclos realizados, en conjunto y no embrión a embrión, podemos valorar que:

- Según la estadística descriptiva (**Anexo 6. XXI-XIV**)
 - Los ciclos se conforman mayoritariamente (56,4%) de 3-6 embriones, con una moda de 4 emb./ciclo y una media de 5,36 emb./ciclo. Sólo en un 14,7% de las veces se biopsiaron 1-2 embriones.
 - En casi un 25% de los ciclos hubo que cancelar la transferencia porque no se encontró ningún embrión viable (normal/equilibrado/sano). Con una media de 1,67 emb. sanos/ciclo y una moda=1.
 - En los ciclos transferidos, el 32,6% de las veces se consigue gestación.
- Si analizamos los ciclos teniendo en cuenta las indicaciones (**Anexo 6. L-LVII**):
 - La indicación más repetida es el factor masculino (uniendo todas las situaciones que implican anomalías en la muestra de semen, desde parámetros de diagnóstico clásico a genético: factor masculino severo, meiosis patológica o FISH alterado), con un 27,1%, seguido del factor de edad materna. Sólo el 23,3% se deben a

pacientes considerados de alto riesgo: 3% portadores de mutaciones, 18,4% portadores de anomalías cromosómicas estructurales y 1,9% portadores de un cariotipo alterado –no relacionado con anomalías estructurales.

- No hay diferencias significativas en el número de embriones analizados y el tipo de paciente.

- No así en el número de embriones normales/ciclo, donde se ven diferencias significativas en los ciclos cancelados (ningún embrión normal) para las indicaciones de EMA y translocación recíproca.

- No se observan diferencias significativas en cuanto a las tasas de gestación en función de la indicación analizada ni al número de embriones disponibles para la biopsia, aunque cuando se analizan menos de 2 emb./ciclo, no llega al 5% la tasa de gestación.

- En cambio, según el número de embriones normales, las tasas de embarazo son significativamente altas cuando se puede elegir entre 4-5 embriones y significativamente bajas si un único embrión es transferible.

Realizando los estudios de ANOVA, según resultado, se observa asociación entre las variables –porque parece que hay significación estadística-, entonces procedemos a evaluar los contrastes “a posteriori” (pruebas “post hoc”). (**Anexo 6. LVIII-LIX**) y detectamos que sólo parece relacionado con los casos de diagnóstico “sin resultado”, pero al ser ésta una situación que puede ser artefacto del procesamiento de la muestra, no se considera informativa.

Si dichos análisis son según indicación, dado que el valor *f* aparece estadísticamente significativo, nos indica que cada factor va a actuar de forma diferente sobre la variable que estamos estudiando. En nuestro caso, al estar intentando ver la influencia de varias indicaciones independientes sobre el resultado de nuestro estudio, lo esperable es que cada una actúe de forma totalmente independiente. Esto es, cada indicación no sólo no influye

sobre el resto (pues son alteraciones de diferentes orígenes) sino que cada una influye de forma distinta sobre el resultado final del ciclo.

Por último, con los datos y las curvas COR resultantes (**Anexo 6. LX-LXVIII**) no se puede obtener una ecuación que prediga con total eficacia cómo va a ir un ciclo, pero sí establecer unas tendencias que nos pueden servir para aconsejar a los pacientes en el día a día de nuestra clínica.

DISCUSIÓN

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

Casi a la par que las TRA surgen las inquietudes sobre cómo, cuándo y con quién realizarlas. Entre esas técnicas es el diagnóstico genético preimplantacional el que más controversia suscita, ya que el beneficio – disminuir el número de abortos y nacimientos de bebés enfermos- tiene como contrapeso nada menos que la biopsia embrionaria.

Así, se plantea que son las aneuploidías –con mayor incidencia de la esperada [14,39,65]- las que merman las tasas de éxito de los ciclos, se preguntan si se incrementan por los tratamientos en sí o por la propia condición de cada pareja [13,57,106-108,128] y se analizan e intentan estandarizar las tasas de aneuploidías en cada caso, para definir las indicaciones [12,61,82-83,181,201,205,281], y conocer cómo esas aneuploidías afectan a la viabilidad de los embriones [34,41,73,136] y, por tanto, cómo afectan en el resultado final del ciclo [44,76,78,84].

ANÁLISIS POR EMBRIÓN

-Empezando por las primeras etapas de la fecundación, en la bibliografía pueden encontrarse artículos que relacionan los parámetros de Z-score y la presencia de halo con la posterior evolución [13-33,35-38], aunque no siempre con el estado de ploidía; en este caso tenemos que discrepar, ya que nosotros no encontramos correlación estadísticamente significativa entre la calidad del embrión y su estado de cigoto, salvo si lo que se relaciona es la presencia o no de los dos pronúcleos en la primera revisión (a las 18-20 h), quizás debido a que la distribución de los nucléolos sufre cambios a lo largo del tiempo y puede depender del ángulo desde el que se observe. Respecto a la indicación, la mayoría de los cigotos con un único pronúcleo se da en EMA y FISH alterado, por lo que entendemos que se relacionan en mayor medida con embriones portadores de alteraciones genéticas, lo que explicaría que la EMA y el FISH alterado se relacionan con errores en la segregación cromosómica de los gametos y, por tanto, en una disfunción en el proceso de fecundación.

-Avanzando en la evolución embrionaria, según los parámetros: presencia de vacuolas o multinucleación [30,50-52-55], parece que la bibliografía coincide bastante con nuestra experiencia. En general, aunque no se consideran factores favorables, tampoco muestran una gran repercusión en la viabilidad de los embriones, pues suelen presentar un carácter temporal; es decir, parece que la incidencia de su presencia depende del estadio del embrión en el que aparezcan [22,30,47,54]. En nuestra experiencia, la presencia de vacuolas es escasa; tampoco respecto a la multinucleación encontramos diferencia significativa en D+2 y en el número de núcleos en la fijación. Además, en el caso del número de núcleos en la fijación, resulta complicado distinguir si la multinucleación es real, y previa, o se produjo en la manipulación de la célula, siendo un artefacto de la fijación; sobre todo porque muchas veces el número total de cromosomas es correcto en la suma de todas las señales.

-En cambio, la fragmentación -de la que por cierto aún no se tiene claro el origen y se discute el mecanismo de aparición [30,45-49,54-55,137]- sí se considera un factor claro de inviabilidad. Por eso, superado un porcentaje determinado del volumen total del embrión ($\geq 50\%$), los embriones son descartados tanto para transferencia como para biopsia. La fragmentación celular de los embriones en D+3 no suele superar el 10%, muy ocasionalmente es mayor del 30% y, cuando ocurre, la mayoría de los embriones son de translocación robertsoniana, EMA y FISH alterado.

-Pero el parámetro sobre el que nunca se ha dudado, el que parece más evidente reflejo de la salud del embrión, el más intuitivo, es el del número de células que va mostrando a lo largo de su línea temporal. A este respecto se ha acumulado la mayor parte de la bibliografía, mostrando la evolución de las técnicas de la embriología.

* Respecto a la primera división celular (“early cleavage”), la presencia o no de los PN o la consumación de la primera división celular a las 27 h postinseminación, es un factor que dejó de analizarse a lo largo de la recogida de datos, debido a las dificultades que producía en el día a día del trabajo del laboratorio y a que en el

estudio preliminar, presentado para la suficiencia investigadora, no se apreciaban diferencias significativas en función de la dotación cromosómica. En este caso, aunque ninguno de los embriones normales mostró más de dos células en la primera división, sólo encontramos diferencias –si analizamos según el resultado del DPI– porque hay más embriones con 2 células cuando aparece una combinación de monosomía y trisomía y, aunque no llega a ser una diferencia significativa, también se observa una tendencia en los embriones con cromosopatías múltiples. En función de la indicación, paradójicamente –puesto que en la bibliografía parece un factor de buen pronóstico– se ve un incremento de embriones que presentan 2 céls. en casos de fallo de implantación tras FIV.

Curiosamente, la mitad de los embriones que se dividen a más de 2 céls. son provenientes de ciclos por EMA y ninguno de los embriones normales mostró nunca una velocidad de división celular tan acelerada.

De cualquier modo, es éste un parámetro al que se le dio validez de inicio [30,40-41,43-44,54-55], quedando en desuso hasta la llegada del auge de la incubación con vigilancia “time-lapse”. Aunque suele concedérsele un buen pronóstico [159,163], no en todos los estudios se le da tanto peso [42,150,160,162], sino que la mayoría de los nuevos estudios dan prioridad a la segunda división mitótica: el tiempo que dura el estado de 2 céls. Siendo un dato de buen pronóstico, pero relacionado con la implantación; que no es tanto el asunto que nos ocupa en esta tesis.

* En el llamado “estado de cleavage”, el de división celular (antes de alcanzar la estructura de blastocisto) se concentran la mayoría de los parámetros morfológicos de clasificación embrionaria:

- o En D+2, se observa que hay más embriones con número de céls. mayor de cuatro en aquellos embriones con cromosopatías múltiples, embriones poliploides y desequilibrados, además de aquellos sin resultado; pudiendo indicar esto que en aquellos embriones con demasiadas céls. es más probable que se cometan

errores de cariocinesis. También podría considerarse esa posibilidad como explicación al hecho de que haya más embriones en los que no se observa núcleo en alguna de las células.

Estos datos encajan con la bibliografía que relaciona el estado de 4 células como el óptimo (por potencial de implantación y estado cromosómico) [30-32,37,41-43,54-55,76,135-136,144], aunque en nuestra experiencia no se encuentran diferencias significativas a ese nivel.

o En D+3, se observan diferencias significativas: el grupo mayor de embriones es el que muestra 8 céls. (38,4%), seguido del de 7 y 6 céls., y también es significativa la incidencia de embriones alterados cuando llevan una velocidad elevada (>10 céls.). Los embriones de FISH alterado suelen presentar embriones más rápidos, los casos de fallo de FIV son los que presentan embriones más lentos y en caso de EMA se da una gran dispersión, ya que se observan tanto muy lentos como más evolucionados.

Esto parece concordar con la lógica y la bibliografía, que en general dice que la velocidad embrionaria está íntimamente relacionada con el estado de ploidía y con el potencial de implantación [30,55,135,138-141,143-145,147,151-152,159-162,164-166,168,203,285], aunque no todos están de acuerdo [137,155-156,163,167,170,172] y siguen considerando que se puede matizar. Por otro lado, o a la par, tenemos bibliografía que en el fallo de FIV [243-245] suelen encontrar anomalías complejas, que parece que afectan más durante las tres primeras divisiones mitóticas [246]; en EMA, también clásicamente, se asume un aumento de alteraciones cromosómicas [181-184,186-198,201], lo que empeora el pronóstico reproductivo de esas pacientes, aunque paradójicamente eso lleva a algunos grupos a abogar por la no utilidad de DPI para esa indicación, ya que no mejora sus tasas de gestación [185,199] al confirmarse la peor calidad y cantidad de los embriones por ellas generados. Respecto a la influencia del FISH alterado y el resto del factor masculino (no siempre aunque sí a veces relacionado con patologías de base), también se encuentra bibliografía con diversas razones

que, al incrementar los riesgos de aneuploidías en los espermatozoides, se puede relacionar también con el potencial de evolución [229-234,236-242] – pese a que se cuenta con técnicas que parece que ayudan a mejorar la selección los especímenes más probablemente euploides [235].

o En D+4, respecto a los embriones ya biopsiados, a su evolución en, se observan diferencias altamente significativas a favor de la no evolución en aquellos embriones con alteraciones genéticas; es decir, se observan diferencias sólo en relación al resultado del DPI. Aunque en general hay más embriones que muestran evolución tras pasar por el proceso de la biopsia, se comprueba que la gran mayoría de los embriones anómalos detienen su evolución pasado el D+3, confirmando datos bibliográficos [30,54-55,145,150-151]. Aún así, algunos de los que finalmente se revelan como normales genéticamente hablando también se paran. Esto concuerda con la noción, generalmente aceptada, de que a partir del D+3 el genoma embrionario se activa y comienza a mostrar su potencial real de implantación; mientras que hasta ese momento la capacidad de evolución viene dada por el material celular que reciben del ovocito. Quizás eso defiende y motiva la estrategia de biopsia en estado de blasto, más en boga en los últimos años, que obliga al estudio mediante técnicas de análisis molecular: arrays CGH, secuenciación, etc., validadas y extendidas sobre todo a partir de 2011, para su uso en determinación de aneuploidías [250-274,277-307].

Pero finalmente cualquier tipo de selección tiene su limitación. Una limitación que va más allá de la posible subjetividad del observador, si hablamos de selección morfológica, o de la exactitud de cada técnica empleada: la ocurrencia de mosaicismo.

Se conoce como mosaicismo a la presencia de varias líneas celulares, con información genética distinta; fruto de errores postzigóticos, es un suceso conocido desde hace décadas [88-100,153,265], ante el que no hay capacidad de maniobra ni de evitación.

Debido a que la fuente de su estudio son los embriones descartados para su transferencia, bien por inviabilidad morfológica bien genética, es posible que no se pueda llegar a desvelar el verdadero alcance de este hecho [101-103,152,195]. Pero, habiéndose observado más casos de mosaicismo en las etapas de división y en mórulas que en blastos, quizás se confirma ese mecanismo de autorregulación que impide la evolución de dichos embriones y que encaja con los datos en los que se dice que, aunque no hay mayor número de embriones normales, están en mayor proporción cuando se biopsian blastos que cuando se biopsian embriones en D+3. Es decir, no hay mayor número de embriones euploides pero el número de los biopsiados (los que han evolucionado) es menor [30,272,302].

Siguiendo este hilo de discusión podemos enlazar con el hecho de la biopsia en sí. En el caso de nuestro estudio no cupo opción, ya que el asunto está sujeto al método de trabajo propuesto por quienes se encargan de realizar el estudio: biopsia de una única célula en D+3. En nuestro caso, las técnicas ofrecidas por el laboratorio colaborador (Centro de Medicina Embrionaria) eran de FISH para las aneuploidías y de PCR, amplificación y secuenciación para las monogénicas; siguiendo la escuela mayoritaria de análisis en el entorno.

A ese respecto, las técnicas del estudio genético, subsidiarias al DGP, han ido evolucionando y dándose el relevo, desde el FISH a la secuenciación completa del genoma [88,250,261,266-311]. Suscitándose también debate sobre las circunstancias de la biopsia – del momento adecuado y del grado de implicación de los procesos de incubación, criopreservación, etc., en los embriones- [58-59,111-117], llegando incluso a plantearse la idoneidad de hacerlo o no. Aunque en la mayoría de casos parece claro que el efecto de la biopsia no es negativo, en algunos estudios se observa que, en casos en los que no se encuentra indicación para DPI, disminuye las tasas de gestación [123,125,183].

ANÁLISIS POR CICLO

Cuando nos enfrentamos a los ciclos de DGP relacionando la indicación para hacer DPI con el resultado de dicho diagnóstico:

* Resulta paradigmático el grupo de EMA, donde se encuentran diferencias altamente significativas a favor de prácticamente cualquier tipo de alteración y en contra de la presencia de embriones euploides. Esto concuerda no sólo con la mayor dificultad para conseguir gestación que tiene este grupo poblacional, sino también con la mayor tasa de abortos y riesgo de niños nacidos con síndromes cromosómicos [184,186,193-194,196-200,292], y encaja con la teoría asumida de que la edad de los ovocitos está directamente relacionada con errores de segregación.

* En los casos de aborto previo con cariotipo anómalo, se aprecian diferencias significativas en el grupo de embriones que presentan aneuploidías complejas. Por otro lado, el hecho de que en abortos de repetición aparezca un incremento significativo de monosomías, puede achacarse a que algunas pacientes diagnosticadas en este grupo lo son sumando gestaciones en las que se ha confirmado ecográficamente una implantación y situaciones de aborto bioquímico, con un estatus a caballo entre el fallo de implantación/FIV y el aborto. Además, en estos casos de aborto, la tendencia al alza en embriones trisómicos va en la línea de la bibliografía; si bien ésta no indica más que están incrementadas respecto a lo esperado para el grupo de edad [207,209-217], sin desglosar el tipo de aneuploidías detectadas.

* El grupo de fallo repetido de FIV concuerda con lo esperado [243-244,246], puesto que se considera que las monosomías son mucho más deletéreas que cualquier otro tipo de aneuploidía. Salvo el síndrome de Turner, una monosomía en el par sexual en la que aparece un único cromosoma X, no se conocen monosomías compatibles con la vida y ni siquiera suelen encontrarse en los restos abortivos de los que se puede conseguir un diagnóstico genético, aunque tampoco aquí se acostumbra a desglosar el tipo de aneuploidía.

* Dentro del factor masculino, aunque a veces parece no distinguirse entre si es la propia técnica de la ICSI o si está condicionado por la calidad seminal, reflejo o no de una patología previa (v.g.: cariotipo alterado) [229-242], se pueden encontrar razones para ofrecer el DPI (Anexo 7). De cualquier modo, cabe destacar que la indicación de FISH alterado es la que aporta la mayoría de los embriones normales, aunque, en general, también es la indicación por la que más ciclos se han realizado y más embriones se han biopsiados.

* En las parejas de alto riesgo, son las portadoras de mutaciones de enfermedades monogénicas las que paradójicamente menos ciclos han realizado [205] –quizás por desconocimiento de las opciones de selección, si no siempre terapéuticas, disponibles-. En las de anomalías estructurales, translocaciones e inversiones, lo que encontramos es un significativo bajo número de embriones normales, que se relaciona con los resultados bibliográficos, indistintamente de la técnica utilizada para analizarlo [220-229]. Aunque, quizás precisamente debido a dichas técnicas y el procesamiento que necesitan las células, es donde se dan la mayoría de los embriones sin diagnóstico.

Analizando el conjunto de los ciclos, y sus resultados finales, podemos hacerlo desde distintos puntos de vista:

* Ya que la media de embriones normales por ciclo es de 1,67 y la moda de 1, la mayoría de las gestaciones se consiguieron cuando se pudo contar con 3-7 embriones para biopsia, por lo que una opción bastante oportuna podría ser la acumulación de embriones a lo largo de varios ciclos [122].

* Cuando relacionamos el nº de embriones normales con el nº de embriones biopsiados y la indicación, se encuentran diferencias significativas en los casos de translocación robertsoniana, abortos (de repetición y cariotipados), EMA y FISH alterado.

Además, la inmensa mayoría de las gestaciones se dieron cuando cupo la opción de seleccionar los embriones a transferir (4-5 embriones sanos/ciclo), por lo que los ciclos con mejor pronóstico son aquellos en los que se pueden biopsiar al menos 5 embriones.

* La tasa de gestación, una vez realizada la transferencia, se asemeja –con un 32,6%– a las tasas normales (tasa general de Ginefiv en esas fechas, 33.5%, y tasa publicada por la SEF, 36.7%) [313].

Los ciclos de mejor pronóstico de gestación son los de factor masculino; sobre todo FISH alterado, donde más del 45% de los ciclos acabaron en embarazo. Aunque no se ven diferencias significativas.

* Pese a esto, de los embriones transferidos vemos que el 70,4% no llega a dar gestación. De los que sí embarazaron, casi el 60% dieron gestación evolutiva, salvo en los ciclos de fallo de FIV – en los que es significativa la baja tasa de ciclos que concluyen en parto y la alta frecuencia con la que se acaba en BQ– y los de aborto de repetición, en los que sigue siendo significativa la tasa de gestaciones malogradas. Esto nos lleva a pensar que en estas pacientes puede haber otros factores, ajenos a la dotación cromosómica de los embriones y por tanto no analizados en este trabajo, que imposibiliten el desarrollo de la gestación a término [207,214].

* De los embriones que se llegaron a transferir, la mayoría se clasificaron de categoría B, seguido de C y A, lo cual concuerda con la típica forma de campana que se ve en casi cualquier distribución en biología. Por otro lado, si aunáramos los embriones que consiguen gestación con la mitad de los que se contabilizan dentro de gestación indeterminada –debido a que éste grupo está formado por embriones transferidos en grupo y de los que no se puede corroborar cuál dio embarazo, v.g.: dos embriones, del mismo sexo, con resultado de gestación única– los embriones de primera categoría presentan una tendencia muy consistente ($p=0.07$) a la gestación.

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

PERSPECTIVAS FUTURAS

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

En el ámbito de la reproducción, el “Estado actual” no ha hecho más que cambiar a “Perspectivas futuras” a lo largo del tiempo, puesto que con frecuencia aparece una “Review” que recapitula los últimos estudios [88,159,171, 285,289,291,294,300,318], un “What next?” abre el debate, un editorial o carta al director se plantea la idoneidad de las técnicas (de cultivo o de análisis genético) [79,123,126-129,133,249,252,256], y las sociedades científicas: ESHRE, SEF... presentan sus datos [86,249,312-313].

En este tiempo también nos hemos encontrado con noticias como la concesión del Premio Nobel al padre de la embriología moderna [317], lo que te hace reflexionar sobre el hecho de formar parte de un ámbito que ha cambiado la sociedad, que ha suscitado incluso escritos que plantean cuestiones éticas o de política social [130,132,275,314] y se indaga en nuevas causas que pudieran explicar el mal pronóstico reproductivo [319-321], sean o no susceptibles de beneficiarse del DPI.

Pero sobre todo la sensación que queda es:

- Que la dotación cromosómica y la apariencia, la morfología embrionaria, no siempre van de la mano [166-168,172].
- Que, salvo en parejas con riesgo aumentado de generar anomalías genéticas, se tiende a la selección por métodos no invasivos – basados no ya en el metabolismo [173-179] sino en el intento de generar algoritmos relacionados con la secuencia de divisiones celulares [159-160,164-165]- y que esa selección va sobre todo enfocada a la consecución de la gestación (potencial de implantación).
- Que en dichas parejas con “riesgo genético”, la metodología de estudio avanza hacia el estudio molecular de aneuploidías [250,301-303,307,318], cuando no hacia la secuenciación total del genoma celular (“next generation sequencing”) [129-131,316], lo que obliga a la biopsia en blastocisto; aunque ahí aún hay debate ético.
- Que pese a todo esto aún queda algún grupo que sigue aferrado al análisis cromosómico con FISH [304-306].

CONCLUSIONES

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

Según los datos obtenidos en nuestro estudio:

a) Parece validarse la hipótesis de partida de que algunos parámetros morfológicos están directamente relacionados con el estado genético de un embrión:

1) Respecto al cigoto, la diferencia está en la presencia o no de los 2 PN, pero no en su caracterización.

2) Respecto al estado de división celular:

+ En D+2, se relaciona la situación en 4 céls. con mayor probabilidad de euploidía, siendo más probables las aneuploidías a mayor número de células.

+ En D+3, hay mayor probabilidad de resultado normal en embriones de 8 céls., con mayor tendencia a aneuploidía a medida que crece el número de céls. (sobre todo a partir de 10).

+ El grado de fragmentación celular en D+3, se relaciona con aneuploidías en grado mayor del 50%.

+ La evolución del embrión después de la biopsia es más probable en embriones normales y en aquellos en los que sólo se extrae una célula.

3) Respecto a los antecedentes y la indicación de la pareja para la realización del DPI se prevé peor pronóstico en los casos de EMA y de translocación recíproca.

b) Según la evolución del ciclo:

4) No hay diferencias significativas entre el número de embriones analizados y el tipo de paciente.

5) Es altamente probable la cancelación de ciclos en los que se biopsian menos de 3 embriones.

6) Cuando se tienen más de 4 embriones normales, es significativa la probabilidad de conseguir gestación; pero no hay diferencias en función de la indicación.

De cualquier modo, debido a la falta de consenso -que salta a la vista en la bibliografía-, parece que no puede aceptarse como suficiente la revisión de la morfología a la hora de descartar un embrión en los ciclos en los que los riesgos de transmisión de anomalías genéticas son altos, donde “una imagen no vale 23 pares de cromosomas”.

Si bien dichas diferencias parecen permitir, en los ciclos “normales”, una selección bastante atinada del embrión óptimo; probablemente no son suficientes para cancelar una transferencia si se contara con un solo embrión, aunque no se ajustase a los parámetros deseables.

Aunque los diferentes métodos de selección persiguen el mismo objetivo y, posiblemente, elegirían el mismo embrión como óptimo para la transferencia, no es más que el resultado del diagnóstico preimplantacional el que determina su estatus cromosómico.

En definitiva, la ecuación “1 cigoto+ X= 1 embrión+ Y= 1 niño en casa”, aunque las va desvelando, mantiene sus incógnitas.

Nosotros aspiramos a poder definir el algoritmo que minimice, para los pacientes, el riesgo de pasar por un ciclo fallido o sufrir un aborto.

ABREVIATURAS

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

A

ABR.- Abortos de repetición.

ADN.- Ácido desoxirribonucleico.

Ángulo.- Hablamos de ángulo para referirnos al ángulo que forman los corpúsculos polares entre sí y en relación con el eje imaginario que atraviesa ambos pronúcleos en el estado de cigoto.

ANOVA.- En estadística, análisis de la varianza (en inglés, ANalysis Of VAriance).

Array.- método molecular de estudio genético, basado en la hibridación de ADN problema sobre una matriz de ADN conocido.

ART.- Assisted Reproductive Technology/ies (en inglés, técnica/s de reproducción asistida).

ASEBIR.- Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.

B

β -hCG.- Unidad beta de la gonadotropina coriónica humana.

Blasto.- Blastocisto. Estado de evolución embrionaria en el que se aprecia la diferente estructuración entre trofoectodermo, blastocele y masa celular interna.

BOE.- Boletín oficial del estado.

BQ.- Bioquímico. Se refiere a la gestación que sólo se confirma mediante el análisis de la β -hCG, pero no se confirma ecográficamente.

BSA.- Suero de albúmina bovina.

C

C.- Carbono.

CCCO.- Complejo cúmulo-corona-ovocito.

Céls.- Células.

CGH.- Técnica de hibridación comparada del genoma (en inglés, Comparative Genomic Hybridization).

CH₃OH.- Metanol.

CH₃COOH.- Ácido acético.

CO₂.- Dióxido de carbono.

COR, curva.- Acrónimo de Característica Operativa del Receptor.

CP.- Corpúsculo polar.

CPN.- Cuerpos precursores de nucléolos.

D

D+0.- Día 0: Día de la punción ovárica.

D+1.- Día 1 post punción ovárica.

D+2.- Día 2 tras la punción ovárica.

D+3.- Día 3 tras la punción ovárica.

D+4.- Día 4 tras la punción ovárica.

D+5.- Día 5 tras la punción ovárica.

DGP.- Diagnóstico genético preimplantacional.

DNA.- ADN.

dNTP.- Desoxirribonucleótido trifosfato. Sustrato para sintetizar nuevo ADN.

DPI- Diagnóstico preimplantacional.

E

EEVA.- Test de evaluación de viabilidad embrionaria, basado en la tecnología morfocinética de campo oscuro (en inglés, Early Embryo Viability Assessment).

EMA.- Edad materna avanzada.

Emb.- Embrión/embriones.

EP.- Espacio perivitelino.

ESHRE.- Sociedad europea de reproducción humana y embriología (en inglés, European Society of Human Reproduction and Embryology).

F

FISH.- Técnica de hibridación “in situ” con fluorescencia (en inglés, Fluorescent “In Situ” Hybridization).

FIV.- Fecundación “in vitro”.

FPGD.- DGP mediante FISH.

Frag.- Fragmentación celular. Porcentaje de fragmentación celular observada en los embriones en su D+3 de desarrollo.

FSH.- Hormona folículo estimulante.

	G
GnRH.- Hormona liberadora de gonadotropinas.	
	H
h.- horas.	
hCG.- Gonadotropina coriónica humana.	
hCG-r.- Gonadotropina coriónica humana recombinante.	
HMG.- Gonadotropina menopáusica humana.	
HMG-p.- Gonadotropina menopáusica humana purificada.	
HSA.- Suero de albúmina humana.	
	I
IA.- Inseminación artificial.	
ICSI.- Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (en inglés, IntraCytoplasmic Sperm Injection).	
IVF.- FIV.	
	J
	K
KCl.- Cloruro potásico.	
	L
LH.- Hormona luteneizante.	
	M
mg.- Miligramo/s.	
MgCl ₂ .- Cloruro de magnesio.	
M-I.- Metafase I: Estado de metafase de la primera división meiótica.	
M-II.- Metafase II: Estado de metafase de la segunda división meiótica.	
mm.- Milímetro/s.	
MPGD.- DGP con microarrays.	
μl.- Microlitro/s.	
μm.- Micra/s.	
	N
	Ñ

O

OMICS.- Neologismo informal del inglés, referido a los campos de estudio en biología acabados en “-omica”: metabolómica, proteómica... (en inglés, -omics: proteomics, metabolomics...)

P

p.- P valor. En contraste de hipótesis, en estadística, es el mínimo nivel de significación para el cual los datos observados indican que habría que rechazar la hipótesis nula. En general se acepta como estadísticamente significativa la diferencia que hace $p \leq 0.05$.

p.a.- Para análisis.

PBS.- Tampón fosfato salino (en inglés, Phosphate Buffered Saline).

PCOS.- Síndrome de ovario poliquístico (en inglés, Polycystic Ovary Syndrome), situación de alta respondedora.

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, Polymerase Chain Reaction).

PGD.- Diagnóstico genético preimplantacional (en inglés, Preimplantation genetic diagnosis).

PGD-A.- DGP para aneuploidías.

PGS.- Cribado genético preimplantacional (en inglés, Preimplantation genetic screening).

PGT.- Prueba genética preimplantacional (en inglés, Preimplantational genetic testing).

pH.- Índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución.

P-I.- Profase I. Estado de profase de la primera división meiótica.

PLK4.- Proteína de la familia de las polokinasas (en inglés, Polo-Like Kinase 4), con papel en la mitosis.

PN.- Pronúcleo.

PVP.- Polyvinylpyrrolidona: Medio de alta viscosidad que permite enlentecer el movimiento espermático.

Q

R

R., proyecto.- Es un lenguaje y entorno de programación para análisis estadístico y gráfico; proyecto de software libre.

RCT.- Prueba controlada aleatorizada (en inglés, Randomized Controlled Trial).

S

S, phase.- Fase S del ciclo celular, de síntesis, en la que ocurre la replicación del ADN.

SNP.- polimorfismo mononucleótido (en inglés, Single Nucleotide Polymorphism).

SPSS.-Programa estadístico informático (Statistical Package for Social Sciences) desarrollado por IBM (International Business Machines Corp.).

T

Taq, ADN polimerasa.- Un tipo de ADN polimerasa termoestable. Taq proviene de su origen, al ser producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (T-aq).

Time-lapse.- Tecnología de videovigilancia y morfocinética, incorporada a la de incubación embrionaria.

TRA.- Técnica/s de reproducción asistida.

TSH.- Tirotropina, hormona estimulante de la tiroides (en inglés, Thyroid-stimulating hormone).

U

UI.- Unidades internacionales.

V

Vac./s.- Vacuola/s.

VG.- Vesícula germinal (véase P-I).

W

X

Y

Z

ZP.- Zona pelúcida.

Z-score.- Clasificación pronuclear. Puede ser: Z1, Z2, Z3 o Z4.

ANEXOS

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

Anexo 1 (Información a los pacientes y Consentimiento informado)



DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

I. ¿En qué consiste?

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es un método de diagnóstico prenatal que se realiza en el embrión antes de su implantación en el útero.

En las parejas con riesgo de transmitir a la descendencia alteraciones cromosómicas o enfermedades genéticas, el DGP informa sobre el estado de cada uno de los embriones concebidos y permite que únicamente los sanos sean transferidos al útero. La técnica del DGP es el resultado de la combinación de 1) la fecundación "in vitro" (llevada a cabo mediante microinyección intracitoplasmática de espermatozoides, ICSI), 2) la biopsia de células embrionarias y 3) las técnicas de diagnóstico citogenético.

II. ¿Cuándo está indicado?

Cuando existen dudas fundadas sobre la viabilidad de los embriones o riesgo de que presenten alteraciones graves del número o la constitución de los cromosomas.

III. Procedimiento

1. Obtención de los embriones. Deben producirse "in vitro" mediante técnicas de reproducción asistida aún cuando la pareja no presente ningún tipo de anomalía reproductiva que impida la procreación natural (según se especifica en la ley 14/2006).
2. Biopsia embrionaria. La biopsia embrionaria se realiza a las 72-76 horas posteriores a la ICSI, cuando el embrión se encuentra en estadio de 6-8 células. Consiste en extraer una célula del embrión sin que por ello se comprometa su desarrollo normal. Evitando, salvo que sea estrictamente necesaria la obtención de alguna célula más para poder llevar a cabo el estudio.

Una vez realizada la biopsia, el embrión es devuelto al incubador donde se mantendrá en cultivo "in vitro" hasta el momento de la transferencia.

3. Análisis genético diagnóstico. La biopsia obtenida es procesada, según las necesidades de cada caso de estudio, para ser sometida a su análisis.
4. Transferencia embrionaria. El resultado del análisis genético se da a conocer al centro mediante informe detallado y se decide, en consenso con la pareja consultante, qué embriones van a ser transferidos en función de la constitución cromosómica y las características morfológicas de viabilidad embrionaria.



IV. Resultados

La eficacia global del DGP depende del rendimiento del método de diagnóstico, del número de embriones disponibles y de su potencial de evolución. El registro de nacidos vivos después de la aplicación de DGP muestra que el procedimiento es eficaz y que no se asocia a otras anomalías debidas a la técnica.

V. Riesgos

El DGP eleva hasta niveles cercanos a la certeza la probabilidad de gestar individuos exentos de la enfermedad genética diagnosticada. Sin embargo se aconseja que la madre se someta a un diagnóstico prenatal clásico (amniocentesis, biopsia de corion) para confirmar el diagnóstico.

El DGP presenta en la actualidad un 7.2% de error de diagnóstico (Munné et al. (2001) RBMonline 4(2): 183-196) siendo éste debido a la combinación de las propias limitaciones de la técnica de FISH y al mosaicismo embrionario. En cuanto a la eficacia de la técnica de FISH, existe un porcentaje variable de embriones en los que no es posible obtener ningún resultado concluyente y que el equipo recomendaría no transferir. En cuanto al mosaicismo embrionario, es posible que las células analizadas no presenten alteraciones, pero que otras células del embrión biopsiado sí tengan anomalías genéticas. Este fenómeno recibe el nombre de mosaicismo embrionario y puede limitar la eficacia clínica de la técnica. El error de diagnóstico por mosaicismo embrionario es del 5.6% (Munné et al. (2002)RBMonline 4(3): 223-232).

Por otro lado algunos embriones también pueden resultar afectados por la técnica de biopsia embrionaria en un 0.7%.

VI. Aspectos legales generales relacionados con la reproducción asistida y particulares sobre el diagnóstico genético preimplantacional

Las técnicas de reproducción asistida tienen como finalidad fundamental la actuación médica ante la esterilidad humana, para facilitar la procreación, cuando otras terapéuticas se hayan descartado por inadecuadas o ineficaces.

También pueden utilizarse en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético o hereditario, cuando sea posible recurrir a ellas con suficientes garantías diagnósticas y terapéuticas y estén estrictamente indicadas.

Sólo pueden llevarse a cabo cuando haya posibilidades razonables de éxito y no supongan riesgo grave para la salud de la mujer o de la posible descendencia.

El marco jurídico regulador del diagnóstico genético preimplantacional está constituido básicamente por la Ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Asistida y sus normas de desarrollo. La Ley establece que toda intervención sobre el embrión vivo, "in vitro", con fines diagnósticos, no podrá tener otra finalidad que la valoración de su viabilidad, o la detección de enfermedades hereditarias, a fin de tratarlas o de desaconsejar su transferencia. Asimismo, cuando los fines que se persiguen son terapéuticos, la intervención no puede tener otro propósito que el de tratar una



enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas, y ello bajo los siguientes requisitos:

- a) Que la pareja haya sido rigurosamente informada sobre los procedimientos, investigaciones diagnósticas, posibilidades y riesgos de la terapéutica propuesta y las hayan aceptado previamente.
- b) Que se trate de enfermedades con un diagnóstico muy preciso, de pronóstico grave o muy grave, y cuando ofrezcan garantías, al menos razonables, de la mejoría o solución del problema.
- c) Que se disponga de una lista de enfermedades en las que la terapéutica sea posible con criterios estrictamente científicos.
- d) Que no se influya en los caracteres hereditarios no patológicos, ni se busque la selección de los individuos.
- e) Que se realice en centros sanitarios autorizados y por equipos cualificados y dotados de los medios necesarios.

En cuanto a la necesidad de que los embriones a diagnosticar se obtengan mediante una fecundación "in vitro", dicha obligación deriva de la prohibición legal de obtenerlos por lavado uterino (infracción considerada muy grave por la ley).

Finalmente, debe significarse la relevancia para esta técnica del Convenio de Oviedo sobre derechos humanos y biomedicina, de 1997, que limita las pruebas predictivas de enfermedades genéticas a fines médicos o de investigación médica y con un asesoramiento genético apropiado.

VII. Alternativas ante el fracaso de la técnica

- Utilización de gametos (ovocitos o semen) de donante, según sea el portador de la enfermedad/riesgo de anomalía cromosómica.
- Gestación natural seguida de diagnóstico prenatal, siempre que la pareja considere la posibilidad de interrupción voluntaria del embarazo si se detectan anomalías en el feto.
- Adopción legal.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIONAL

Los abajo firmantes,

D^a D.N.I. n^o
D. D.N.I. n^o

Declaran:

- Que por sus antecedentes personales o familiares existe riesgo de transmitir alguna patología hereditaria grave a su descendencia. Y que con la finalidad de evitar en lo posible dicha transmisión, les ha sido explicada la posibilidad de llevar a cabo, dentro de su ciclo de fecundación "in vitro" el estudio y diagnóstico de las alteraciones cromosómicas de sus embriones.
- Haber leído y comprender el siguiente informe, así como haber sido informados, por parte de los profesionales del Equipo, de cuantos detalles hayan considerado oportunos respecto a los pormenores de las técnicas del DGP, tal como se especifica en la Ley 14/2006 de 26 de mayo.

Entienden que con el DGP se detectarán exclusivamente las anomalías genéticas correspondientes a las alteraciones estudiadas. Ello implica que el preembrión pudiera ser portador de alguna otra alteración para la cual no se haya realizado el estudio genético, sin que ello implique ninguna responsabilidad por parte del Equipo; y conocen que el DGP presenta en la actualidad un 7.2% de error diagnóstico, para la determinación de alteraciones numéricas cromosómicas; siendo éste debido tanto al fenómeno del mosaicismo embrionario como a la propia eficacia de la técnica de FISH, existe un porcentaje variable de embriones en los que no es posible obtener ningún resultado concluyente y que el equipo recomienda no transferir. (Munné et al. (2001) RBMonline 4(2): 183-196) (Munné et al. (2002) RBMonline 4 (3): 223-232).

Por otro lado algunos embriones también pueden resultar afectados por la técnica de la biopsia embrionaria en un 0.7%, por lo que renuncian expresamente a cualquier reclamación legal por este motivo.

Asimismo, renuncian expresamente a cualquier tipo de reclamación legal en caso de que no se produjera embarazo o en caso de que, en contra del informe emitido por el Equipo, se demandara por parte de la pareja la transferencia de preembriones inadecuados que dieran lugar a gestaciones de fetos afectados por la enfermedad.



Por todo ello, consienten en que el Equipo realice el estudio siguiente de DGP (señalar la opción elegida):

- * Screening de aneuploidias de: 3 5 7 9 24 cromosomas,
- * Estudio de reorganizaciones:
 - Inversiones
 - Translocaciones recíprocas
 - Translocaciones robertsonianas
- * Enfermedad monogénica

En sus preembriones, obtenidos por técnicas de reproducción asistida.

El DGP eleva hasta niveles cercanos a la certeza la probabilidad de gestar individuos exentos de la enfermedad genética diagnosticada; sin embargo se aconseja que la madre se someta a un diagnóstico prenatal clásico (amniocentesis, biopsia de corion) para confirmar el diagnóstico.

En Madrid, a de de 20 .

Por el equipo GINEFIV
Dr./a.

Fdo. D^a.

Fdo. D.

Anexo 2 (Estimulación ovárica)

- Criterios de estimulación:
 - Criterios Internacionales de Róterdam: “Róterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group; 2004”
 - Criterios internacionales del Consenso de Bologna 2011: Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L; “ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. Hum Reprod. 2011 Jul; 26(7):1616-24. doi: 10.1093/humrep/der092. Epub 2011 Apr 19.”
- Agonistas de GnRH:
 - Leuprolide: Lupron® depot, Abbott Laboratories, Chicago, IL, Estados Unidos.
 - Nafarelina: Synarel®, Pfizer, NY, Estados Unidos.
 - Triptorelina: Decapeptyl® mensual, Ipsen pharma, París, Francia.
- Antagonistas de GnRH:
 - Cetrorelix: Cetrotide®, Serono, Geneve, Suiza.
 - Ganirelix: Orgalutran®, Organon española, Barcelona, España
- Inducción de ovulación:
 - hCG recombinante: Ovitrelle®, Serono.

Anexo 3 (Obtención y biopsia de embriones)

- Sistema de captación:
 - Pipeta pasteur estéril (5'75")- Humagen™ Fertility Diagnostics, Charlottesville, VA, Estados Unidos.
 - Jeringa estéril (1 ml)- BD Plastipak; Becton Dickinson S.A., Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos.
 - Filtro microporo (0.20 µm)- Minisart®; Sartorius AG, Alemania.
 - Tubo de teflón.
- Placas:
 - De captación de ovocitos- Falcon® 100x15 mm; Becton Dickinson.
 - De cultivo tras punción- IVF multidish; Nunc™, Dinamarca.
- Medios de cultivo y trabajo:
 - De cultivo hasta su decumulación previa a microinyección: Medio tampón bicarbonato, con suero de albúmina humana y penicilina G- G-FERT™ PLUS; Vitrolife, Suecia.

- Solución para decumulación, en relación 1:9, de HYASE™-10X, Vitrolife y MOPS PLUS™, Vitrolife.
- Estufas de incubación:
 - Inkubator-C200; Labotect, Alemania.
 - Heraeus-BB6060; Heraeus, Alemania.
- Sistema de decumulación:
 - Pipetas Stripper Tips, Mid-Atlantica Diagnostics o pipetas Swemed, Vitrolife de 135 o 150 µm de diámetro.
 - Sistema de sujeción/aspiración para capilares.
- Proceso de microinyección:
 - Micropipetas Holding e ICSI- MICROPIPETS Humagen™.
 - Medio de trabajo- microgotas de 20 µl de MOPS PLUS™, Vitrolife.
 - Medio de alta viscosidad, PVP y albúmina humana recombinante- ICSI™, Vitrolife.
- Proceso de biopsia embrionaria:
 - Medio de biopsia: G-PGD™ (Vitrolife), tampón, libre de calcio, magnesio y proteínas, suplementado con HSA™ (Vitrolife), suero de albúmina humana, en una proporción 95:5.
 - Ácido: Acidified Tyrodes Solution, Medi Cult a/s, Dinamarca.
 - Láser y sistema de captura de imágenes: Saturn Laser System y Sistema Cronus 3, Research Instruments, Ltd, Reino Unido.
 - Pipeta de “hatching”: Zona drilling pipette, Cook Ireland Ltd.
 - Pipeta de biopsia: Biopsy micropipets, Humagen™.
- Medios de cultivo y trabajo:
 - De cultivo hasta su biopsia, en D+3: G1 v3 PLUS, Vitrolife.
 - De cultivo tras su biopsia hasta su transferencia: G2 v3 PLUS, Vitrolife.
- Placas: en todas las placas, tanto de trabajo como de cultivo, los medios son cubiertos con aceite de parafina filtrado, estéril- Ovoil™, Vitrolife.
- Área de trabajo, todos los procedimientos distintos a los de micromanipulación se realizan con el mismo equipo:
 - Cabina calefactada de flujo laminar - K-Systems, Dinamarca.
 - Microscopio estereoscópico - Nikon SMZ800, Japón.
- Procesos de micromanipulación- todos los procesos de micromanipulación se realizan con el mismo equipo, que consta de:
 - Microscopio invertido- Nikon Eclipse TE-200-S, Japón.

- Superficie calefactada- Thermo Plate®; Tokai Hit co, LTD., Japón.
- Micromanipuladores- Narishinge-Nikon, Japón.

Anexo 4 (Fijación o entubado celular)

- Medio hipotónico:
 - 1 litro de agua ultrapura
 - 5.6 g de KCl
 - 6 g de BSA
- Medio de fijación- es una modificación del método de Carnoy, con una solución 3 CH₃OH:1 CH₃COOH de:
 - CH₃OH, p.a.- Merck KGaA, Alemania.
 - CH₃COOH (glacial), 100% anhidro, p.a.- Merck KGaA, Alemania.
- Medio de entubado:
 - Medio tampón, de lavado, a base de PBS.
 - Puntas con filtro, libres de ADN.
 - Tubo de PCR.
 - Medio de lisis: combinación de detergentes y proteinasa K.

Anexo 5 (Transferencia embrionaria)

- Sistema de transferencia:
 - Sonda de tipo flexible- Embryo Transfer Catheter Set, Labotect.
 - Sonda de tipo rígido- Emtrac Set, Gynétics Medical Products, Bélgica.
- Medio de transferencia:
 - Embryogluce, Vitrolife.
 - G2 v3 PLUS, Vitrolife.
- Apoyo de fase lútea, progesterona natural micronizada, con dosis de 600 mg/día (200 mg/ 8 h):
 - Progeffik®, Effik, Madrid, España.
 - Utrogestán®, Seid, Barcelona, España.
- Preparación endometrial en ciclo sustituido: estradiol 2 mg/ 8-12 horas o 100-200 mg/ 72 h:
 - Meriestra- Novartis farmacéutica, Madrid, España.
 - Progynova, Bayer Hispania, España.
 - Estraderm, Novartis farmacéutica.

Anexo 6 (Resultados)

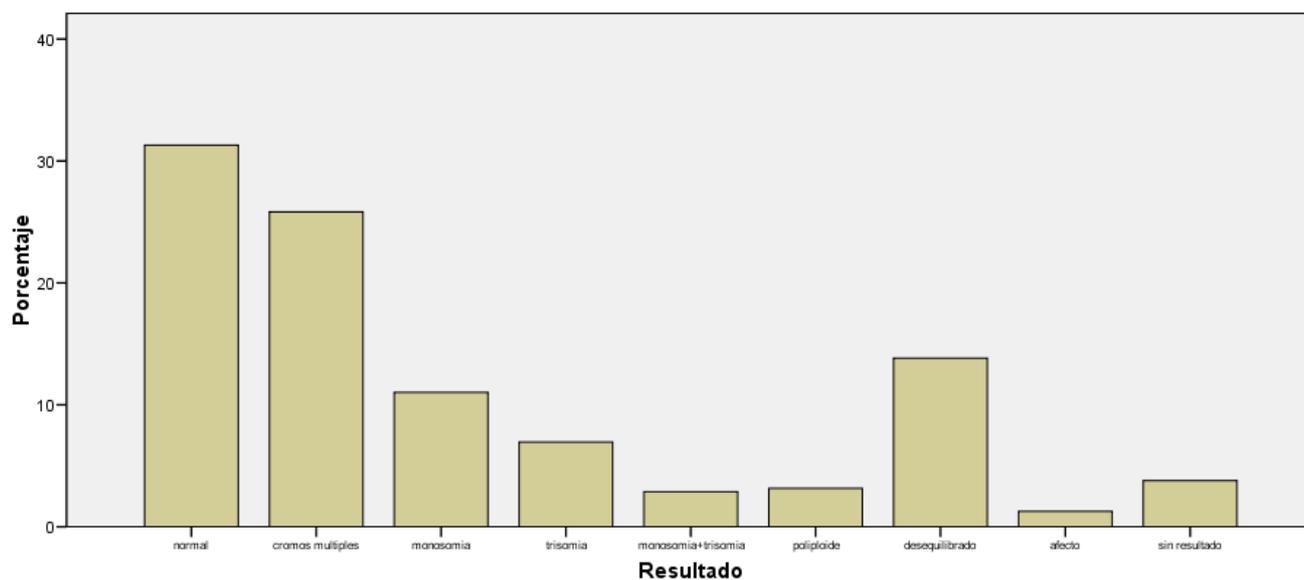
¿Es predecible el estado genético de un embrión?

Anexo 6. I.

Resultado

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	normal	446	31,3	31,3	31,3
	cromos multiples	368	25,8	25,8	57,1
	monosomia	157	11,0	11,0	68,1
	trisomia	99	6,9	6,9	75,1
	monosomia+trisomia	41	2,9	2,9	78,0
	poliploide	45	3,2	3,2	81,1
	desequilibrado	197	13,8	13,8	94,9
	afecto	18	1,3	1,3	96,2
	sin resultado	54	3,8	3,8	100,0
	Total	1425	100,0	100,0	

Resultado

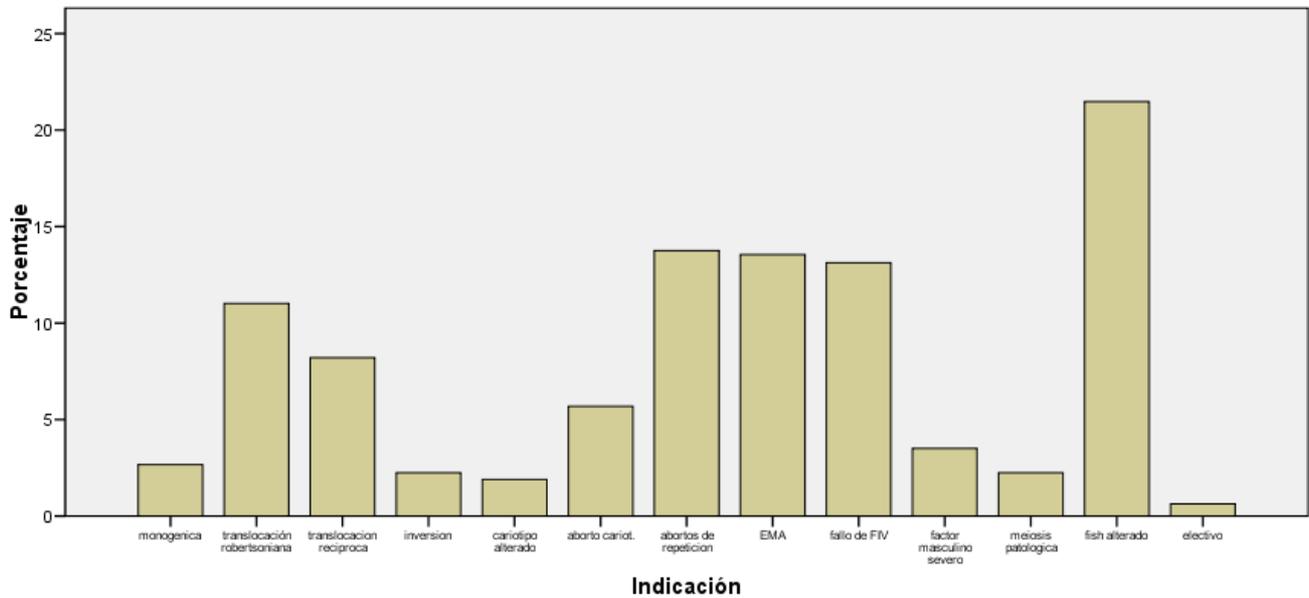


Anexo 6. II.

Indicación

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	monogenica	38	2,7	2,7	2,7
	translocación robertsoniana	157	11,0	11,0	13,7
	translocacion reciproca	117	8,2	8,2	21,9
	inversion	32	2,2	2,2	24,1
	cariotipo alterado	27	1,9	1,9	26,0
	aborto cariot.	81	5,7	5,7	31,7
	abortos de repeticion	196	13,8	13,8	45,5
	EMA	193	13,5	13,5	59,0
	fallo de FIV	187	13,1	13,1	72,1
	factor masculino severo	50	3,5	3,5	75,6
	meiosis patologica	32	2,2	2,2	77,9
	fish alterado	306	21,5	21,5	99,4
	electivo	9	,6	,6	100,0
	Total	1425	100,0	100,0	

Indicación

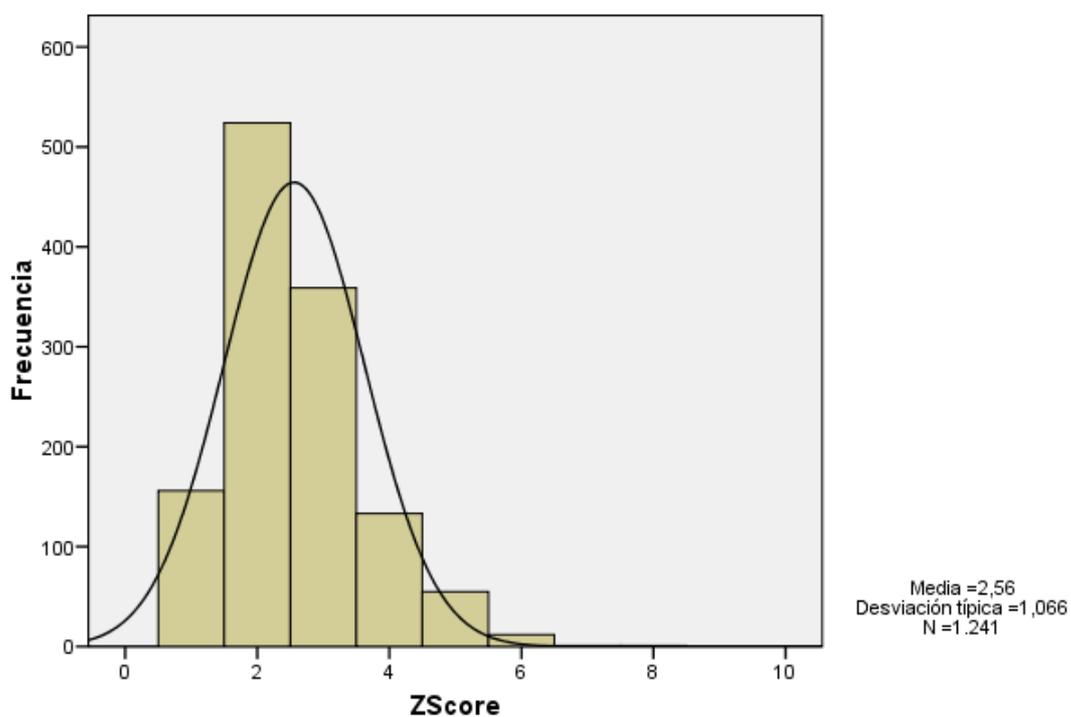


Anexo 6. III.

ZScore

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Z1	156	10,9	12,6	12,6
	Z2	524	36,8	42,2	54,8
	Z3	359	25,2	28,9	83,7
	Z4	133	9,3	10,7	94,4
	2CP, CP frag	55	3,9	4,4	98,9
	1PN	12	,8	1,0	99,8
	2PN poco nít.	1	,1	,1	99,9
	2 céls.	1	,1	,1	100,0
	Total	1241	87,1	100,0	
Perdidos	Sistema	184	12,9		
Total		1425	100,0		

Histograma



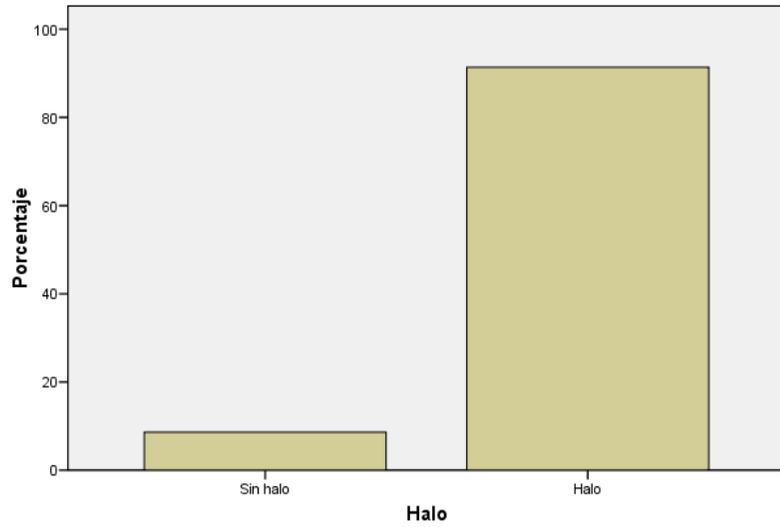
Halo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Sin halo	102	7,2	8,6	8,6
	Halo	1082	75,9	91,4	100,0
	Total	1184	83,1	100,0	
Perdidos	Sistema	241	16,9		
Total		1425	100,0		

Angulo

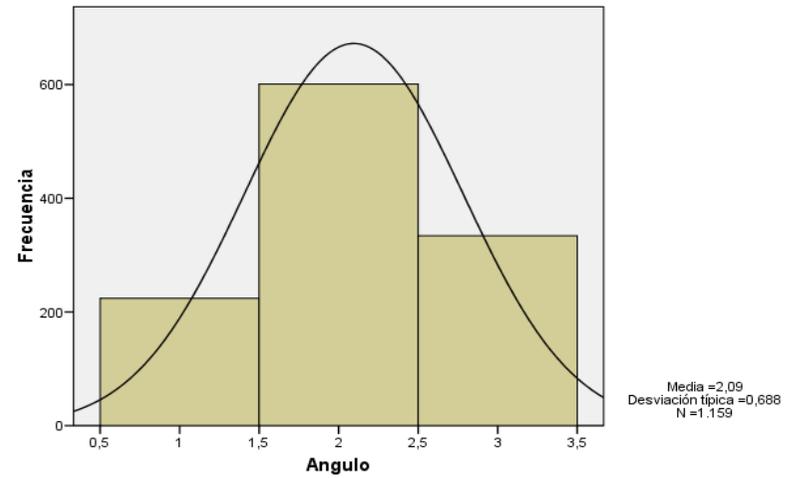
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Alf a	224	15,7	19,3	19,3
	Beta	601	42,2	51,9	71,2
	Gamma	334	23,4	28,8	100,0
	Total	1159	81,3	100,0	
Perdidos	Sistema	266	18,7		
Total		1425	100,0		

Halo



Anexo 6. V.

Histograma



Anexo 6. IV.

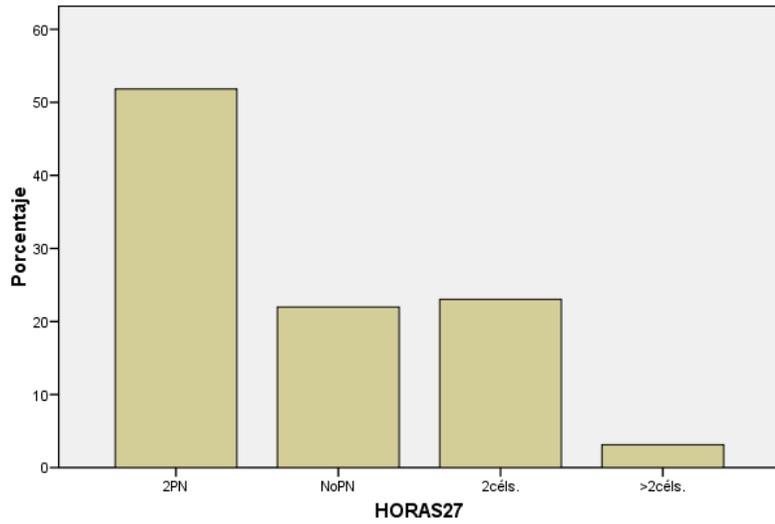
HORAS27

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	2PN	99	6,9	51,8	51,8
	NoPN	42	2,9	22,0	73,8
	2céis.	44	3,1	23,0	96,9
	>2céis.	6	,4	3,1	100,0
	Total	191	13,4	100,0	
Perdidos	Sistema	1234	86,6		
Total		1425	100,0		

VAC

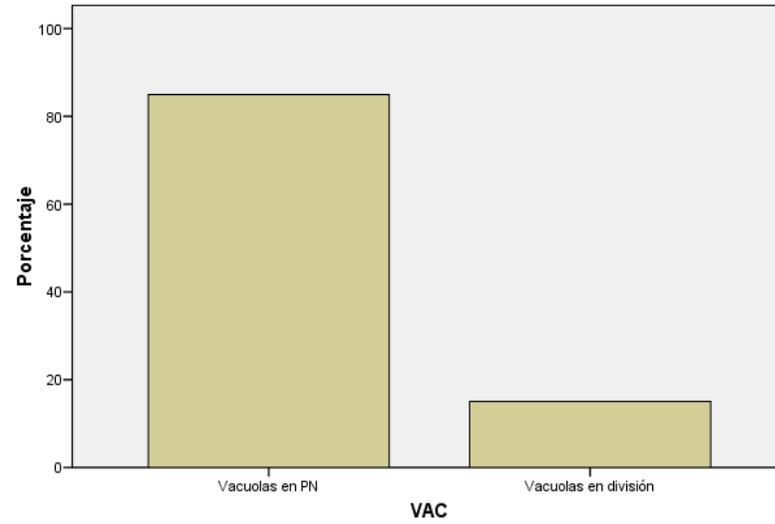
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Vacuolas en PN	79	5,5	84,9	84,9
	Vacuolas en división	14	1,0	15,1	100,0
	Total	93	6,5	100,0	
Perdidos	Sistema	1332	93,5		
Total		1425	100,0		

HORAS27



Anexo 6. VII.

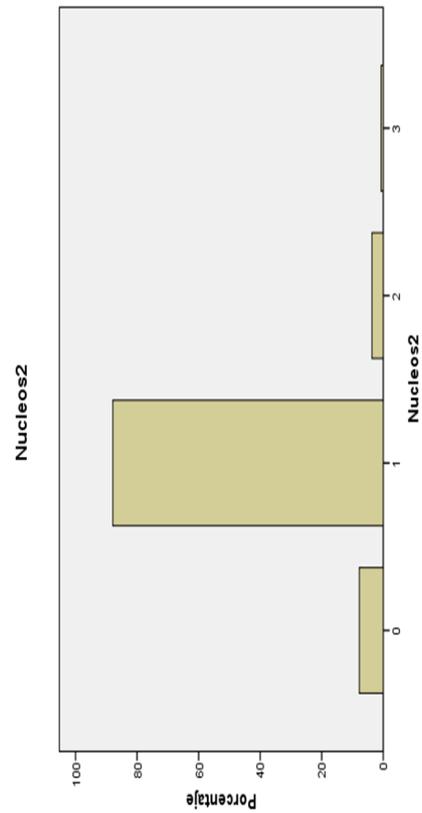
VAC



Anexo 6. VI.

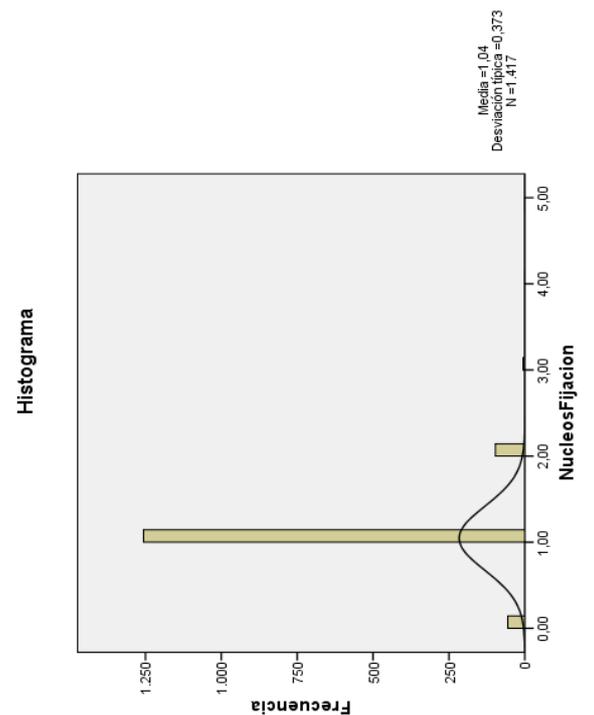
Anexo 6. VIII.

Nucleos2				
Válidos	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	111	7,8	7,8	7,8
1	1252	87,9	87,9	95,6
2	52	3,6	3,6	99,3
3	10	,7	,7	100,0
Total	1425	100,0	100,0	



Anexo 6. IX.

NucleosFijacion				
Válidos	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
,00	29	2,0	2,0	2,0
,01	2	,1	,1	2,2
,02	4	,3	,3	2,5
,03	2	,1	,1	2,6
,04	6	,4	,4	3,0
,05	1	,1	,1	3,1
,06	3	,2	,2	3,3
,07	4	,3	,3	3,6
,08	2	,1	,1	3,7
,09	1	,1	,1	3,8
,10	2	,1	,1	4,0
1,00	1186	83,2	83,7	87,6
1,01	45	3,2	3,2	90,8
1,02	9	,6	,6	91,5
1,03	5	,4	,4	91,8
1,04	3	,2	,2	92,0
1,05	1	,1	,1	92,1
1,06	2	,1	,1	92,2
1,08	1	,1	,1	92,3
1,10	3	,2	,2	92,5
1,14	1	,1	,1	92,6
2,00	79	5,5	5,6	98,2
2,01	11	,8	,8	98,9
2,02	5	,4	,4	99,3
2,05	2	,1	,1	99,4
3,00	4	,3	,3	99,7
3,01	2	,1	,1	99,9
4,00	1	,1	,1	99,9
5,00	1	,1	,1	100,0
Total	1417	99,4	100,0	
Perdidos Sistema	8	,6		
Total	1425	100,0		

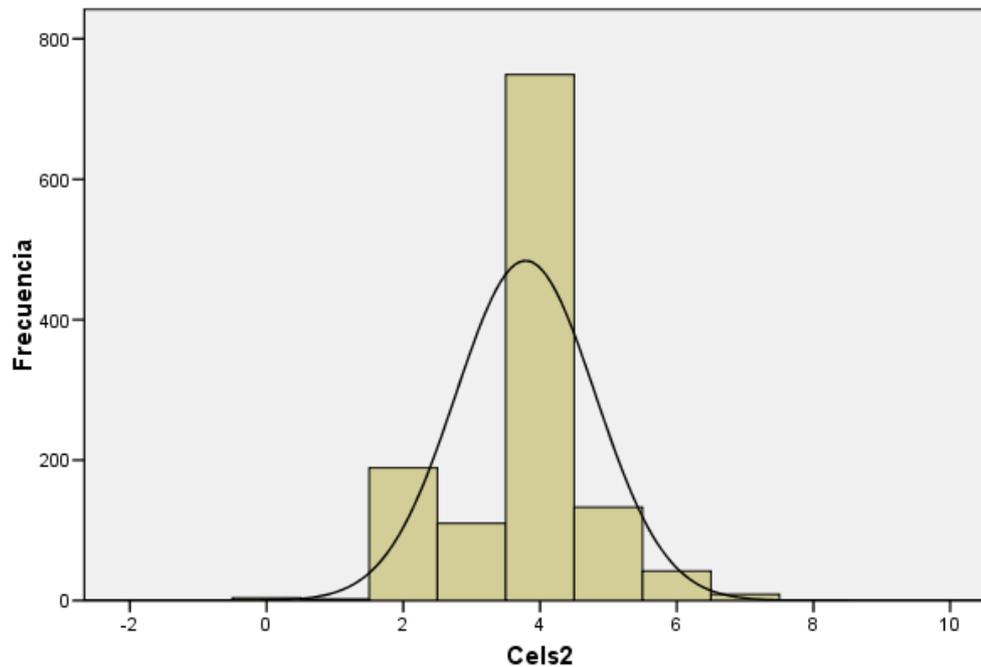


Anexo 6. X.

Cels2

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	4	,3	,3	,3
	1	2	,1	,2	,5
	2	189	13,3	15,3	15,7
	3	110	7,7	8,9	24,6
	4	749	52,6	60,5	85,1
	5	133	9,3	10,7	95,8
	6	42	2,9	3,4	99,2
	7	9	,6	,7	99,9
	8	1	,1	,1	100,0
	Total	1239	86,9	100,0	
Perdidos	Sistema	186	13,1		
Total		1425	100,0		

Histograma



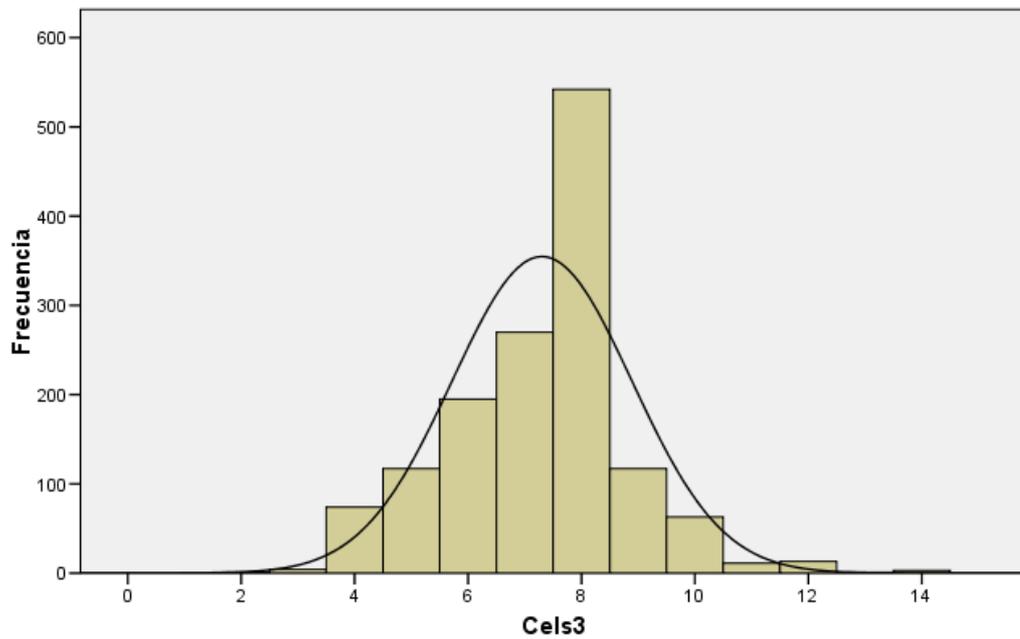
Media =3,79
Desviación típica =1,021
N =1.239

Anexo 6. XI.

Cels3

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	2	1	,1	,1	,1
	3	4	,3	,3	,4
	4	74	5,2	5,2	5,6
	5	117	8,2	8,3	13,9
	6	195	13,7	13,8	27,7
	7	270	18,9	19,1	46,8
	8	542	38,0	38,4	85,3
	9	117	8,2	8,3	93,6
	10	63	4,4	4,5	98,0
	11	11	,8	,8	98,8
	12	13	,9	,9	99,7
	13	1	,1	,1	99,8
	14	3	,2	,2	100,0
	Total	1411	99,0	100,0	
Perdidos	Sistema	14	1,0		
Total		1425	100,0		

Histograma



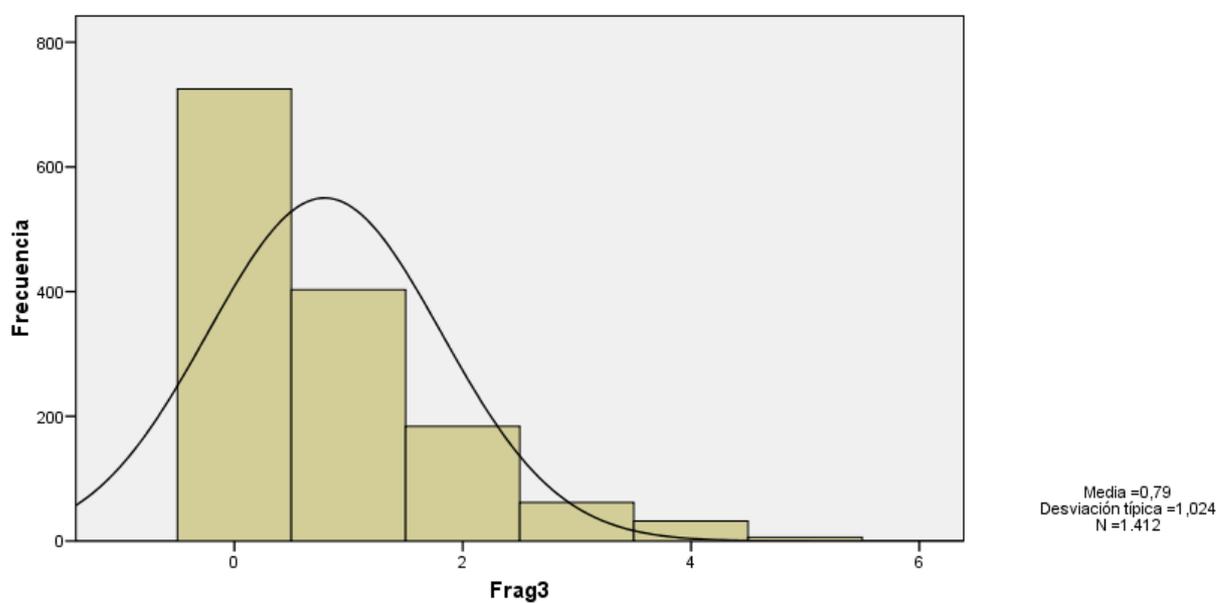
Media =7,3
 Desviación típica =1,586
 N =1.411

Anexo 6. XII.

Frag3

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<10%	725	50,9	51,3	51,3
	10-19%	403	28,3	28,5	79,9
	20-29%	184	12,9	13,0	92,9
	30-39%	62	4,4	4,4	97,3
	40-49%	32	2,2	2,3	99,6
	>50%	6	,4	,4	100,0
	Total	1412	99,1	100,0	
Perdidos	Sistema	13	,9		
Total		1425	100,0		

Histograma



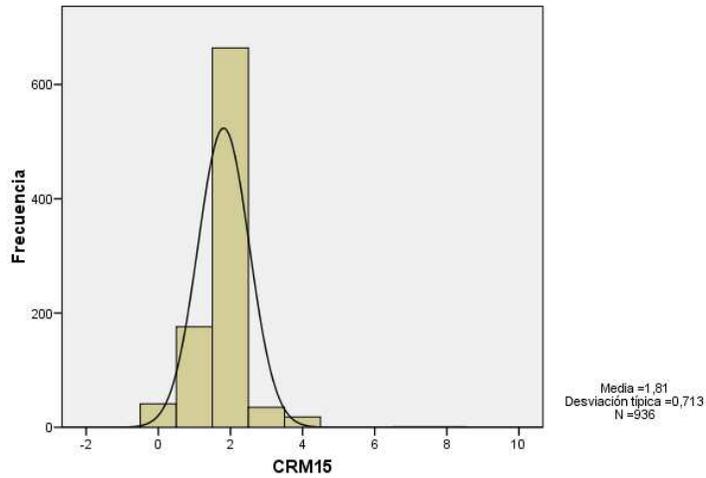
CRM15

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	41	2,9	4,4	4,4
	1	176	12,4	18,8	23,2
	2	664	46,6	70,9	94,1
	3	35	2,5	3,7	97,9
	4	18	1,3	1,9	99,8
	7	1	,1	,1	99,9
	8	1	,1	,1	100,0
	Total	936	65,7	100,0	
Perdidos	Sistema	489	34,3		
Total		1425	100,0		

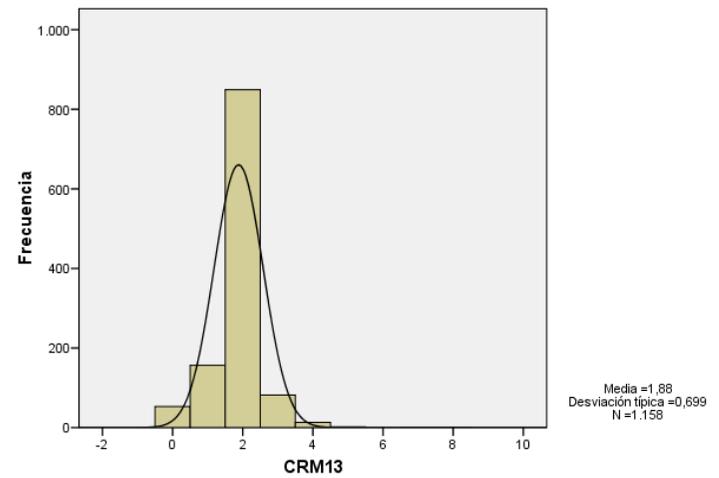
CRM13

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	53	3,7	4,6	4,6
	1	157	11,0	13,6	18,1
	2	849	59,6	73,3	91,5
	3	82	5,8	7,1	98,5
	4	13	,9	1,1	99,7
	5	2	,1	,2	99,8
	7	1	,1	,1	99,9
	8	1	,1	,1	100,0
	Total	1158	81,3	100,0	
Perdidos	Sistema	267	18,7		
Total		1425	100,0		

Histograma



Histograma



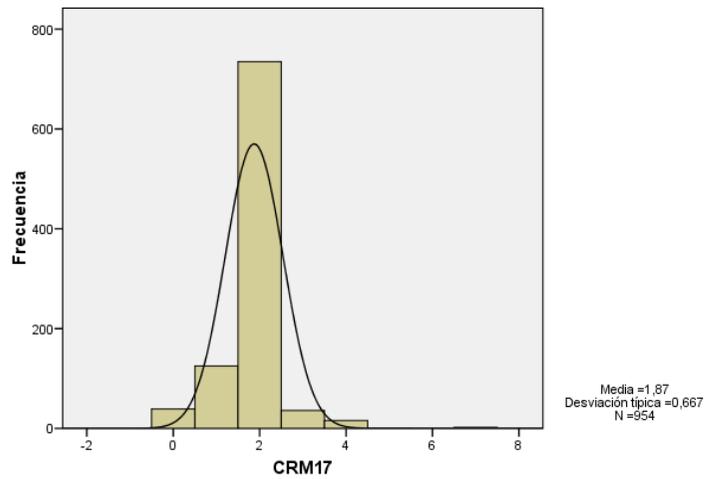
CRM17

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	39	2,7	4,1	4,1
	1	125	8,8	13,1	17,2
	2	735	51,6	77,0	94,2
	3	36	2,5	3,8	98,0
	4	16	1,1	1,7	99,7
	5	1	,1	,1	99,8
	7	2	,1	,2	100,0
	Total	954	66,9	100,0	
Perdidos	Sistema	471	33,1		
Total		1425	100,0		

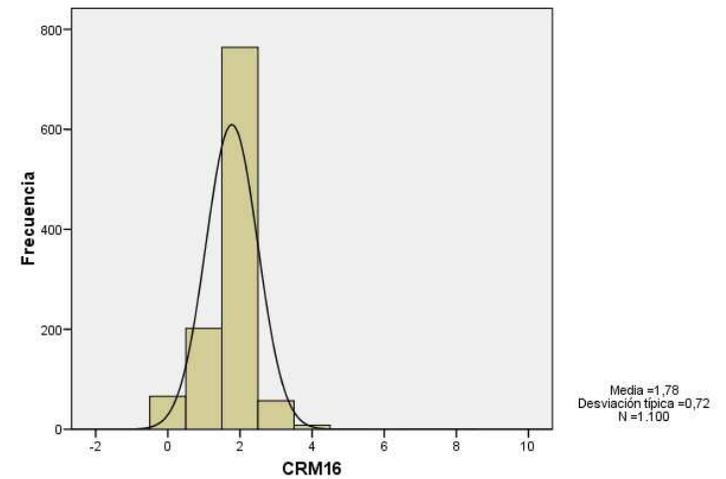
CRM16

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	66	4,6	6,0	6,0
	1	202	14,2	18,4	24,4
	2	764	53,6	69,5	93,8
	3	57	4,0	5,2	99,0
	4	8	,6	,7	99,7
	5	1	,1	,1	99,8
	7	1	,1	,1	99,9
	8	1	,1	,1	100,0
	Total	1100	77,2	100,0	
Perdidos	Sistema	325	22,8		
Total		1425	100,0		

Histograma



Histograma



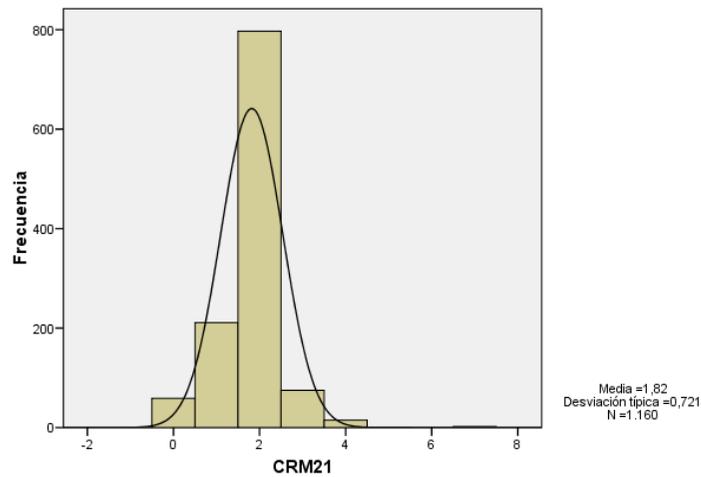
CRM21

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	59	4,1	5,1	5,1
	1	211	14,8	18,2	23,3
	2	797	55,9	68,7	92,0
	3	75	5,3	6,5	98,4
	4	15	1,1	1,3	99,7
	5	1	,1	,1	99,8
	7	2	,1	,2	100,0
	Total	1160	81,4	100,0	
Perdidos	Sistema	265	18,6		
Total		1425	100,0		

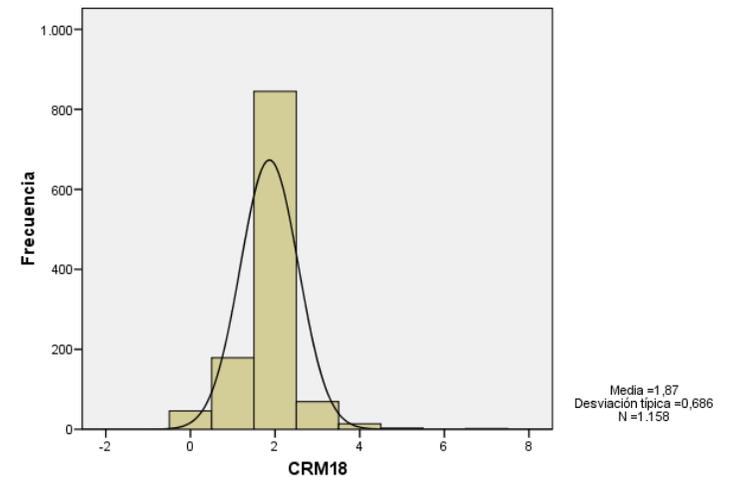
CRM18

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	46	3,2	4,0	4,0
	1	179	12,6	15,5	19,4
	2	845	59,3	73,0	92,4
	3	69	4,8	6,0	98,4
	4	14	1,0	1,2	99,6
	5	3	,2	,3	99,8
	7	2	,1	,2	100,0
	Total	1158	81,3	100,0	
Perdidos	Sistema	267	18,7		
Total		1425	100,0		

Histograma



Histograma

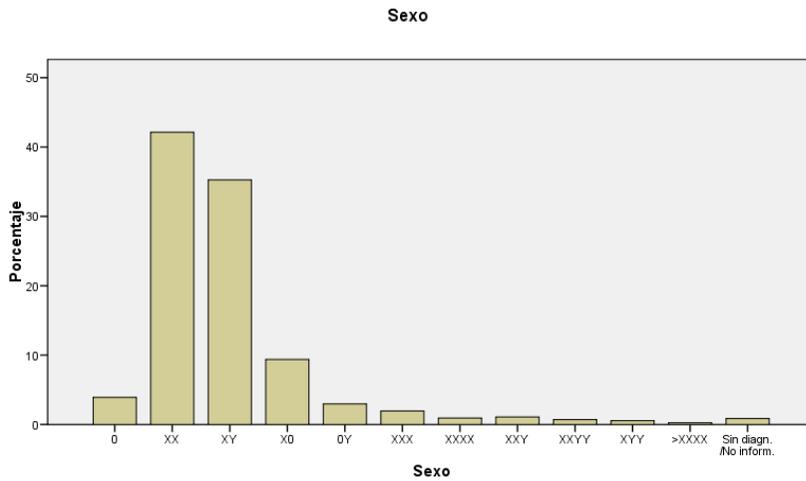


Sexo

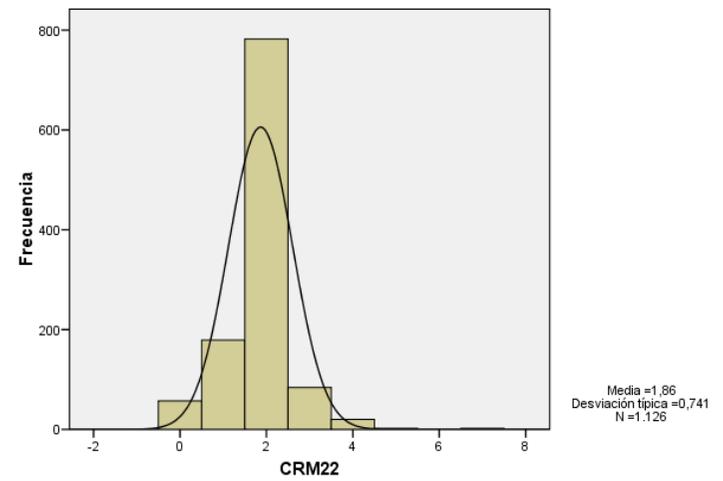
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	50	3,5	3,9	3,9
	XX	539	37,8	42,1	46,1
	XY	451	31,6	35,3	81,3
	X0	120	8,4	9,4	90,7
	0Y	38	2,7	3,0	93,7
	XXX	25	1,8	2,0	95,6
	XXXX	12	,8	,9	96,6
	XXY	14	1,0	1,1	97,7
	XXYY	9	,6	,7	98,4
	XYY	7	,5	,5	98,9
	>XXXX	3	,2	,2	99,1
	Sin diagn./No inform.	11	,8	,9	100,0
	Total	1279	89,8	100,0	
Perdidos	Sistema	146	10,2		
Total		1425	100,0		

CRM22

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	57	4,0	5,1	5,1
	1	179	12,6	15,9	21,0
	2	782	54,9	69,4	90,4
	3	84	5,9	7,5	97,9
	4	20	1,4	1,8	99,6
	5	2	,1	,2	99,8
	7	2	,1	,2	100,0
	Total	1126	79,0	100,0	
Perdidos	Sistema	299	21,0		
Total		1425	100,0		

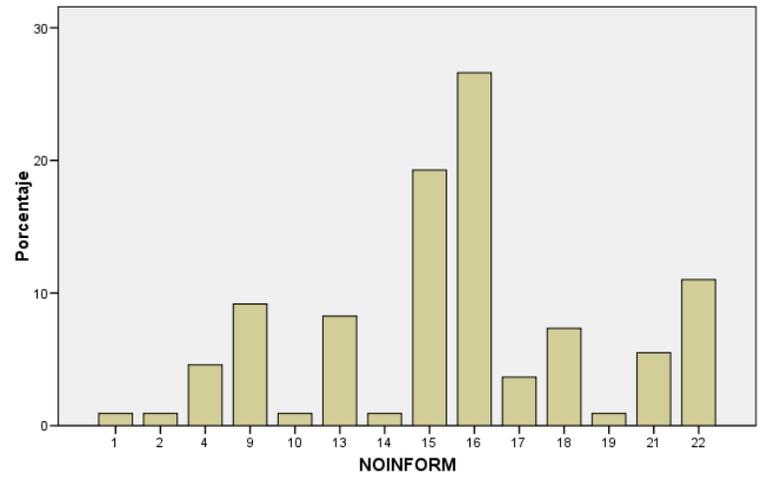


Histograma



NOINFORM

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1	1	,1	,9	,9
	2	1	,1	,9	1,8
	4	5	,4	4,6	6,4
	9	10	,7	9,2	15,6
	10	1	,1	,9	16,5
	13	9	,6	8,3	24,8
	14	1	,1	,9	25,7
	15	21	1,5	19,3	45,0
	16	29	2,0	26,6	71,6
	17	4	,3	3,7	75,2
	18	8	,6	7,3	82,6
	19	1	,1	,9	83,5
	21	6	,4	5,5	89,0
	22	12	,8	11,0	100,0
	Total	109	7,6	100,0	
Perdidos	Sistema	1316	92,4		
	Total	1425	100,0		



Anexo 6. XIV.

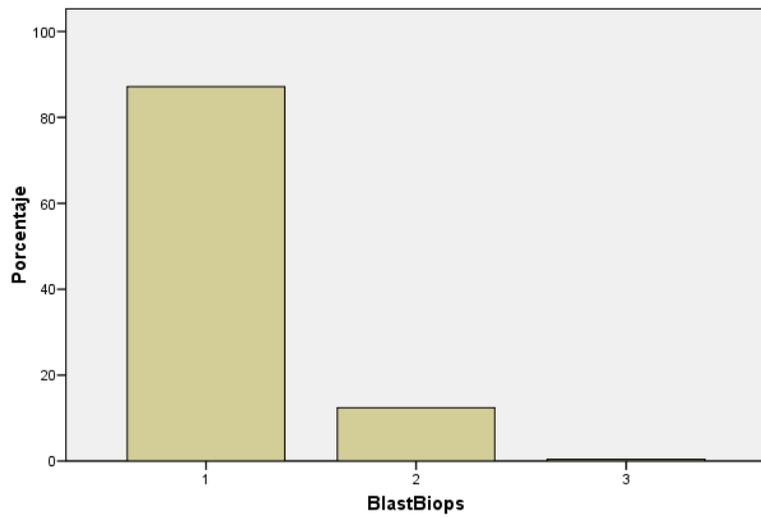
BlastBiops

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1	1221	85,7	87,2	87,2
	2	174	12,2	12,4	99,6
	3	6	,4	,4	100,0
	Total	1401	98,3	100,0	
Perdidos	Sistema	24	1,7		
Total		1425	100,0		

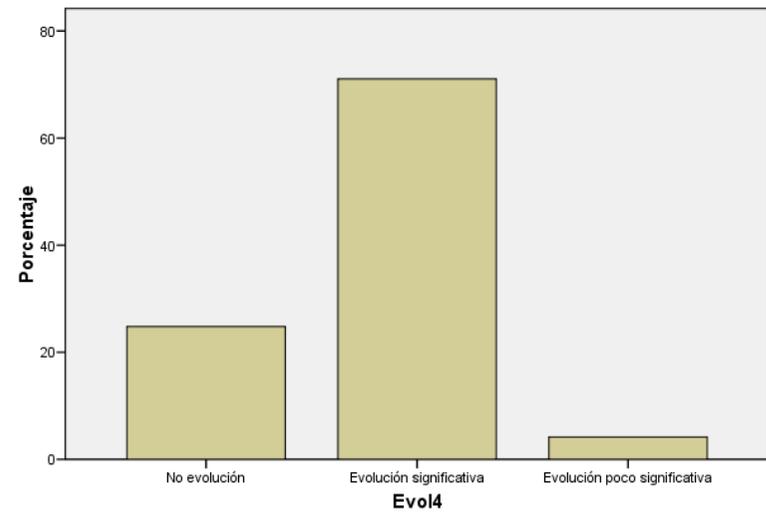
Evol4

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No evolución	346	24,3	24,8	24,8
	Ev olución significativa	991	69,5	71,0	95,8
	Ev olución poco significativa	58	4,1	4,2	100,0
	Total	1395	97,9	100,0	
Perdidos	Sistema	30	2,1		
Total		1425	100,0		

BlastBiops



Evol4



Anexo 6. XVI.

Anexo 6. XV.

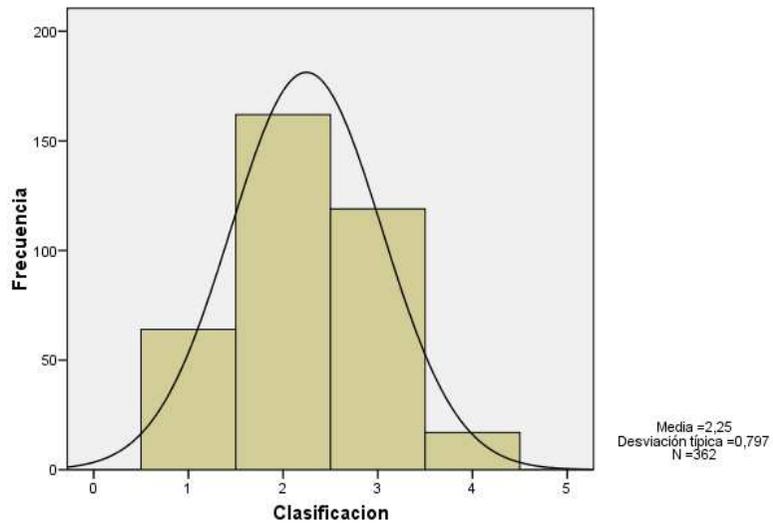
Clasificacion

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1	64	4,5	17,7	17,7
	2	162	11,4	44,8	62,4
	3	119	8,4	32,9	95,3
	4	17	1,2	4,7	100,0
	Total	362	25,4	100,0	
Perdidos	Sistema	1063	74,6		
Total		1425	100,0		

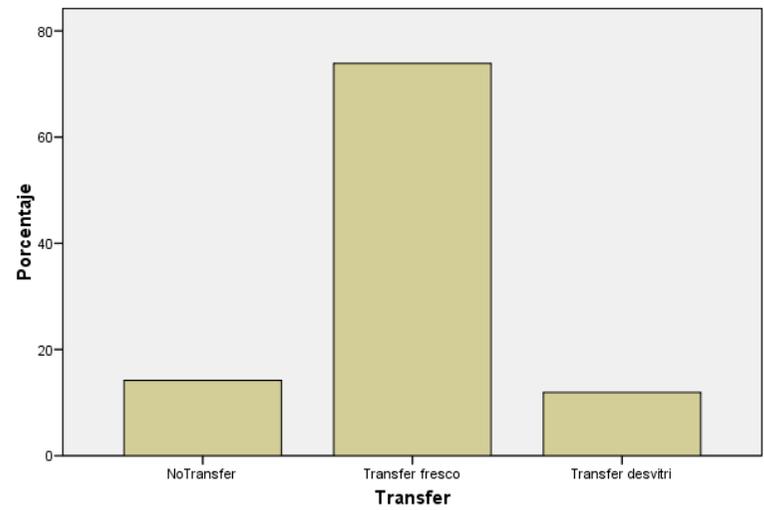
Transfer

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NoTransfer	63	4,4	14,2	14,2
	Transfer fresco	328	23,0	73,9	88,1
	Transfer desvitri	53	3,7	11,9	100,0
	Total	444	31,2	100,0	
Perdidos	Sistema	981	68,8		
Total		1425	100,0		

Histograma



Transfer



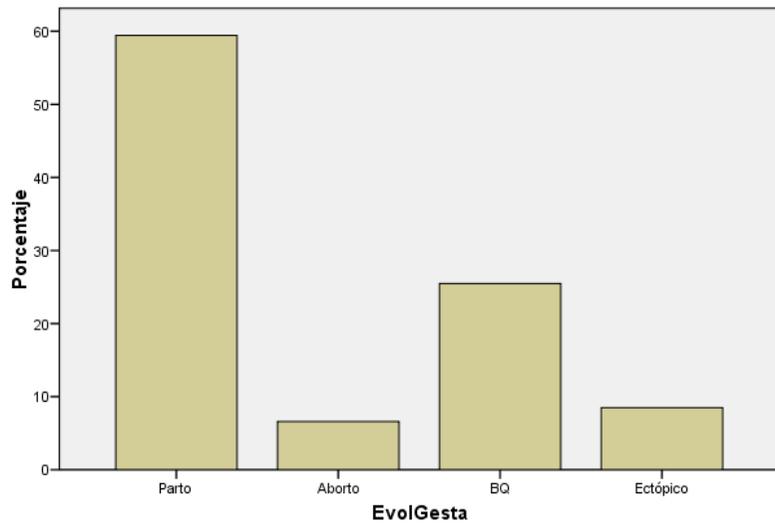
EvoIGesta

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Parto	63	4,4	59,4	59,4
	Aborto	7	,5	6,6	66,0
	BQ	27	1,9	25,5	91,5
	Ectópico	9	,6	8,5	100,0
	Total	106	7,4	100,0	
Perdidos	Sistema	1319	92,6		
Total		1425	100,0		

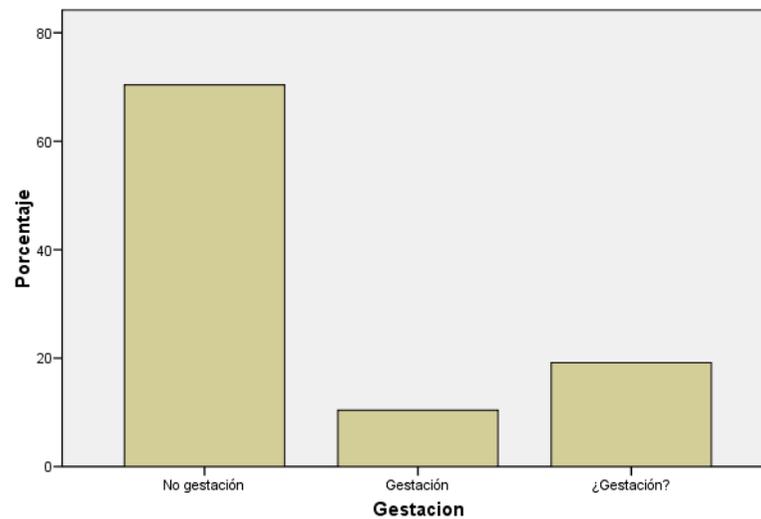
Gestacion

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No gestación	257	18,0	70,4	70,4
	Gestación	38	2,7	10,4	80,8
	¿Gestación?	70	4,9	19,2	100,0
	Total	365	25,6	100,0	
Perdidos	Sistema	1060	74,4		
Total		1425	100,0		

EvoIGesta



Gestacion



Anexo 6. XX.

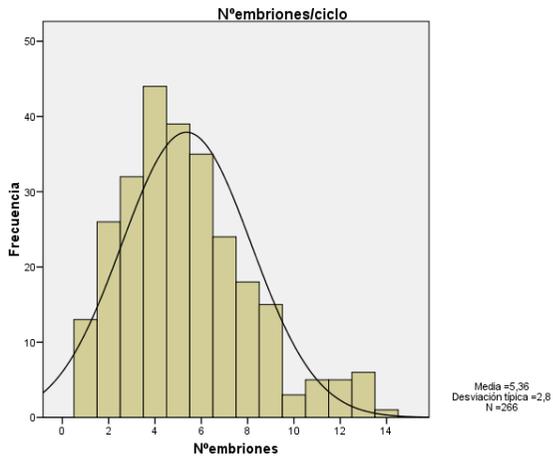
Anexo 6. XIX.

Nºembriones/ciclo

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1	13	4,9	4,9
	2	26	9,8	14,7
	3	32	12,0	26,7
	4	44	16,5	43,2
	5	39	14,7	57,9
	6	35	13,2	71,1
	7	24	9,0	80,1
	8	18	6,8	86,8
	9	15	5,6	92,5
	10	3	1,1	93,6
	11	5	1,9	95,5
	12	5	1,9	97,4
	13	6	2,3	99,6
	14	1	,4	100,0
Total	266	100,0	100,0	

Nºembriones

N	Válidos	266
	Perdidos	0
Media		5,36
Error típ. de la media		,172
Mediana		5,00
Moda		4
Desv. típ.		2,800
Mínimo		1
Máximo		14

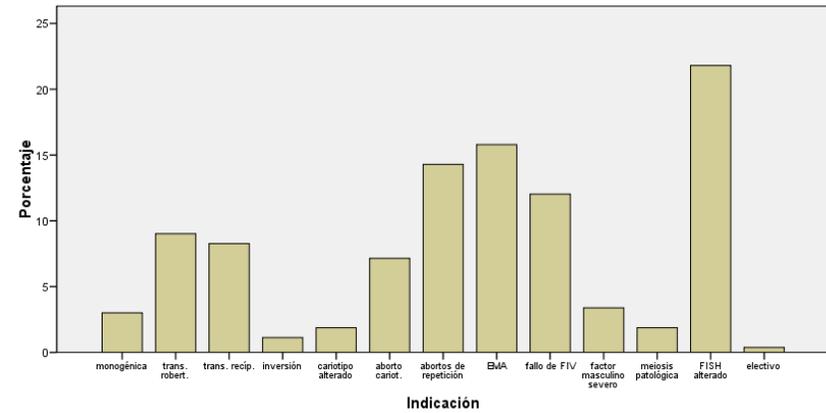


Anexo 6. XXII.

Indicación/ciclo

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	monogénica	8	3,0	3,0
	trans. robert.	24	9,0	12,0
	trans. recíp.	22	8,3	20,3
	inversión	3	1,1	21,4
	cariotipo alterado	5	1,9	23,3
	aborto cariot.	19	7,1	30,5
	abortos de repetición	38	14,3	44,7
	EMA	42	15,8	60,5
	fallo de FIV	32	12,0	72,6
	factor masculino severo	9	3,4	75,9
	meiosis patológica	5	1,9	77,8
	FISH alterado	58	21,8	99,6
	electivo	1	,4	100,0
Total	266	100,0	100,0	

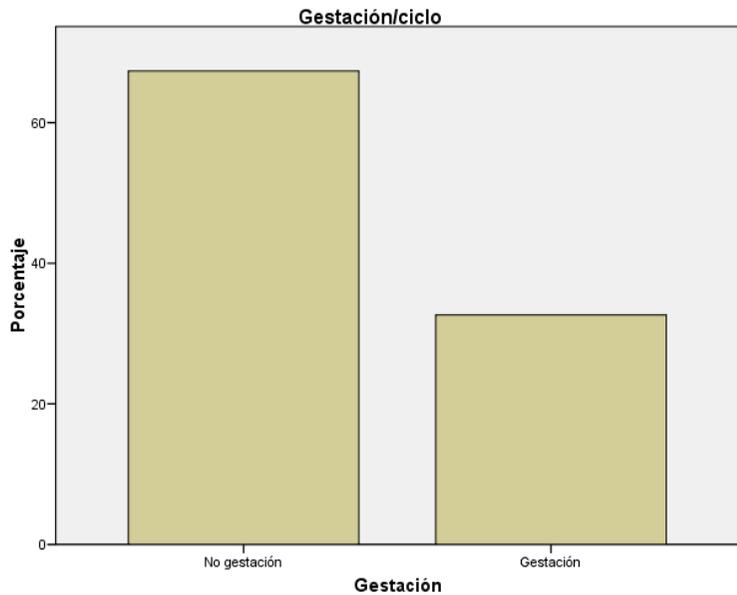
Indicación/ciclo



Anexo 6. XXI.

Gestación/ciclo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No gestación	130	48,9	67,4	67,4
	Gestación	63	23,7	32,6	100,0
	Total	193	72,6	100,0	
Perdidos	Sistema	73	27,4		
Total		266	100,0		

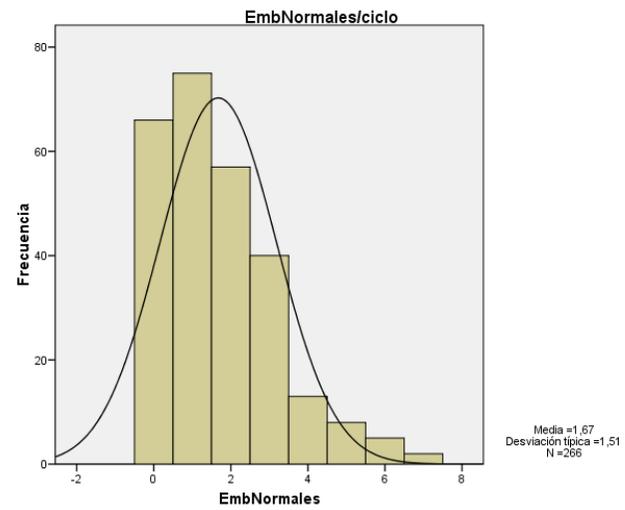


Anexo 6. XXIV.

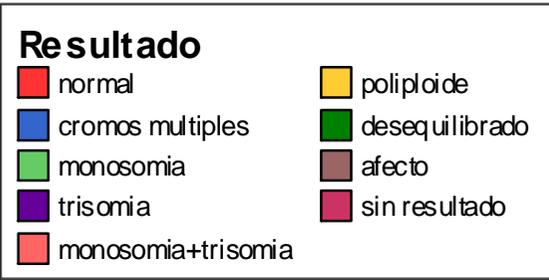
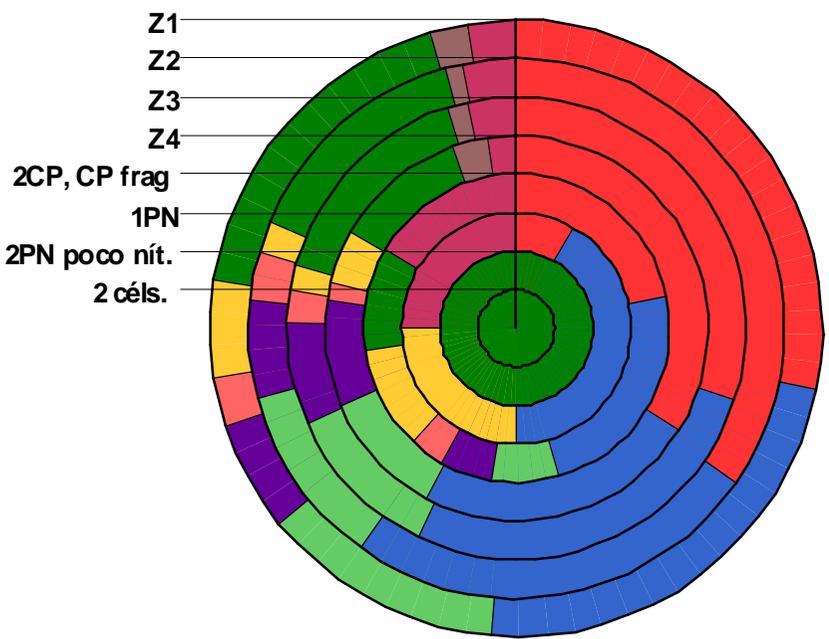
EmbNormales/ciclo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	66	24,8	24,8	24,8
	1	75	28,2	28,2	53,0
	2	57	21,4	21,4	74,4
	3	40	15,0	15,0	89,5
	4	13	4,9	4,9	94,4
	5	8	3,0	3,0	97,4
	6	5	1,9	1,9	99,2
	7	2	,8	,8	100,0
Total		266	100,0	100,0	

EmbNormales		
N	Válidos	266
	Perdidos	0
Media		1,67
Error típ. de la media		,093
Mediana		1,00
Moda		1
Desv. típ.		1,510
Mínimo		0
Máximo		7



Anexo 6. XXIII.



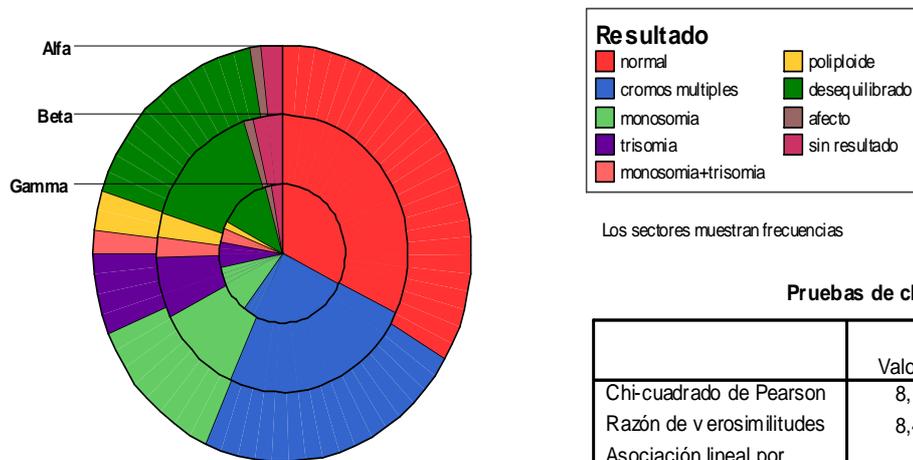
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	111,367 ^a	56	,000
Razón de verosimilitudes	80,684	56	,017
Asociación lineal por lineal	4,601	1	,032
N de casos válidos	1241		

a. 39 casillas (54,2%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

Anexo 6. XXVI. Análisis de contingencia Resultado*Ángulo



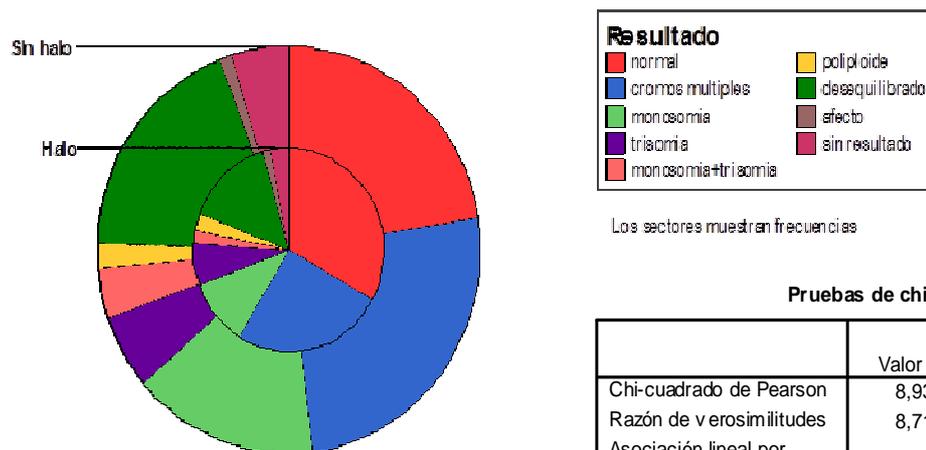
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,193 ^a	16	,943
Razón de verosimilitudes	8,426	16	,935
Asociación lineal por lineal	,592	1	,442
N de casos válidos	1159		

a. 2 casillas (7,4%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,90.

Anexo 6. XXVII. Análisis de contingencia Resultado*Halo



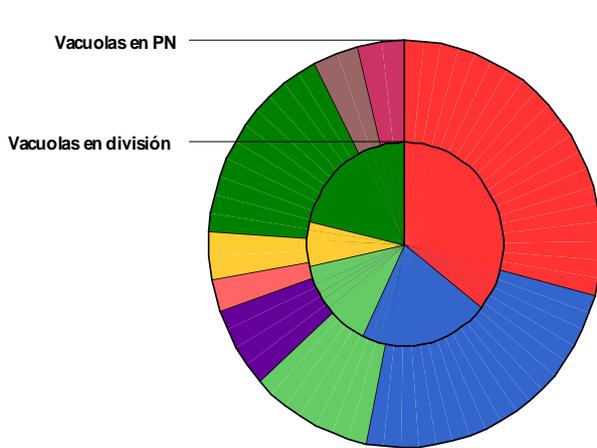
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,933 ^a	8	,348
Razón de verosimilitudes	8,719	8	,367
Asociación lineal por lineal	3,473	1	,062
N de casos válidos	1184		

a. 4 casillas (22,2%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,46.

Anexo 6. XXVIII. Análisis de contingencia Resultado*Vac



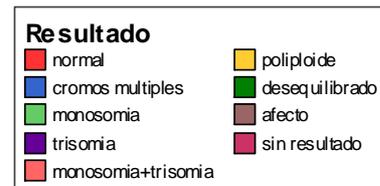
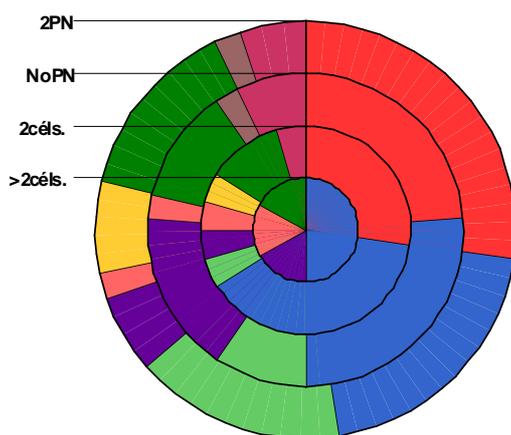
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,182 ^a	8	,922
Razón de verosimilitudes	5,046	8	,753
Asociación lineal por lineal	,207	1	,649
N de casos válidos	93		

a. 14 casillas (77,8%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,30.

Anexo 6. XXIX. Análisis de contingencia Resultado*Horas27

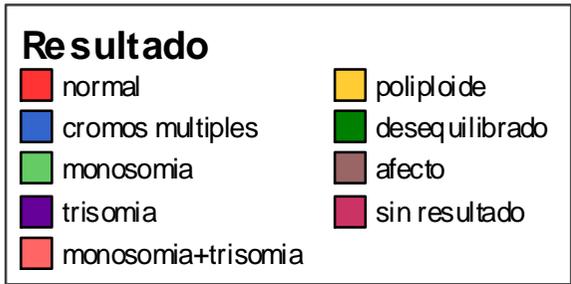
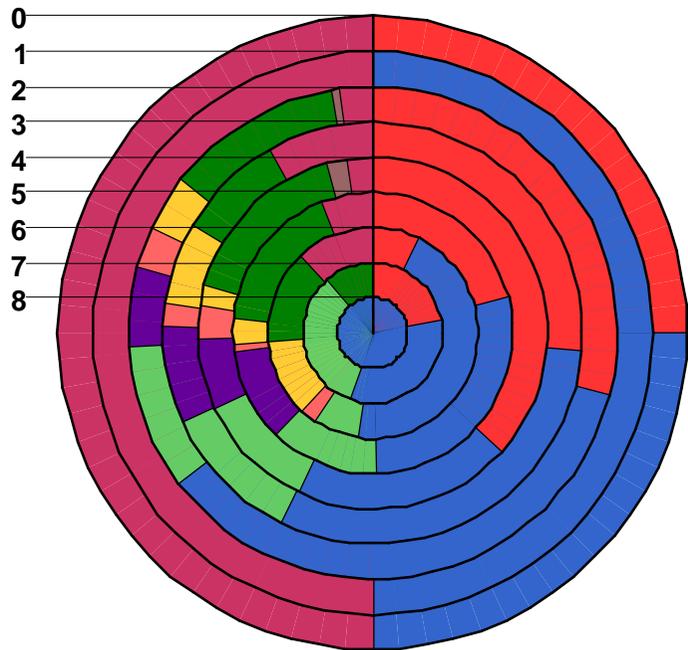


Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	26,473 ^a	24	,330
Razón de verosimilitudes	29,394	24	,206
Asociación lineal por lineal	,584	1	,445
N de casos válidos	191		

a. 23 casillas (63,9%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,09.

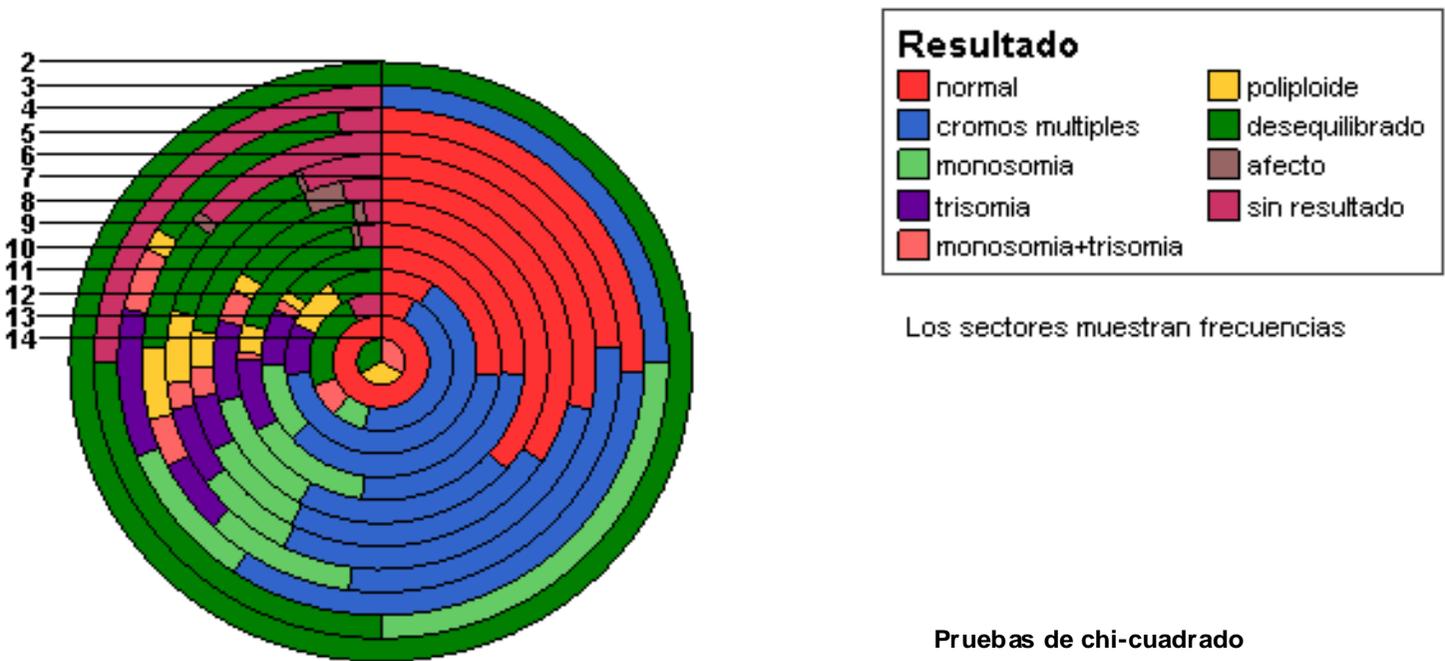


Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	151,504 ^a	64	,000
Razón de verosimilitudes	131,313	64	,000
Asociación lineal por lineal	3,341	1	,068
N de casos válidos	1239		

a. 51 casillas (63,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

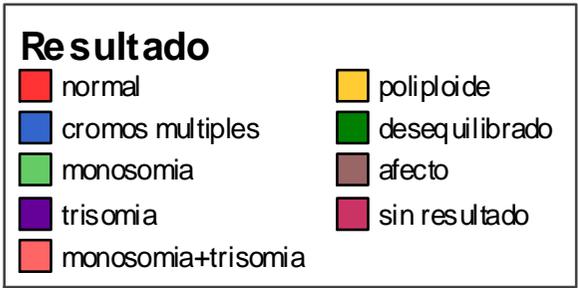
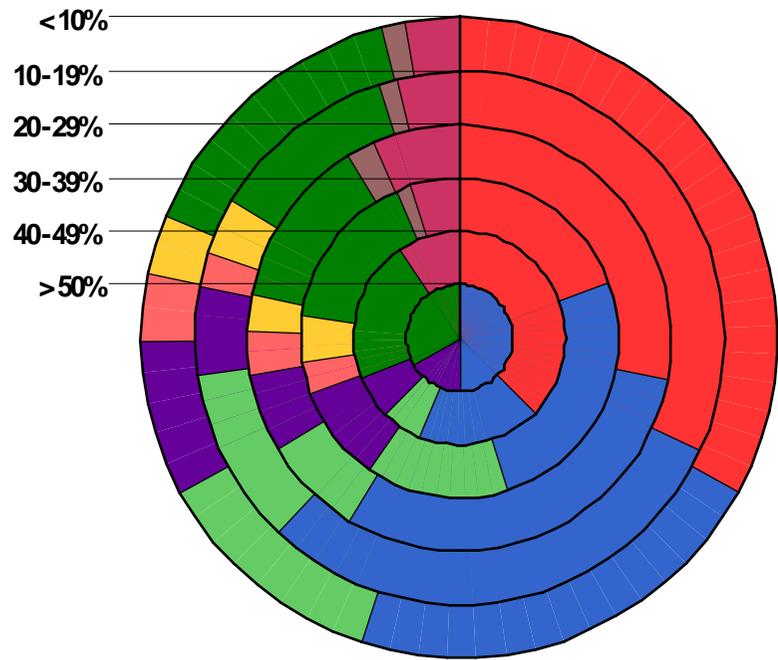


Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	159,777 ^a	96	,000
Razón de verosimilitudes	139,083	96	,003
Asociación lineal por lineal	4,156	1	,041
N de casos válidos	1411		

a. 73 casillas (62,4%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

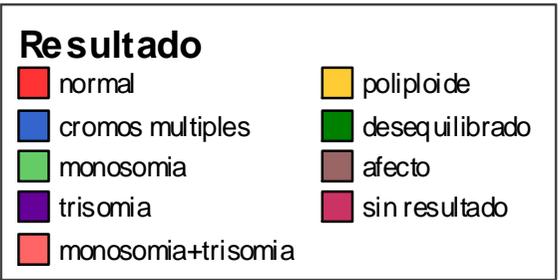


Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	46,324 ^a	40	,228
Razón de verosimilitudes	49,976	40	,134
Asociación lineal por lineal	2,851	1	,091
N de casos válidos	1412		

a. 22 casillas (40,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,08.

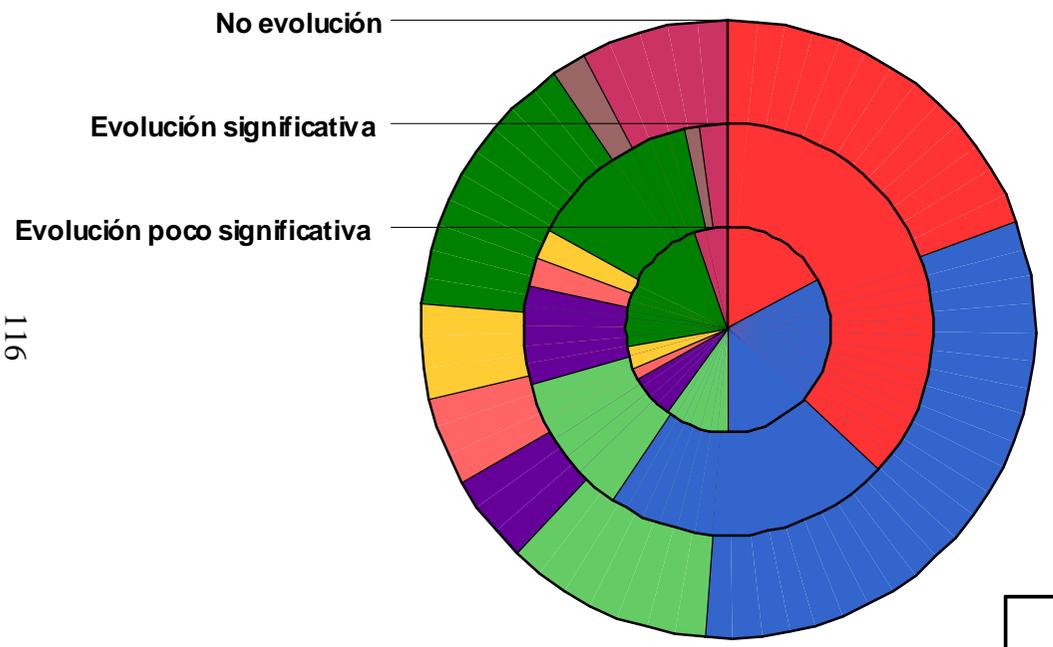


Los sectores muestran frecuencias

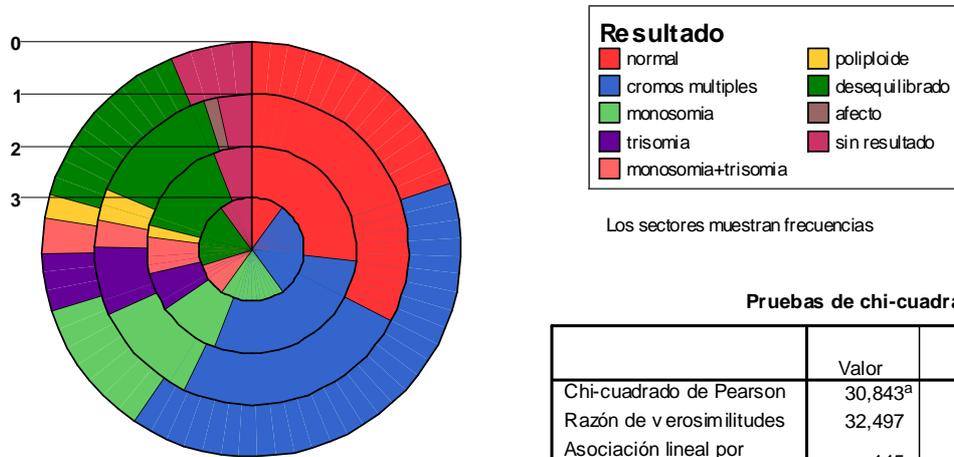
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	80,185 ^a	16	,000
Razón de verosimilitudes	79,469	16	,000
Asociación lineal por lineal	11,010	1	,001
N de casos válidos	1395		

a. 6 casillas (22,2%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,75.



Anexo 6. XXXIV. Análisis de contingencia Resultado*Núcleos2

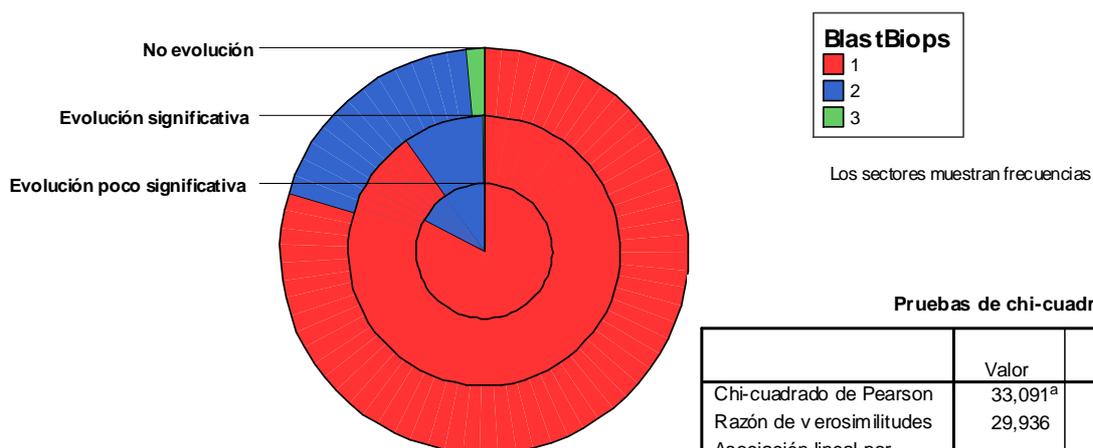


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	30,843 ^a	24	,158
Razón de verosimilitudes	32,497	24	,115
Asociación lineal por lineal	,145	1	,704
N de casos válidos	1425		

a. 18 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,13.

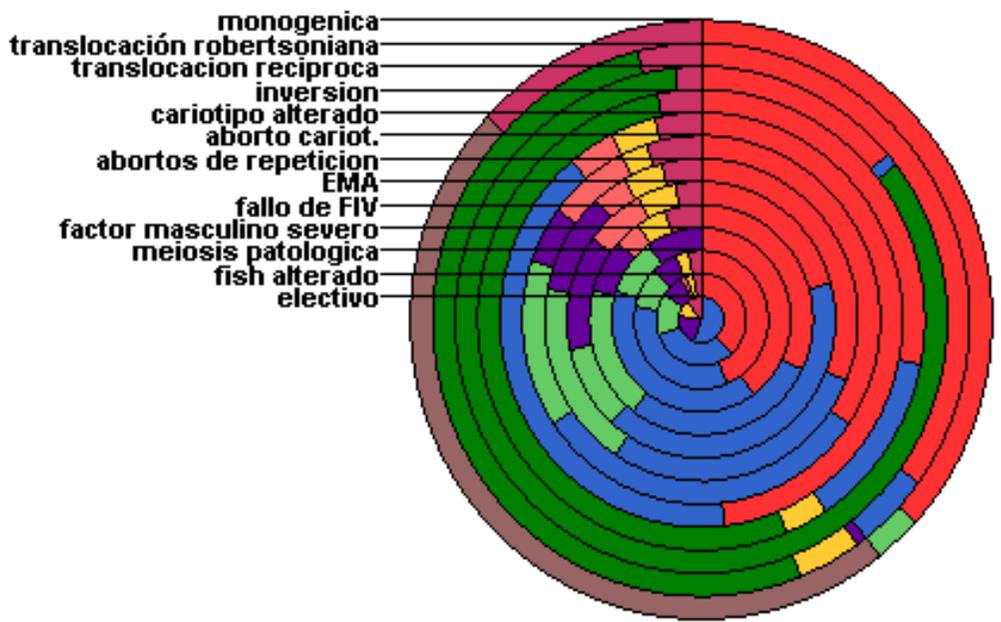
Anexo 6. XXXV. Análisis de contingencia Evol4*BlastBiops



Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	33,091 ^a	4	,000
Razón de verosimilitudes	29,936	4	,000
Asociación lineal por lineal	17,704	1	,000
N de casos válidos	1382		

a. 3 casillas (33,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,25.

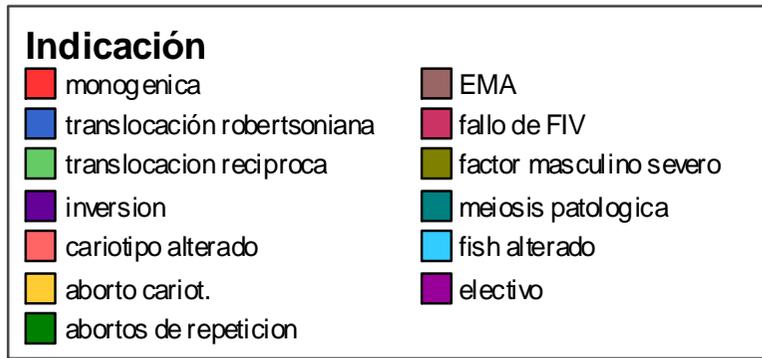
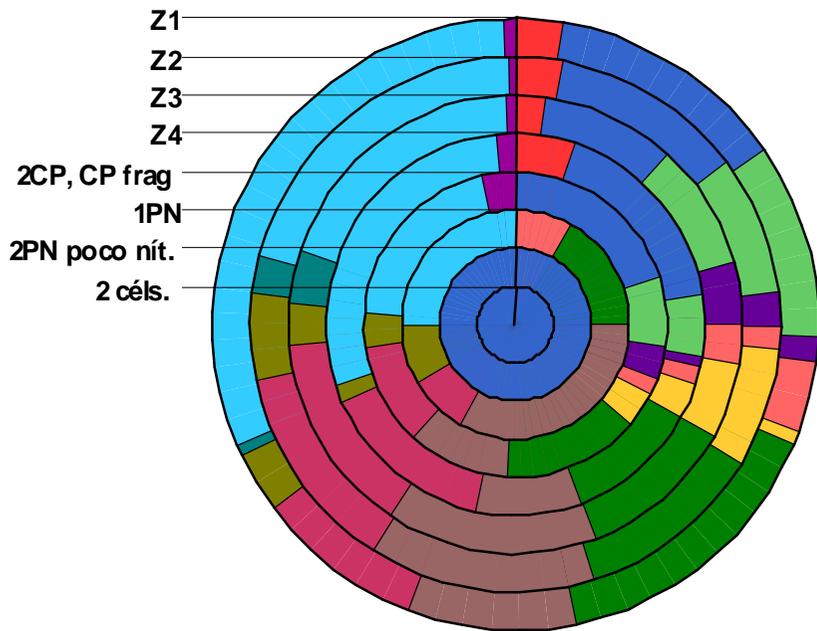


Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1732,410 ^a	96	,000
Razón de verosimilitudes	1162,521	96	,000
Asociación lineal por lineal	254,290	1	,000
N de casos válidos	1425		

a. 56 casillas (47,9%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,11.



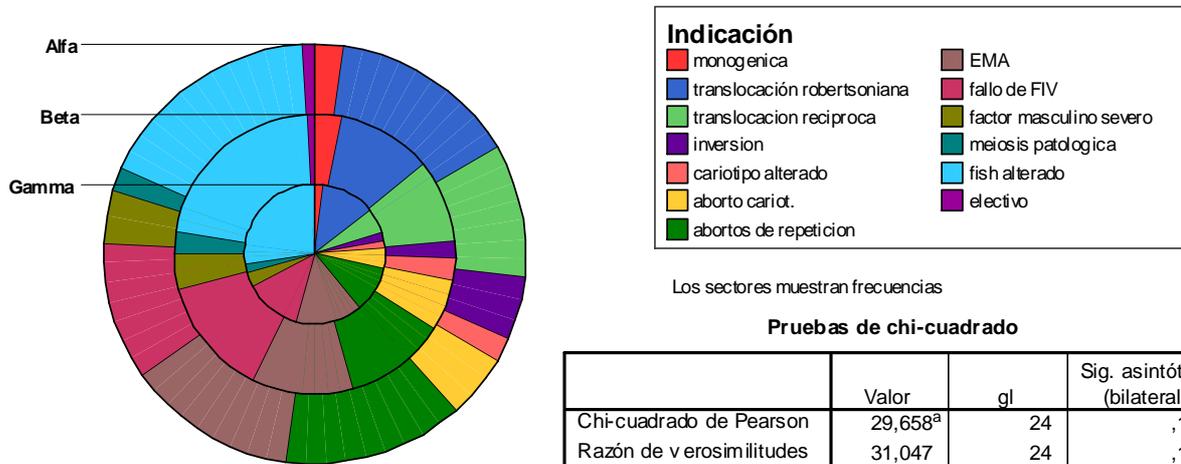
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	108,927 ^a	84	,035
Razón de verosimilitudes	109,531	84	,032
Asociación lineal por lineal	,225	1	,635
N de casos válidos	1241		

a. 59 casillas (56,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

Anexo 6. XXXVIII. Análisis de contingencia Indicación*Ángulo



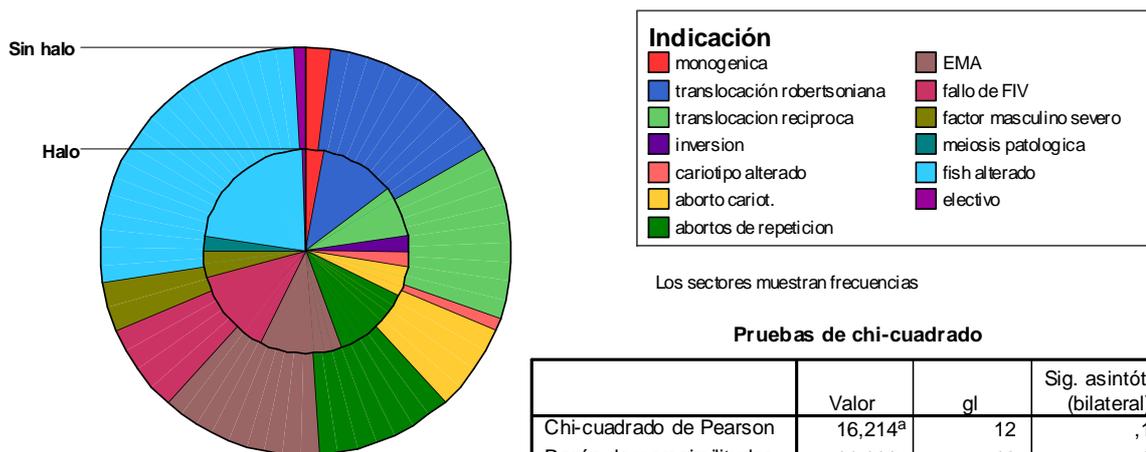
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	29,658 ^a	24	,196
Razón de verosimilitudes	31,047	24	,152
Asociación lineal por lineal	8,262	1	,004
N de casos válidos	1159		

a. 4 casillas (10,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,35.

Anexo 6.XXXIX. Análisis de contingencia Indicación*Halo



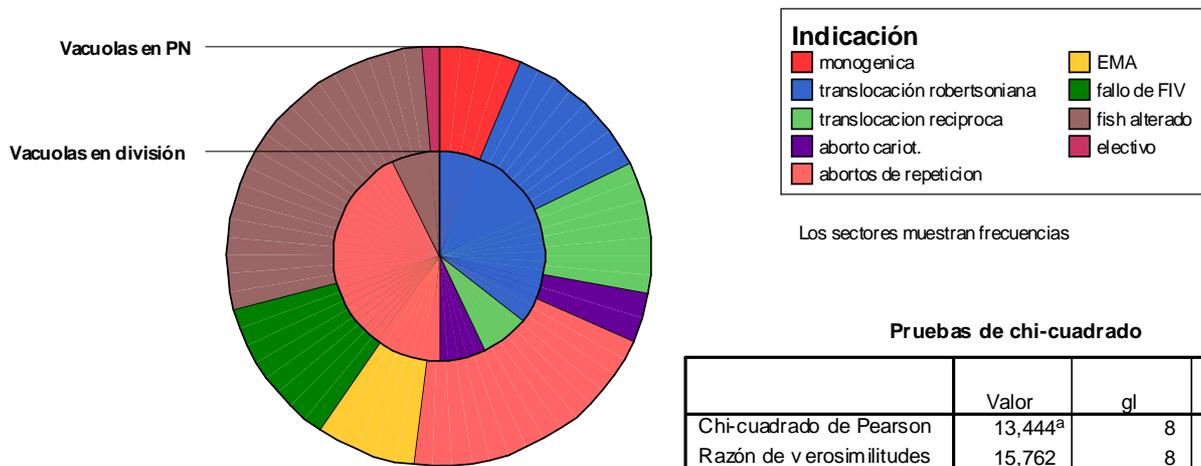
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	16,214 ^a	12	,182
Razón de verosimilitudes	21,082	12	,049
Asociación lineal por lineal	,390	1	,532
N de casos válidos	1184		

a. 6 casillas (23,1%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,60.

Anexo 6. XL. Análisis de contingencia Indicación*Vac.

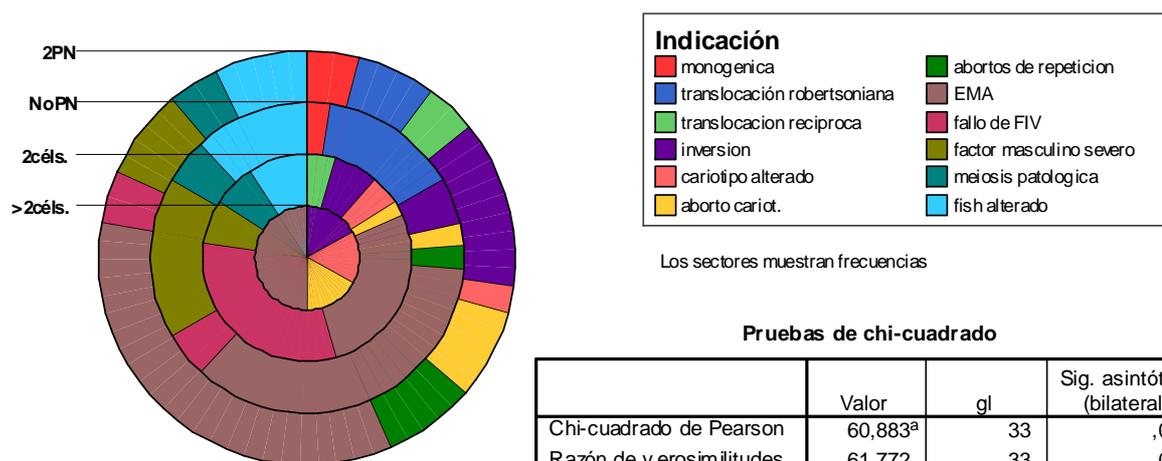


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13,444 ^a	8	,097
Razón de verosimilitudes	15,762	8	,046
Asociación lineal por lineal	3,855	1	,050
N de casos válidos	93		

a. 12 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,15.

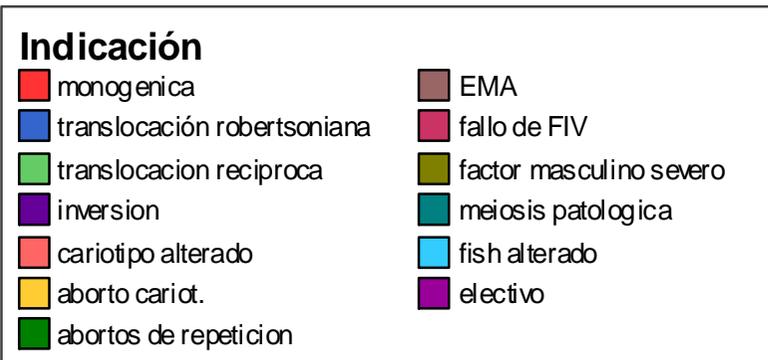
Anexo 6. XLI. Análisis de contingencia Indicación*Horas27



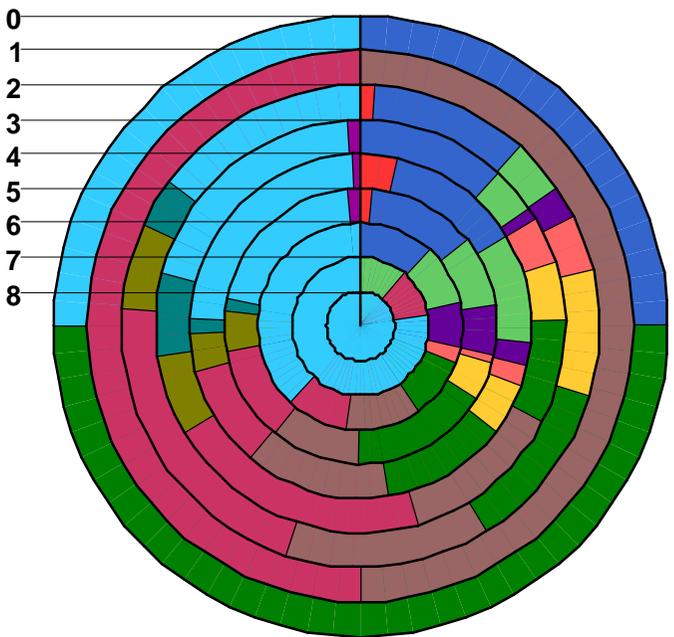
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	60,883 ^a	33	,002
Razón de verosimilitudes	61,772	33	,002
Asociación lineal por lineal	4,520	1	,033
N de casos válidos	191		

a. 39 casillas (81,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,16.



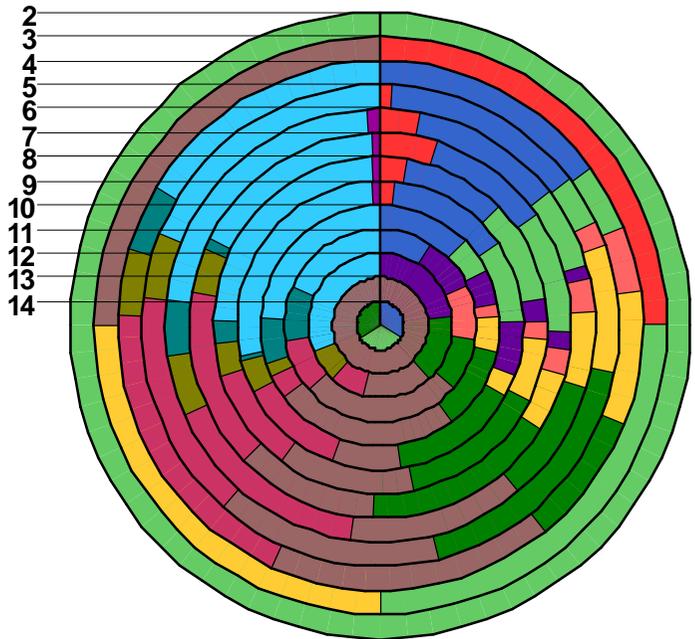
Los sectores muestran frecuencias



Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	136,485 ^a	96	,004
Razón de verosimilitudes	138,411	96	,003
Asociación lineal por lineal	,004	1	,952
N de casos válidos	1239		

a. 76 casillas (65,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.



Indicación

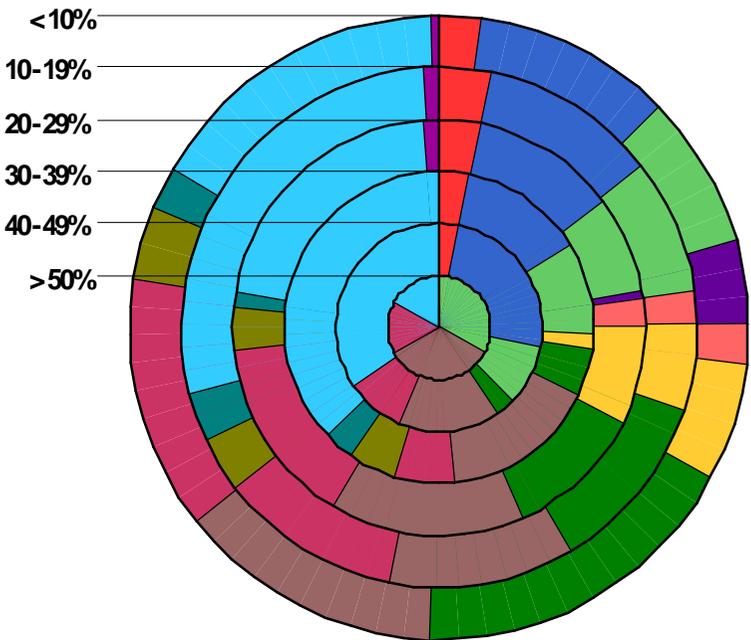
- monogenica
- translocación robertsoniana
- translocación recíproca
- inversión
- cariotipo alterado
- aborto cariot.
- abortos de repetición
- EMA
- fallo de FIV
- factor masculino severo
- meiosis patológica
- fish alterado
- electivo

Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	187,865 ^a	144	,008
Razón de verosimilitudes	175,316	144	,039
Asociación lineal por lineal	,094	1	,760
N de casos válidos	1411		

a. 110 casillas (65,1%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.



Indicación

- monogenica
- translocación robertsoniana
- translocacion reciproca
- inversion
- cariotipo alterado
- aborto cariot.
- abortos de repeticion
- EMA
- fallo de FIV
- factor masculino severo
- meiosis patologica
- fish alterado
- electivo

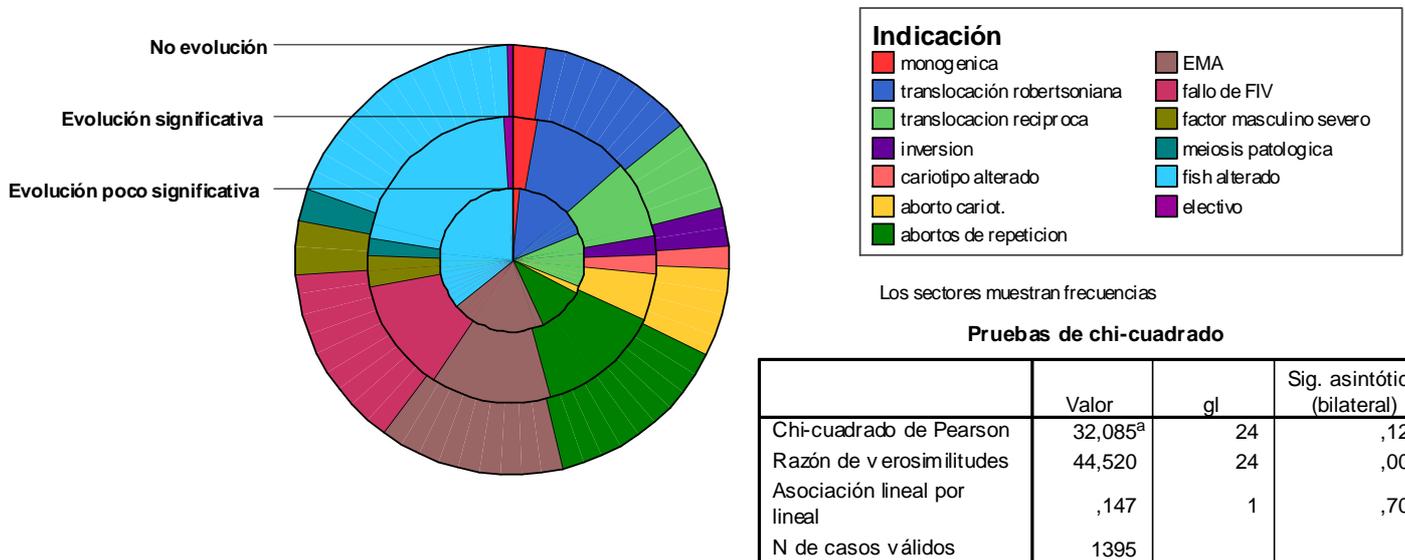
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	106,558 ^a	6,0	,000
Razón de verosimilitudes	122,818	6,0	,000
Asociación lineal por lineal	3,272	1	,070
N de casos válidos	1412		

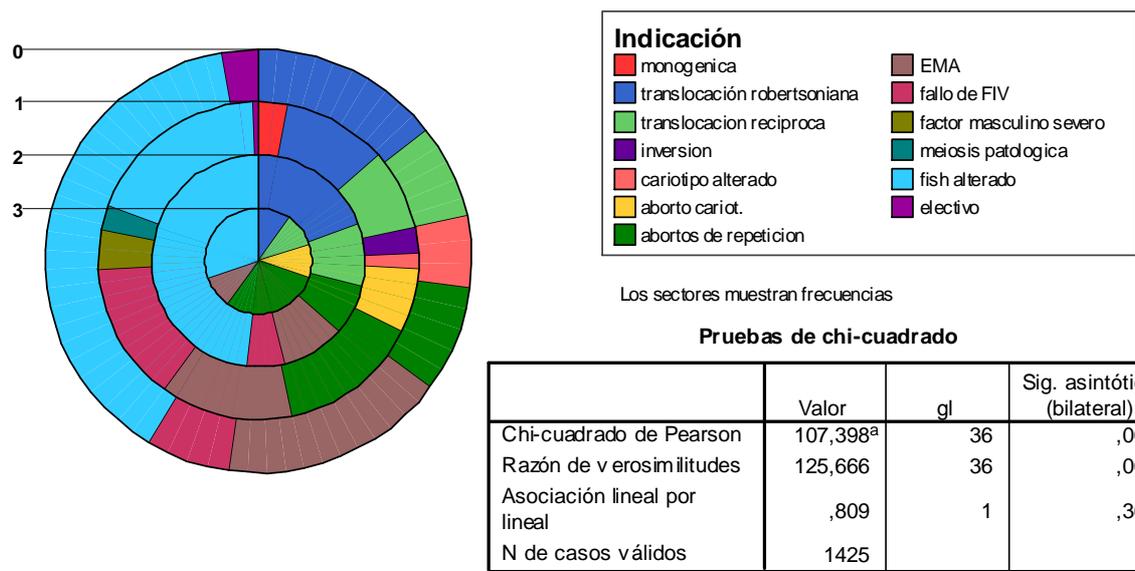
a. 39 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,04.

Anexo 6. XLV. Análisis de contingencia Indicación*Evol4



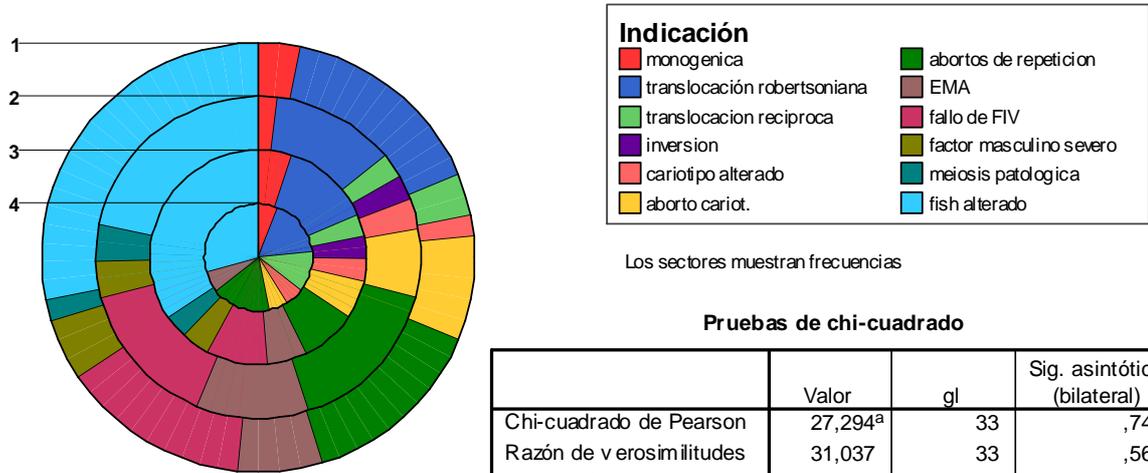
a. 9 casillas (23,1%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,37.

Anexo 6. XLVI. Análisis de contingencia Indicación*Núcleos2



a. 27 casillas (51,9%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,06.

Anexo 6. XLVII. Análisis de contingencia Indicación*Clasificación

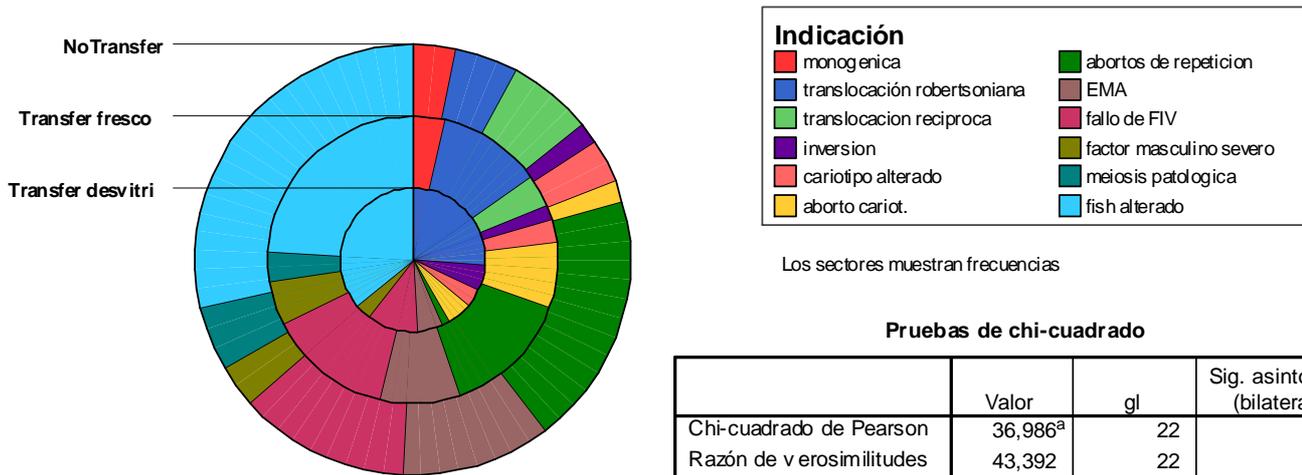


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	27,294 ^a	33	,747
Razón de verosimilitudes	31,037	33	,565
Asociación lineal por lineal	,118	1	,731
N de casos válidos	362		

a. 28 casillas (58,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,38.

Anexo 6. XLVIII. Análisis de contingencia Indicación*Transfer



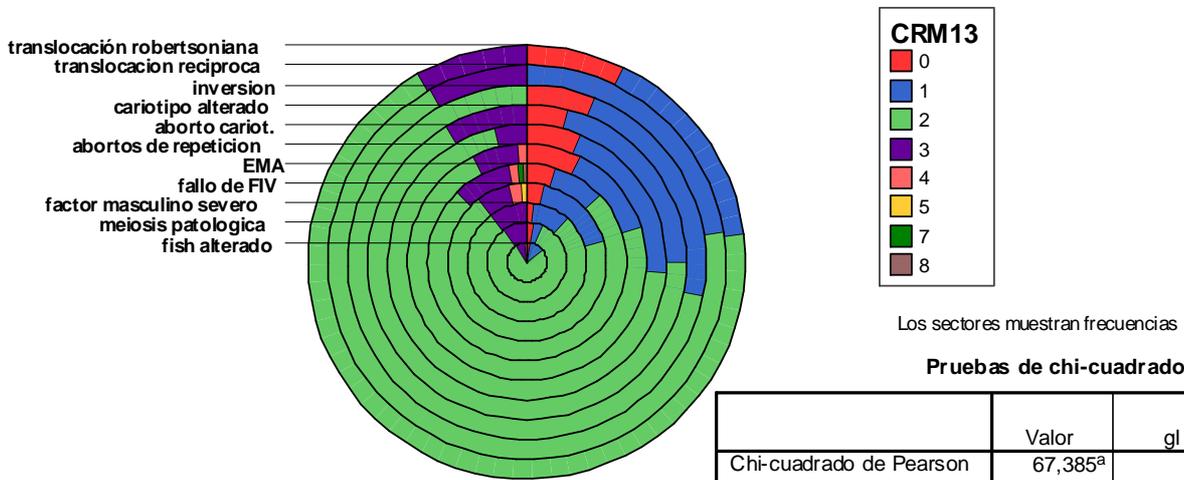
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	36,986 ^a	22	,024
Razón de verosimilitudes	43,392	22	,004
Asociación lineal por lineal	1,210	1	,271
N de casos válidos	444		

a. 15 casillas (41,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,07.

Anexo 6. XLIX.

a) Análisis de contingencia Indicación*Cromosoma 13



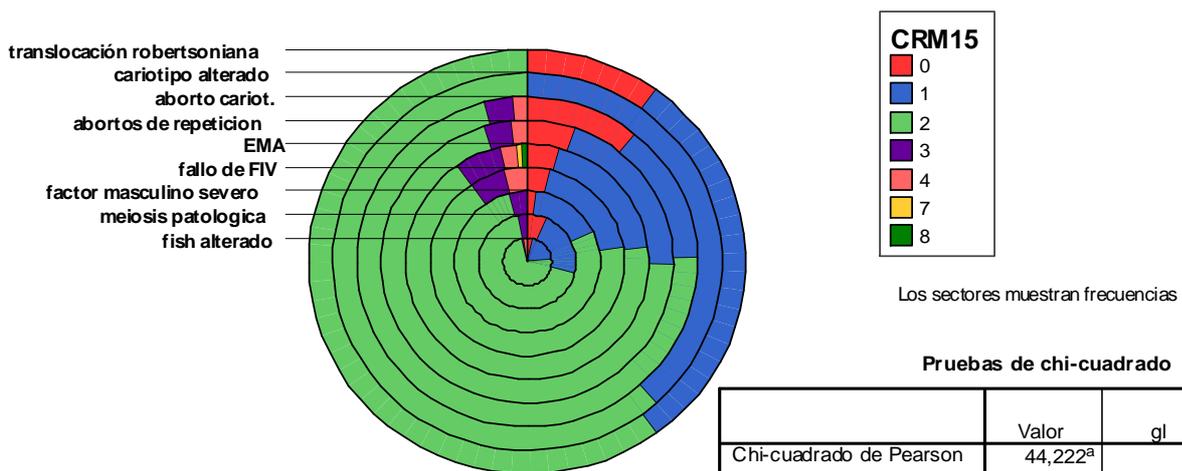
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	67,385 ^a	70	,566
Razón de verosimilitudes	68,148	70	,540
Asociación lineal por lineal	7,835	1	,005
N de casos válidos	1135		

a. 58 casillas (65,9%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,02.

b) Análisis de contingencia Indicación*Cromosoma 15



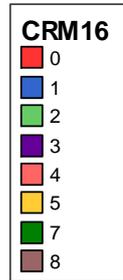
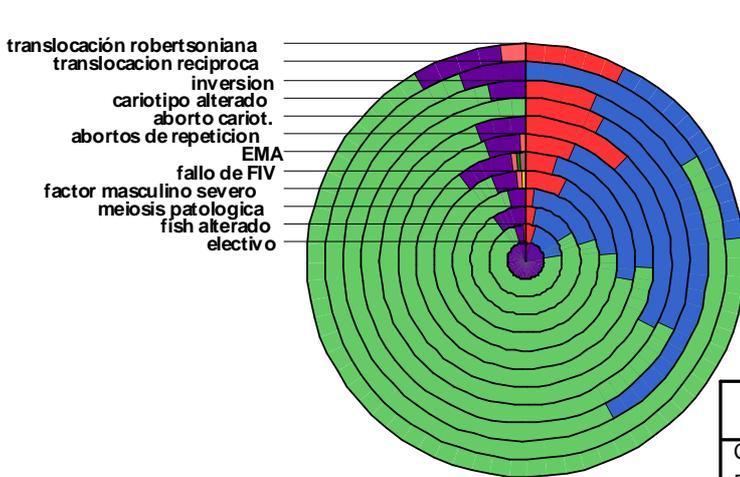
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	44,222 ^a	48	,628
Razón de verosimilitudes	41,931	48	,719
Asociación lineal por lineal	1,104	1	,293
N de casos válidos	913		

a. 38 casillas (60,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

c) Análisis de contingencia Indicación*Cromosoma 16



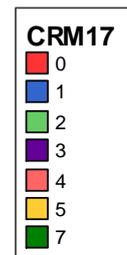
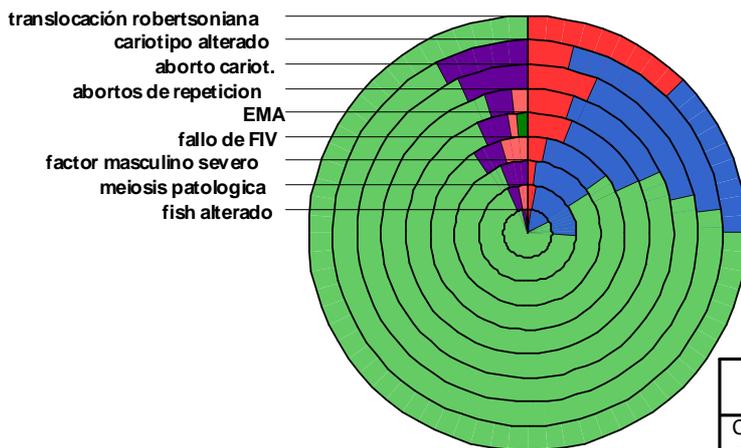
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	87,532 ^a	77	,193
Razón de verosimilitudes	60,621	77	,915
Asociación lineal por lineal	,808	1	,369
N de casos válidos	1078		

a. 65 casillas (67,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,00.

d) Análisis de contingencia Indicación*Cromosoma 17



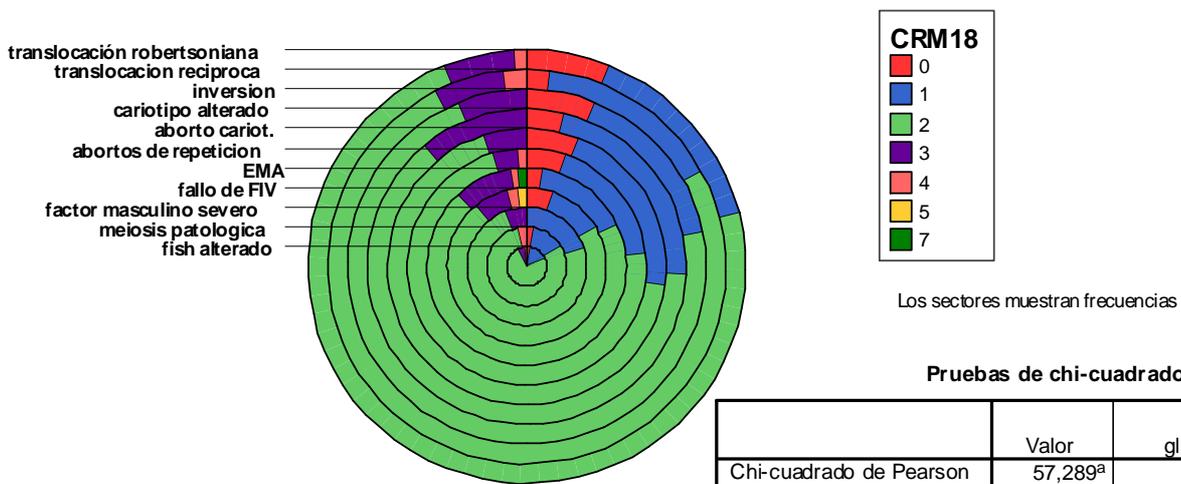
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	42,170 ^a	48	,710
Razón de verosimilitudes	38,950	48	,821
Asociación lineal por lineal	,465	1	,495
N de casos válidos	932		

a. 40 casillas (63,5%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

e) Análisis de contingencia Indicación*Cromosoma 18

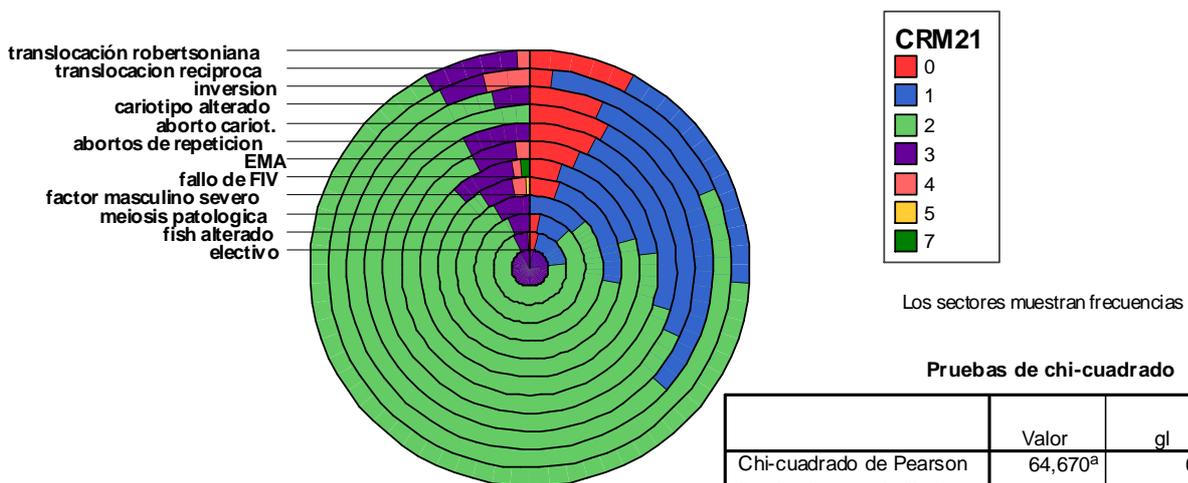


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	57,289 ^a	60	,575
Razón de verosimilitudes	53,227	60	,720
Asociación lineal por lineal	2,215	1	,137
N de casos válidos	1136		

a. 48 casillas (62,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,05.

f) Análisis de contingencia Indicación*Cromosoma 21

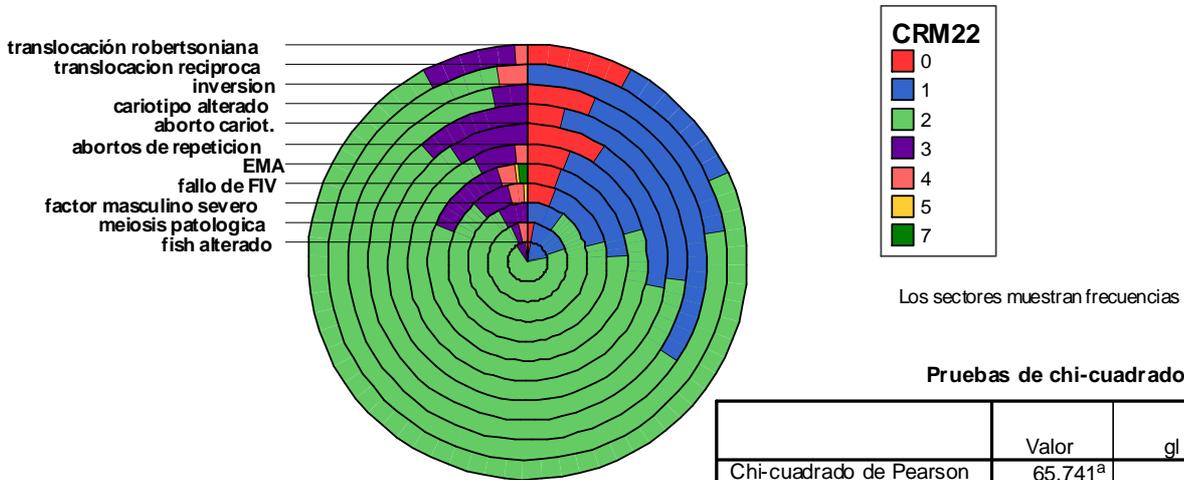


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	64,670 ^a	66	,523
Razón de verosimilitudes	55,137	66	,827
Asociación lineal por lineal	1,611	1	,204
N de casos válidos	1138		

a. 52 casillas (61,9%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,00.

g) Análisis de contingencia Indicación*Cromosoma 22

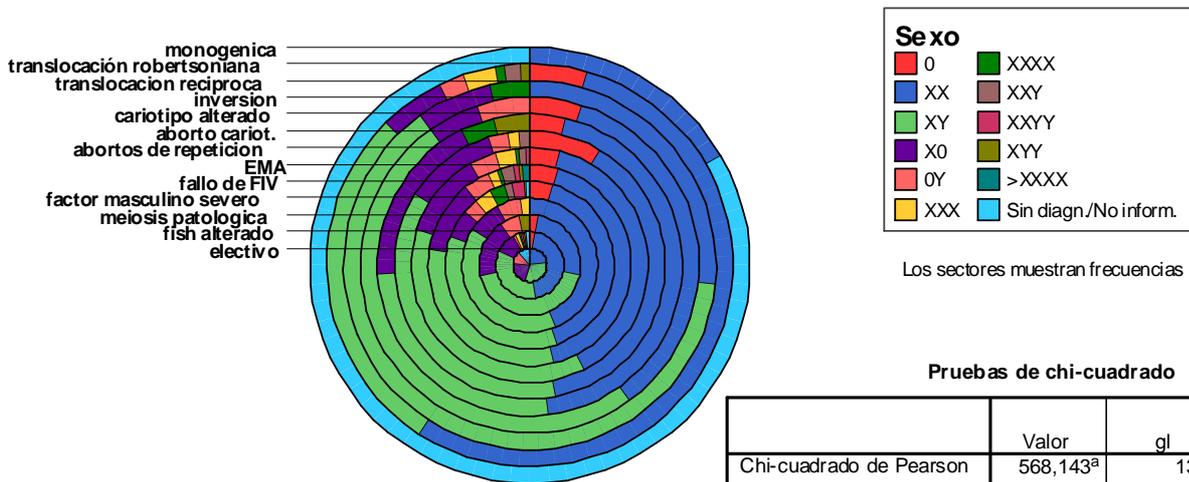


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	65,741 ^a	60	,285
Razón de verosimilitudes	69,803	60	,181
Asociación lineal por lineal	1,669	1	,196
N de casos válidos	1104		

a. 45 casillas (58,4%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,05.

h) Análisis de contingencia Indicación*Cromos. sexuales

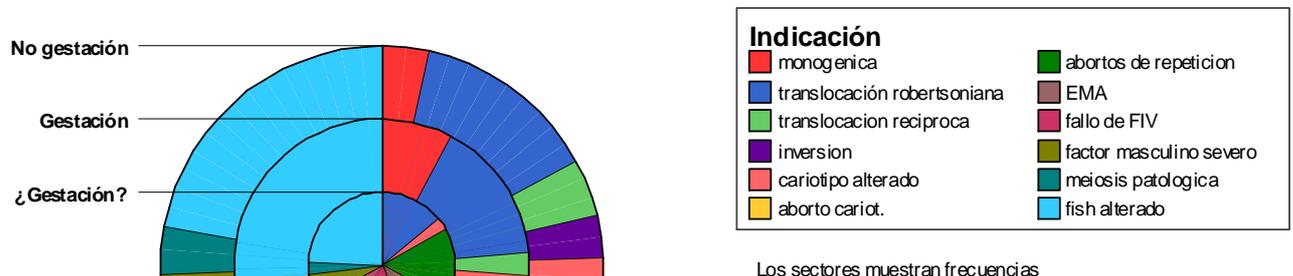


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	568,143 ^a	132	,000
Razón de verosimilitudes	173,514	132	,009
Asociación lineal por lineal	,945	1	,331
N de casos válidos	1279		

a. 118 casillas (75,6%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

Anexo 6. L. Análisis de contingencia Indicación*Gestación



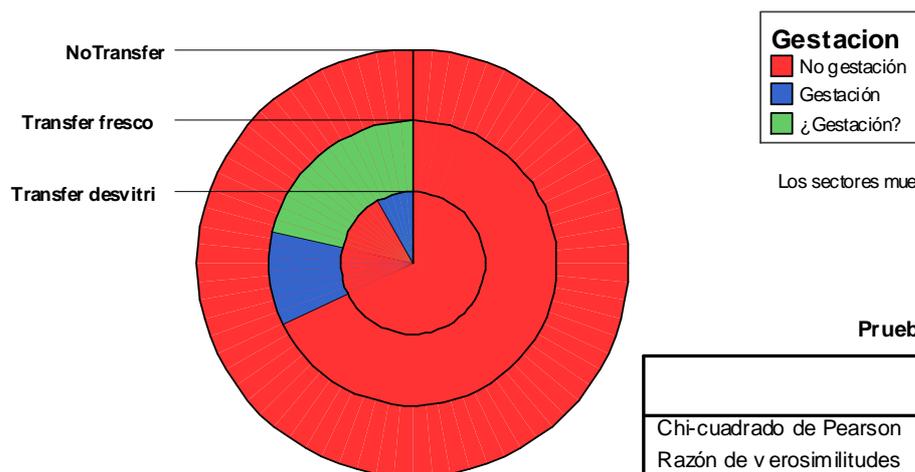
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	35,215 ^a	22	,037
Razón de verosimilitudes	47,237	22	,001
Asociación lineal por lineal	3,972	1	,046
N de casos válidos	365		

a. 16 casillas (44,4%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,83.

Anexo 6. LI. Análisis de contingencia Transfer*Gestación



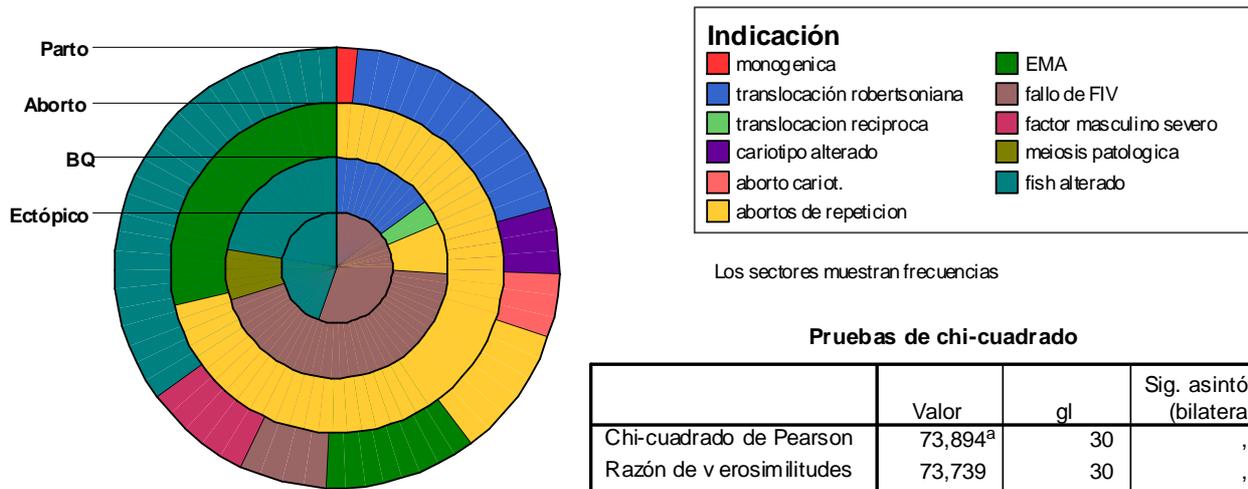
Los sectores muestran frecuencias

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,298 ^a	4	,023
Razón de verosimilitudes	18,449	4	,001
Asociación lineal por lineal	9,684	1	,002
N de casos válidos	365		

a. 4 casillas (44,4%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,10.

Anexo 6. LII. Análisis de contingencia Indicación*EvolGesta

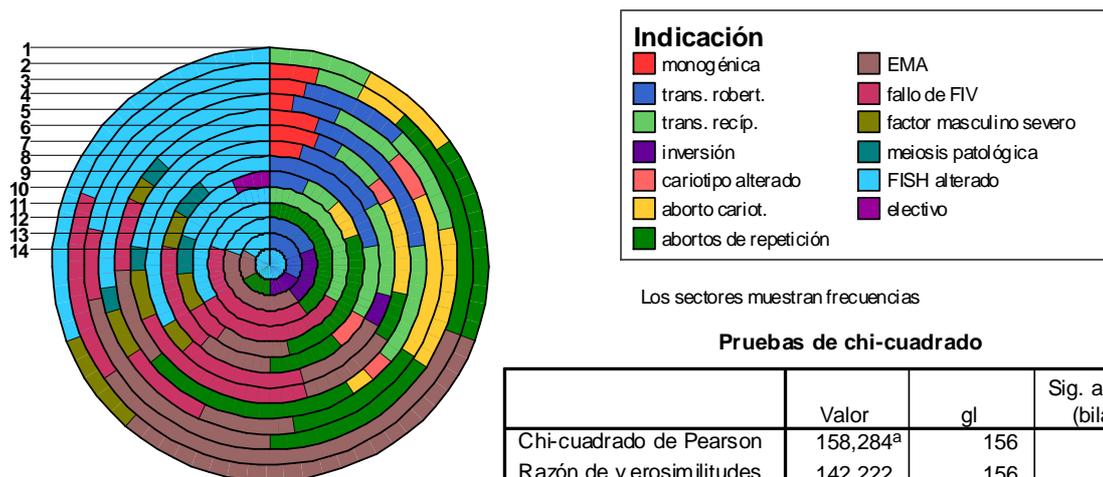


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	73,894 ^a	30	,000
Razón de verosimilitudes	73,739	30	,000
Asociación lineal por lineal	2,111	1	,146
N de casos válidos	106		

a. 37 casillas (84,1%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,07.

Anexo 6. LIII. Análisis de contingencia Ciclo_Indicación*Nºembriones

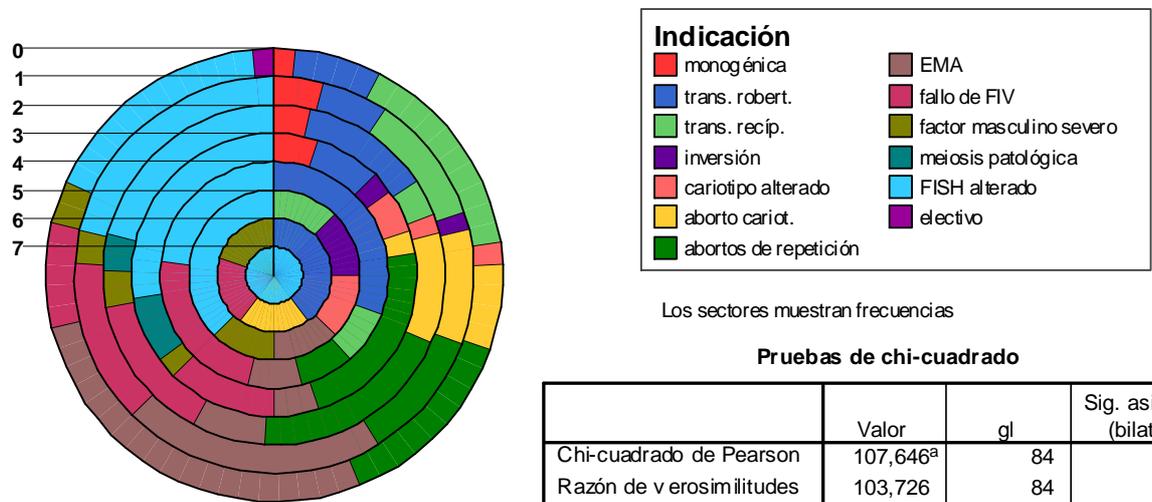


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	158,284 ^a	156	,434
Razón de verosimilitudes	142,222	156	,778
Asociación lineal por lineal	,595	1	,440
N de casos válidos	266		

a. 168 casillas (92,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,00.

Anexo 6. LIV. Análisis de contingencia Ciclo_Indicación*EmbNormales

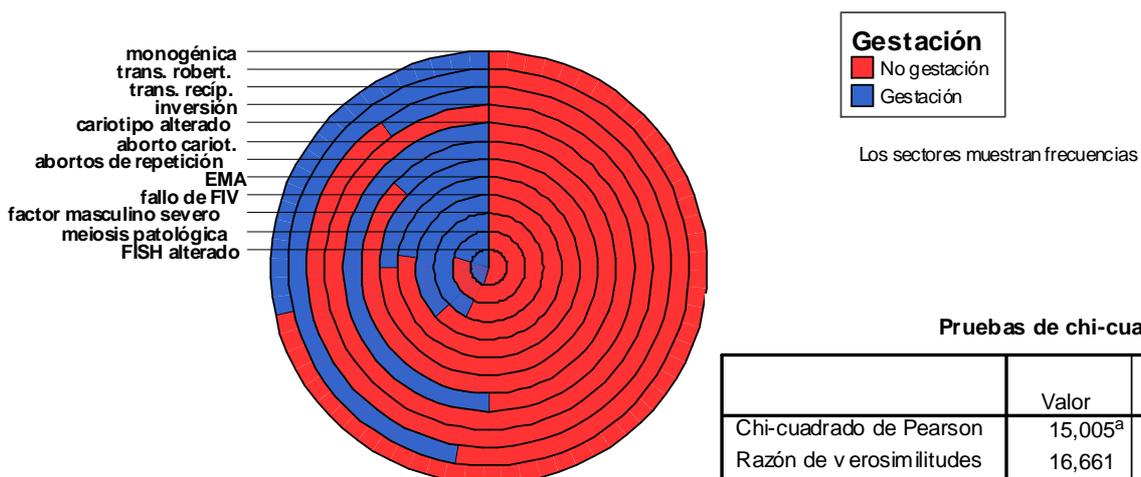


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	107,646 ^a	84	,042
Razón de verosimilitudes	103,726	84	,071
Asociación lineal por lineal	,550	1	,458
N de casos válidos	266		

a. 83 casillas (79,8%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,01.

Anexo 6. LV. Análisis de contingencia Ciclo_Indicación*Gestación

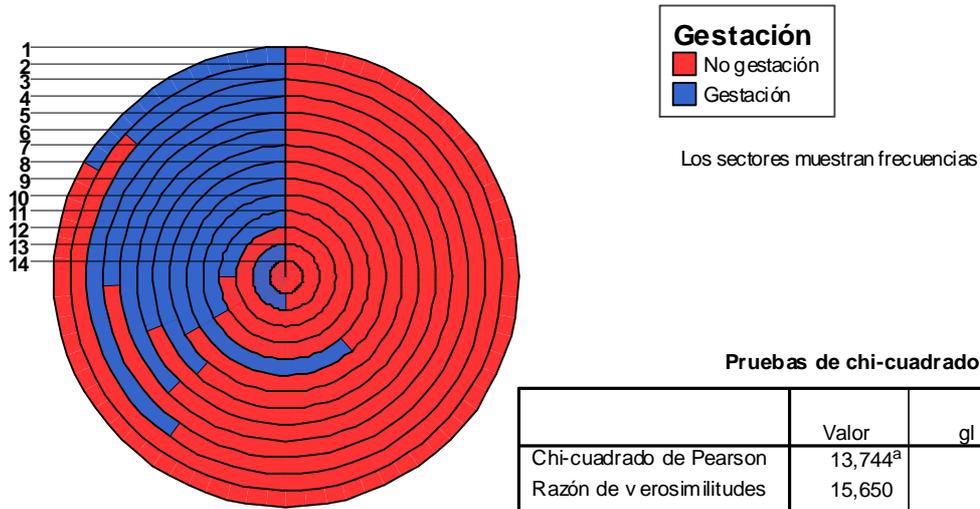


Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	15,005 ^a	11	,182
Razón de verosimilitudes	16,661	11	,118
Asociación lineal por lineal	1,910	1	,167
N de casos válidos	193		

a. 12 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,98.

Anexo 6. LVI. Análisis de contingencia Ciclo_NºEmb.*Gestación



Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13,744 ^a	13	,392
Razón de verosimilitudes	15,650	13	,269
Asociación lineal por lineal	1,262	1	,261
N de casos válidos	193		

a. 15 casillas (53,6%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,33.

Anexo 6. LVII. Análisis de contingencia Ciclo_Emb.Normales*Gestación



Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	29,974 ^a	6	,000
Razón de verosimilitudes	30,734	6	,000
Asociación lineal por lineal	20,462	1	,000
N de casos válidos	193		

a. 7 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,65.

Anexo 6. LVIII.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Varianza entre componentes
						Límite inferior	Límite superior			
Cels2	normal	394	3,74	,868	,044	3,65	3,82	0	7	
	cromos multiples	315	3,73	1,211	,068	3,59	3,86	0	8	
	monosomía	135	3,88	1,015	,087	3,71	4,05	2	7	
	trisomía	81	3,83	,863	,096	3,64	4,02	2	5	
	monosomía+trisomía	31	3,71	,902	,162	3,38	4,04	2	6	
	poliploide	38	3,82	1,249	,203	3,41	4,23	2	6	
	desequilibrado	183	3,92	,913	,068	3,78	4,05	2	7	
	afecto	15	3,87	,516	,133	3,58	4,15	2	4	
	sin resultado	47	3,79	1,413	,206	3,37	4,20	0	6	
	Total	1239	3,79	1,021	,029	3,73	3,85	0	8	
	Modelo	Efectos fijos			1,022	,029	3,73	3,85		
	Efectos aleatorios				,029 ^a	3,72 ^a	3,86 ^a			-,002
Cels3	normal	444	7,35	1,373	,065	7,23	7,48	4	13	
	cromos multiples	362	7,28	1,750	,092	7,10	7,47	3	12	
	monosomía	155	7,43	1,486	,119	7,19	7,66	3	12	
	trisomía	98	7,39	1,537	,155	7,08	7,70	4	11	
	monosomía+trisomía	40	7,35	1,942	,307	6,73	7,97	4	14	
	poliploide	44	7,14	1,825	,275	6,58	7,69	4	14	
	desequilibrado	197	7,38	1,669	,119	7,14	7,61	2	14	
	afecto	18	7,28	,895	,211	6,83	7,72	5	9	
	sin resultado	53	6,36	1,606	,221	5,92	6,80	3	12	
	Total	1411	7,30	1,586	,042	7,22	7,39	2	14	
	Modelo	Efectos fijos			1,579	,042	7,22	7,39		
	Efectos aleatorios				,089	7,10	7,51			,030
Frag3	normal	444	,71	,963	,046	,62	,80	0	4	
	cromos multiples	362	,88	1,022	,054	,78	,99	0	5	
	monosomía	155	,68	,952	,076	,53	,83	0	4	
	trisomía	99	,76	1,107	,111	,54	,98	0	5	
	monosomía+trisomía	40	,65	,921	,146	,36	,94	0	3	
	poliploide	44	,75	,918	,138	,47	1,03	0	3	
	desequilibrado	197	,82	1,153	,082	,66	,98	0	5	
	afecto	18	,89	,963	,227	,41	1,37	0	3	
	sin resultado	53	1,13	1,161	,159	,81	1,45	0	4	
	Total	1412	,79	1,024	,027	,74	,84	0	5	
	Modelo	Efectos fijos			1,021	,027	,74	,84		
	Efectos aleatorios				,044	,69	,89			,006
Nucleos2	normal	446	,99	,300	,014	,96	1,01	0	3	
	cromos multiples	368	,94	,435	,023	,89	,98	0	3	
	monosomía	157	,98	,400	,032	,92	1,04	0	3	
	trisomía	99	,98	,285	,029	,92	1,04	0	2	
	monosomía+trisomía	41	1,05	,498	,078	,89	1,21	0	3	
	poliploide	45	,98	,260	,039	,90	1,06	0	2	
	desequilibrado	197	,98	,404	,029	,92	1,04	0	3	
	afecto	18	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1	
	sin resultado	54	,96	,513	,070	,82	1,10	0	3	
	Total	1425	,97	,377	,010	,95	,99	0	3	
	Modelo	Efectos fijos			,377	,010	,95	,99		
	Efectos aleatorios				,010 ^a	,95 ^a	1,00 ^a			,000

a. Advertencia: La varianza entre componentes es negativa. Ha sido reemplazada por 0,0 al calcular esta medida para los efectos aleatorios.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Cels2	9,034	8	1230	,000
Cels3	3,660	8	1402	,000
Frag3	1,369	8	1403	,206
Nucleos2	5,365	8	1416	,000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Cels2	Inter-grupos	6,845	8	,856	,820	,585
	Intra-grupos	1283,752	1230	1,044		
	Total	1290,597	1238			
Cels3	Inter-grupos	53,943	8	6,743	2,705	,006
	Intra-grupos	3494,624	1402	2,493		
	Total	3548,567	1410			
Frag3	Inter-grupos	15,052	8	1,882	1,804	,072
	Intra-grupos	1463,477	1403	1,043		
	Total	1478,529	1411			
Nucleos2	Inter-grupos	,824	8	,103	,725	,670
	Intra-grupos	201,109	1416	,142		
	Total	201,933	1424			

Pruebas robustas de igualdad de las medias

		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Cels2	Welch	,929	8	159,005	,494
	Brown-Forsythe	,813	8	378,210	,592
Cels3	Welch	2,569	8	190,384	,011
	Brown-Forsythe	2,658	8	476,675	,007
Frag3	Welch	1,668	8	188,563	,109
	Brown-Forsythe	1,801	8	493,944	,075
Nucleos2	Welch
	Brown-Forsythe

a. Distribuidos en F asintóticamente.

b. No se pueden realizar las pruebas robustas de la igualdad de medias para Nucleos2 porque al menos un grupo tiene varianza 0.

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Varianza entre componentes
					Límite inferior	Límite superior			
Cels2 monogénica	31	3,94	,574	,103	3,73	4,15	2	5	
translocación robertsoniana	152	3,80	,963	,078	3,65	3,96	0	6	
translocación recíproca	103	4,04	,816	,080	3,88	4,20	2	7	
inversión	32	4,16	1,081	,191	3,77	4,55	2	6	
cariotipo alterado	27	3,44	1,050	,202	3,03	3,86	2	6	
aborto cariot.	64	3,52	,976	,122	3,27	3,76	2	5	
abortos de repetición	149	3,79	1,042	,085	3,62	3,96	0	6	
EMA	162	3,72	,960	,075	3,57	3,87	1	6	
fallo de FIV	157	3,49	1,107	,088	3,32	3,66	1	7	
factor masculino severo	50	3,54	,973	,138	3,26	3,82	2	5	
meiosis patológica	26	3,35	,936	,183	2,97	3,72	2	5	
fish alterado	277	4,01	1,077	,065	3,88	4,13	0	8	
electivo	9	4,11	,601	,200	3,65	4,57	3	5	
Total	1239	3,79	1,021	,029	3,73	3,85	0	8	
Modelo			1,003	,029	3,73	3,84			
Efectos fijos				,077	3,62	3,96			,041
Efectos aleatorios									
Cels3 monogénica	38	7,18	1,136	,184	6,81	7,56	3	9	
translocación robertsoniana	157	7,22	1,665	,133	6,95	7,48	4	14	
translocación recíproca	117	7,45	1,453	,134	7,19	7,72	2	14	
inversión	32	8,63	1,561	,276	8,06	9,19	6	12	
cariotipo alterado	27	6,93	1,685	,324	6,26	7,59	4	11	
aborto cariot.	80	6,94	1,562	,175	6,59	7,29	3	10	
abortos de repetición	196	7,39	1,520	,109	7,17	7,60	4	14	
EMA	193	7,32	1,764	,127	7,07	7,57	3	13	
fallo de FIV	176	6,93	1,507	,114	6,71	7,16	4	12	
factor masculino severo	50	7,10	1,581	,224	6,65	7,55	4	12	
meiosis patológica	32	7,41	1,775	,314	6,77	8,05	4	11	
fish alterado	304	7,47	1,515	,087	7,30	7,64	4	12	
electivo	9	7,44	1,014	,338	6,67	8,22	6	9	
Total	1411	7,30	1,586	,042	7,22	7,39	2	14	
Modelo			1,568	,042	7,22	7,39			
Efectos fijos				,101	7,08	7,52			,067
Efectos aleatorios									
Frag3 monogénica	38	,92	1,024	,166	,58	1,26	0	4	
translocación robertsoniana	157	,91	1,129	,090	,73	1,09	0	4	
translocación recíproca	117	,87	1,149	,106	,66	1,08	0	5	
inversión	32	,06	,354	,063	-,06	,19	0	2	
cariotipo alterado	27	,59	,747	,144	,30	,89	0	2	
aborto cariot.	81	,65	,809	,090	,48	,83	0	3	
abortos de repetición	196	,50	,781	,056	,39	,61	0	4	
EMA	193	,84	1,121	,081	,69	1,00	0	5	
fallo de FIV	176	,73	,981	,074	,59	,88	0	5	
factor masculino severo	50	,70	,909	,129	,44	,96	0	3	
meiosis patológica	32	,69	,859	,152	,38	1,00	0	3	
fish alterado	304	1,02	1,094	,063	,89	1,14	0	5	
electivo	9	,89	,782	,261	,29	1,49	0	2	
Total	1412	,79	1,024	,027	,74	,84	0	5	
Modelo			1,008	,027	,74	,84			
Efectos fijos				,073	,63	,95			,037
Efectos aleatorios									
Nucleos2 monogénica	38	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1	
translocación robertsoniana	157	,97	,438	,035	,91	1,04	0	3	
translocación recíproca	117	,99	,383	,035	,92	1,06	0	3	
inversión	32	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1	
cariotipo alterado	27	,78	,424	,082	,61	,95	0	1	
aborto cariot.	81	1,02	,222	,025	,98	1,07	1	3	
abortos de repetición	196	1,01	,358	,026	,95	1,06	0	3	
EMA	193	,94	,377	,027	,88	,99	0	3	
fallo de FIV	187	,98	,231	,017	,95	1,01	0	2	
factor masculino severo	50	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1	
meiosis patológica	32	1,00	,000	,000	1,00	1,00	1	1	
fish alterado	306	,96	,511	,029	,90	1,02	0	3	
electivo	9	,67	,500	,167	,28	1,05	0	1	
Total	1425	,97	,377	,010	,95	,99	0	3	
Modelo			,376	,010	,95	,99			
Efectos fijos				,014	,94	1,00			,001
Efectos aleatorios									

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Cels2	5,069	12	1226	,000
Cels3	1,820	12	1398	,040
Frag3	4,795	12	1399	,000
Nucleos2	9,685	12	1412	,000

Pruebas robustas de igualdad de las medias

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Cels2	Welch	4,658	12	175,640
	Brown-Forsythe	5,270	12	592,878
Cels3	Welch	3,760	12	185,487
	Brown-Forsythe	3,971	12	603,508
Frag3	Welch	12,300	12	188,780
	Brown-Forsythe	5,631	12	662,372
Nucleos2	Welch	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.

a. Distribuidos en F asintóticamente.

b. No se pueden realizar las pruebas robustas de la igualdad de medias para Nucleos2 porque al menos un grupo tiene varianza 0.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Cels2	Inter-grupos	56,468	12	4,706	4,675
	Intra-grupos	1234,129	1226	1,007	,000
	Total	1290,597	1238		
Cels3	Inter-grupos	111,582	12	9,298	3,782
	Intra-grupos	3436,985	1398	2,459	,000
	Total	3548,567	1410		
Frag3	Inter-grupos	57,256	12	4,771	4,697
	Intra-grupos	1421,273	1399	1,016	,000
	Total	1478,529	1411		
Nucleos2	Inter-grupos	2,733	12	,228	1,614
	Intra-grupos	199,199	1412	,141	,081
	Total	201,933	1424		

Anexo 6. LX.

ROC

```
ZScore BY Resultado (1)
/PLOT = CURVE(REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINATES
/CRITERIA = CUTOFF(INCLUDE) TESTPOS(LARGE)
DISTRIBUTION(FREE) CI(95)
/MISSING = EXCLUDE .
```

Resumen del proceso de casos

Resultado	N válido (según lista)
Positivo ^a	392
Negativo	849
Perdido	184

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

- a. El estado real positivo es normal.

Área bajo la curva

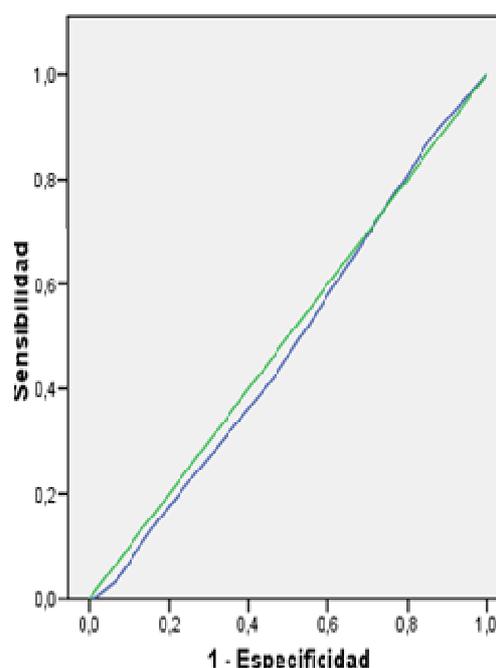
Variables resultado de contraste: ZScore

Área	Límite inferior ^a	sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,465	,017	,346	,449	,517

La variable (o variables) de resultado de contraste: ZScore tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados .

- a. Bajo el supuesto no paramétrico
b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Coordenadas de la curva

Variables resultado de contraste: ZScore

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,00	1,000	1,000
1,50	,888	,868
2,50	,423	,465
3,50	,148	,170
4,50	,033	,066
5,50	,003	,015
6,50	,000	,002
7,50	,000	,001
9,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: ZScore tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

ROC

```
HCRAS27 BY Resultado (1)
/PLOT = CURVE (REFERENCE)
/FRINT = SE COORLINATES
/CRITERIA = CUTOFF (INCLUDE) TESTPOS (LARGE)
DISTRIBUTION(FREE) CI(95)
/MISSING = EXCLUDE .
```

Resumen del proceso de casos

Resultado	N válido (según lista)
Positivo ^a	40
Negativo	142
Perdido	1234

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: HORAS27

Área	Error tp ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,473	,047	,272	,321	,622

La variable (o variables) de resultado de contraste: HORAS27 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

- a. Bajo el supuesto no paramétrico
- b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

- a. El estado real positivo es normal.

Curva COR

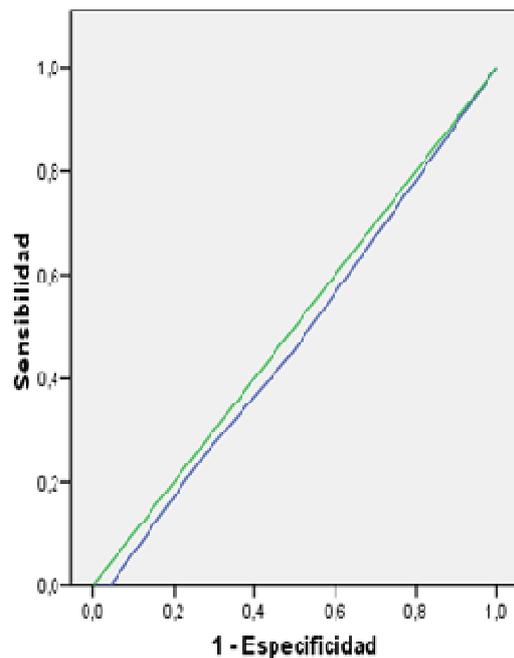
Coordenadas de la curva

Variables resultado de contraste: HORAS27

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,00	1,000	1,000
1,50	,449	,493
2,50	,245	,268
3,50	,000	,042
5,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: HORAS27 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Anexo 6. LXII.

ROC

```
Cels2 BY Resultado (1)
/PLOT = CURVE (REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINATES
/CRITERIA = CUTOFF (INCLUDE) TESTPOS (LARGE)
DISTRIBUTION (FREE) CI (95)
/MISSING = EXCLUDE .
```

Resumen del proceso de casos

Resultado	N válido (según lista)
Positivo ^a	394
Negativo	845
Perdido	186

Los valores mayores en la variable de indican una mayor evidencia de un caso:

- a. El estado real positivo es normal.

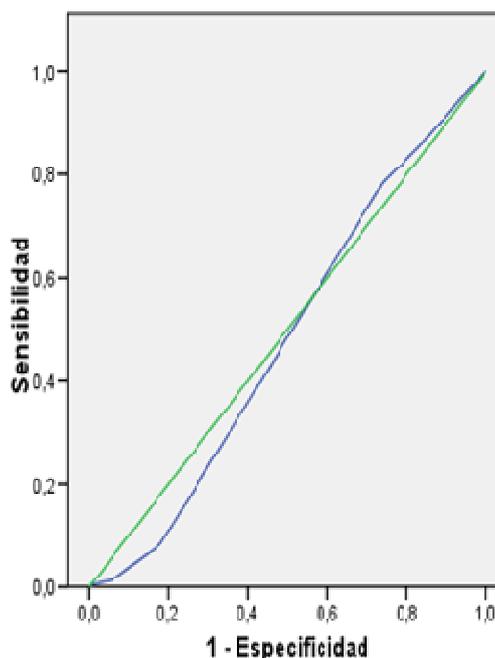
Area bajo la curva

Variables resultado de contraste: Cels2				
Area	Error t.b. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,481	,011	,283	,448	,514

La variable (o variables) de resultado de contraste: Cels2 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

- a. Bajo el supuesto no paramétrico
- b. Hipótesis nula: Área verdadera = 0,5

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Coordenadas de la curva

Variables resultado de contraste: Cels2

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1,00	1,000	1,000
,50	,997	,996
1,50	,997	,994
2,50	,858	,836
3,50	,704	,740
4,50	,081	,180
5,50	,013	,056
6,50	,005	,009
7,50	,000	,001
9,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: Cels2 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

Anexo 6. LXIII.

ROC

```
Cels3 BY Resultado (1)
/PLOT = CURVE(REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINAIES
/CRITERIA = CUTCFE(INCLUDE) TESTPOS(LARGE)
DISTRIBUTION(FREE) CI(95)
/MISSING = EXCLUDE .
```

Resumen del proceso de casos

Resultado	N válido (según lista)
Positivo ^a	444
Negativo	967
Perdido	14

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

a. El estado real positivo es normal.

Área bajo la curva

Área	Error(b) ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asimtótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,516	,016	,321	,485	,548

La variable (o variables) de resultado de contraste: Cels3 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

- a. Bajo el supuesto no paramétrico
- b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Coordenadas de la curva

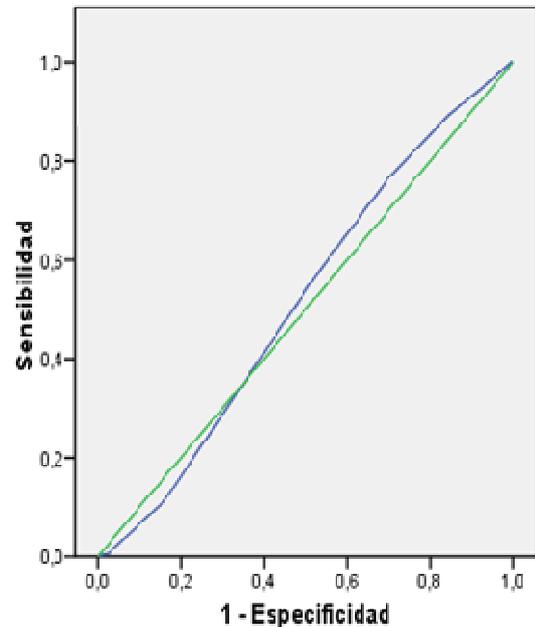
Variables resultado de contraste: Cels3

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
1,00	1,000	1,000
2,50	1,000	,999
3,50	1,000	,995
4,50	,957	,938
5,50	,894	,846
6,50	,768	,702
7,50	,551	,513
8,50	,115	,162
9,50	,045	,073
10,50	,007	,026
11,50	,005	,016
12,50	,002	,003
13,50	,000	,003
15,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: Cels3 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos

Curva ROC



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Anexo 6. LXIV.

ROC

```

Frag3 BY Resultado (1)
/PLOT = CURVE (REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINATES
/CRITERIA = CUTOFF (INCLUDE) TESTPOS (LARGE)
DISTRIBUTION (FREE) CI (95)
/MISSING = EXCLUDE .

```

Resumen del proceso de casos

Resultado	N válido (según lista)
Positivo ^a	444
Negativo	968
Perdido	13

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo

a. El estado real positivo es normal.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: Frag3

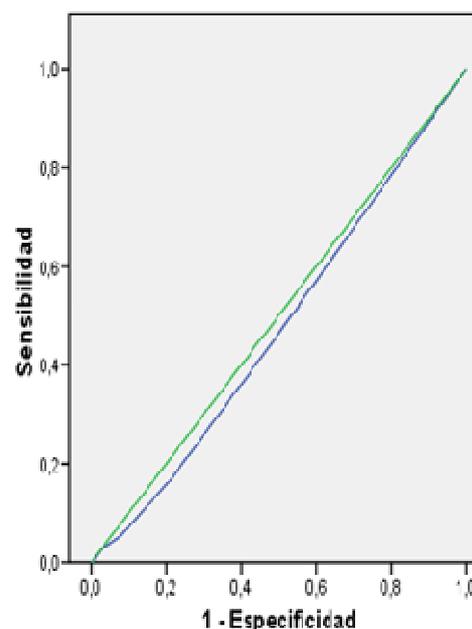
Área	Error t. ^a	Sig. asintótico ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.474	.016	.120	.441	.506

La variable (o variables) de resultado de contraste: Frag3 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: Área verdadera = 0.5

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Coordenadas de la curva

Variables resultado de contraste: Frag3

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1,00	1,000	1,000
,50	,462	,498
1,50	,171	,215
2,50	,054	,079
3,50	,027	,027
4,50	,000	,005
6,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: Frag3 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

Anexo 6. LXV.

ROC

```

Evol4 BY Resultado (1)
/PLOT = CURVE(REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINATES
/CRITERIA = CUTOFF(INCLUDE) TESTPOS(LARGE)
DISTRIBUTION(FREE) CI(95)
/MISSING = EXCLUDE .
    
```

Resumen del proceso de casos

Resultado	N válido (según lista)
Positivo ^a	443
Negativo	952
Perdido	30

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

- a. El estado real positivo es normal.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: Evol4

Área	Error tp. ^a	Sig. asintótico ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.557	.016	.001	.526	.589

La variable (o variables) de resultado de contraste: Evol4 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados .

- a. Bajo el supuesto no paramétrico
- b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Coordenadas de la curva

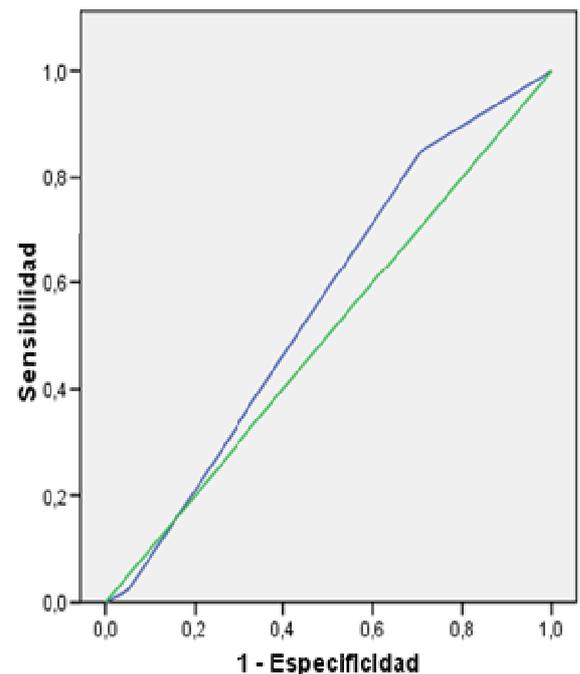
Variables resultado de contraste: Evol4

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1,00	1,000	1,000
,50	,849	,707
1,50	,023	,050
3,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: Evol4 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Anexo 6. LXVI.

ROC

```

Indicación BY Resultado (1)
/PLOT = CURVE(REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINATES
/CRITERIA = CUTOFF(INCLUDE) TESTPOS(LARGE)
DISTRIBUTION(FREE) CI(95)
/MISSING = EXCLUDE

```

Resumen del proceso de casos

Resultado	N válido (según lista)
Positivo ^a	443
Negativo	979

Los valores mayores en la variable de resultado indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

- a. El estado real positivo es normal.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: Indicación

Área	Error tip. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,333	,017	,046	,500	,566

La variable (o variables) de resultado de contraste: Indicación tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

- a. Bajo el supuesto no paramétrico.
b. El hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Coordenadas de la curva

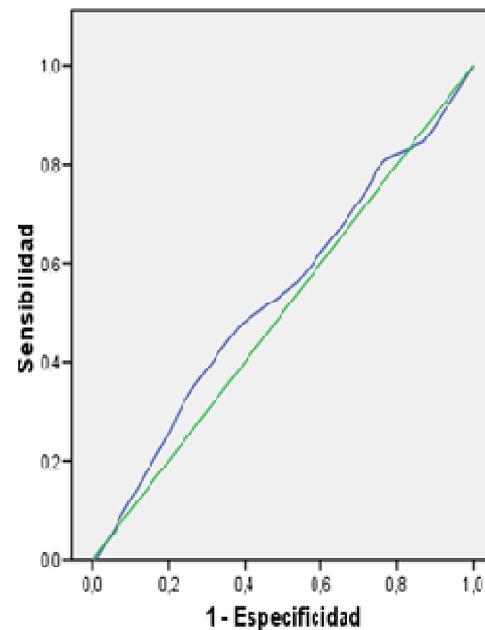
Variables resultado de contraste: Indicación

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,00	1,000	1,000
1,50	,969	,975
2,50	,845	,871
3,50	,809	,768
4,50	,789	,745
5,50	,760	,730
6,50	,697	,676
7,50	,561	,538
8,50	,471	,382
9,50	,336	,252
10,50	,291	,222
11,50	,260	,203
12,50	,000	,009
14,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: Indicación tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Anexo 6. LXVII.

ROC

```

Clasificacion BY Gestacion (1)
/PLOT = CURVE(REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINATES
/CRITERIA = CUTOFF(INCLUDE) TESTPOS(LARGE)
DISTRIBUTION(FREE) CI(95)
/MISSING = EXCLUDE .
    
```

Resumen del proceso de casos

Gestacion	N válido (según lista)
Positivo ^a	30
Negativo	310
Perddo	1077

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: Clasificacion

Área	Error p. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.435	.048	.191	.347	.529

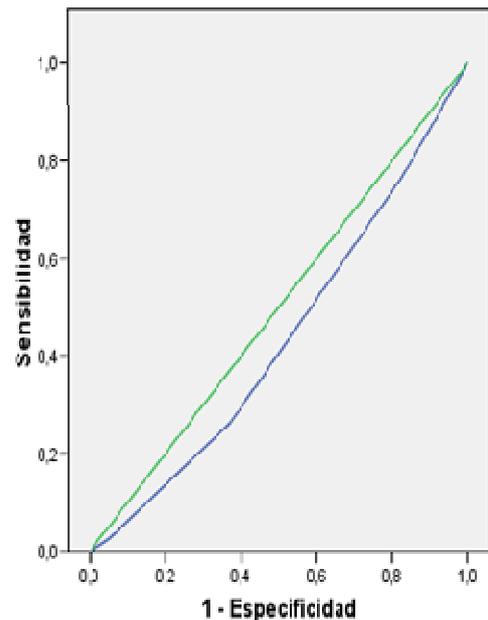
La variable (o variables) de resultado de contraste: Clasificacion tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

a. Bajo el supuesto no paramétrico
 b. Hipótesis nula: Área verdadera = 0,5

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

- a. El estado real positivo es Gestación.

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Coordenadas de la curva

Variables resultado de contraste: Clasificacion

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
.00	1,000	1,000
1,50	,763	,823
2,50	,263	,371
3,50	,026	,052
5,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: Clasificacion tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

Anexo 6. LXVIII.

ROC

```

Clasificacion BY EvolGesta (1)
/PLOT = CURVE (REFERENCE)
/PRINT = SE COORDINATES
/CRITERIA = CUTOFF (INCLUDE) TESTPOS (LARGE)
DISTRIBUTION (FREE) CI (95)
/MISSING = EXCLUDE .
    
```

Resumen del proceso de casos

EvolGesta	N válido (según lista)
Positivo ^a	63
Negativo	38
Ferdido	1324

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

- a. El estado real positivo es Parto.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: Clasificación

Área	Error t ^b *	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza a 95% para la aserción	
			Límite inferior	Límite superior
,561	,062	,308	,439	,682

La variable (o variables) de resultado de contraste: Clasificación tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

- a. Bajo el supuesto no paramétrico
- b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Coordenadas de la curva

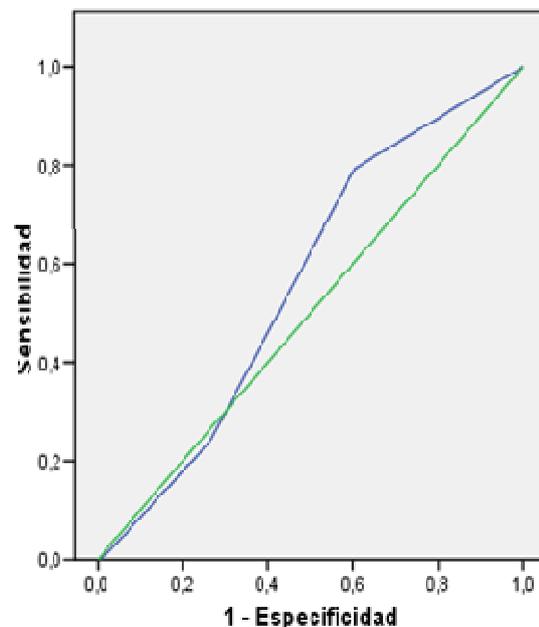
Variables resultado de contraste: Clasificación

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,00	1,000	1,000
1,50	,794	,605
2,50	,238	,263
3,50	,016	,026
5,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: Clasificación tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

- a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

Curva COR



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¿Es predecible el estado genético de un embrión?

- [1] España. **Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida**. BOE, 27 de mayo de 2006, nº 126, Disposición nº 9292, págs.: 19947-19956. BOE-A-206-9292.
- [2] España. **Instrumento de Ratificación del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina) hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997**. BOE, 20 de octubre de 1999, nº 251, Disposición nº 20638, págs.: 36825-36830. BOE-A-1999-20638.
- [3] España. **Real Decreto 42/2010, de 15 de enero, por el que se regula la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida**. BOE, 4 de febrero de 2010, nº 30, Disposición nº 1705, págs.: 9810-9815. BOE-A-2010-1705.
- [4] Steptoe PC and Edwards RG. **“Birth after the reimplantation of a human embryo”**. Lancet, 1978; 2:336.
- [5] Clarke GN. **“ART and history, 1678-1978”**. Human Reprod. 2006; 21 (7): 1645-1650.
- [6] Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirtehem AC. **“Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte”**. Lancet. 1992; 340 (8810): 17-18.
- [7] Watson JD, Crick FHC. **“Molecular structure of nucleic acids”**. Nature, 1953; 171: 737-738.
- [8] Tjio JH, Levan A. **“The chromosome number of man”**. Hereditas, 1956; 42:1-6
- [9] Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, et al. **“Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification”**. Lancet, 1989; 1 (8634): 347-349.
- [10] Gianaroli L, et al. **“ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories”**. Human Reprod. 2000; 15 (10): 2241-2246.
- [11] Thornhill AR, et al. **“ESHRE PGD Consortium “Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)”**. Human Reprod. 2005; 20 (1): 35-40.
- [12] Alemañ M, López L y Cañadas MC. **“DGP. ¿Cuándo está indicado?”**. Rev. Iber. de Fertilidad, 2007; 24 (3): 177-182

- [13] Angell RR, et al. **“Post-fertilization polyploidy in human preimplantation embryos fertilized in-vitro”**. Human Reprod. 1987; 2 (8): 721-727.
- [14] Wimmers MS, et al. **“Chromosome studies on early human embryos fertilized in vitro”**. Human Reprod. 1988; 3 (7): 894-900.
- [15] Diccionario de la Lengua Española. Real Academia de la lengua española. <http://rae.es>
- [16] Snell WJ, and White JM. **“The molecules of mamalian fertilization”**. Cell, 1996; 85, 629-664.
- [17] Sathananthan AH, and Trounson AO. **“Cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human fertilized in vitro”**. Gamete Res. 1982; 6, 225.
- [18] Evans JP, Florman HM. **“The state of union: the cell biology of fertilization”**. At Cell Biol, 2002; 4 (supple) 57-63.
- [19] Schatten G. **“The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization”**. Dev. Biol, 1994; 165, 299-335.
- [20] Simerly C, Wu GJ, Zoran S, et al. **“The paternal inheritance of the centrosome, the cell’s microtubule-organizing center, in humans and the implications for infertility”**. Nat. Med, 1995; 1, 47-51.
- [21] Dale B, Tosti E, Iaccarino M. **“Is the plasma membrane of the human oocytes reorganized following fertilization and early cleavage?”** Zygote, 1995; 3:31.
- [22] Payne D, et al. **“Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography”**. Human Reprod. 1997; 12: 532-541.
- [23] Scott LA, Smith S. **“The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval”**. Human Reprod. 1998; 13 (4): 1003-1013.
- [24] Tesarik J y Greco E. **“The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation of pronuclear stage morphology”**. Human Reprod. 1999; 14: 318-323.
- [25] Garello C, Baker H, Ray J, et al. **“Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection**

and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes?" Human Reprod. 1999; 14 (10) 2588-2595.

- [26] Scott L, Alvero R, Leondire M, Miller B. **"The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation"**. Human Reprod. 2000; 15: 2394-2403.
- [27] Nagy ZP. **"Evaluación del cigoto humano. Anomalías en la fecundación. Factores predictivos de la implantación"**. Reproducción Humana, 2ª ed. (Cap. 55) Ed. McGraw-Hill Internacional, 2002.
- [28] Scott L. **"Pronuclear scoring as a predictor of embryo development"**. Reprod. Biomed. Online, 2003; 6: 201-214.
- [29] Chen CK, et al. **"The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage"**. J. Assist. Reprod. Genet. 2003; 20 (10): 413-420.
- [30] Ebner T, et al. **"Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review"**. Human Reprod. Update. 2003; 9 (3): 251-262.
- [31] Gámiz P, et al. **"The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos"**. Human Reprod. 2003; 18 (11): 2413-2419.
- [32] Gianaroli L. et al. **"Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection"**. Fertil. & Steril. 2004; 82 (1): 258-259.
- [33] Kattera S. et al. **"Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation"**. Human Reprod. 2004; 19 (2): 294-299.
- [34] Balakier H. et al. **"Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest"**. Human Reprod. 2004; 19 (4): 982-987.
- [35] Ebner T, et al. **"Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation"**. Human Reprod. 2004; 19 (8): 1925-1926.
- [36] Edirisinghe WR, et al. **"Association of pronuclear Zscore with rates of aneuploidy in in-vitro fertilised embryos"**. Reprod Fertil. Dev., 2005; 17 (5): 529-534.

- [37] Gianaroli L, et al. **“Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement”**. Human Reprod. 2007; 22 (1): 241-249.
- [38] Kayisli UA, et al. **“What to do with embryos originating from one pronucleus or initial no fertilization?”** Fertil. & Steril. 2010; 94 (4) Supp.: S36.
- [39] Mantikou E, et al. **“Temporal and developmental-stage variation in the occurrence of mitotic errors in tripronuclear human preimplantation embryos”**. Biology of reproduction. 2013; 89 (2): 42, 1-7.
- [40] Shoukir Y, Sakkas D, et al. **“Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability”**. Human Reprod. 1997; 12 (7): 1531-1536.
- [41] Salumets A et al. **“Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures”**. Human Reprod. 2003; 18 (4): 821-825.
- [42] Bean CJ, et al. **“Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system”**. Human Reprod. 2002; 17 (9): 2362-2367.
- [43] Wharf E, et al. **“Early embryo development is an indicator of implantation potential.”** Reprod Biomed. Online, 2004; 8 (2): 212-218.
- [44] Brezinova J, et al. **“Embryo quality evaluation according to the speed of the first cleavage after IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI)”**. Ceska Gynekol. 2006; 71 (3): 204-208.
- [45] Jurisicova A, et al. **“Programmed cell death and human embryo fragmentation”**. Molecular Human Reprod. 1996; 2 (2): 93-98.
- [46] Alikani M, et al. **“Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation”**. Fertil. & Steril. 1999; 71 (5): 836-842.
- [47] Antczak M, et al. **“Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains”**. Human Reprod. 1999; 14 (2): 429-447.
- [48] Van Blerkom J, et al. **“A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos”**. Human Reprod. 2001; 16 (4): 719-729.

- [49] Delimitreva SM, et al. **“Chromosomal disorders and nuclear and cell destruction in cleaving human embryos”**. *Internat. J. Develop. Biology*. 2005; 49: 409-416.
- [50] Hardy K, et al. **“Binucleate blastomeres in preimplantation human in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage”**. *J. Human Reprod.* 1993; 98: 549-558.
- [51] Jackson KV, et al. **“Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in-vitro fertilization-embryo transfer cycles”**. *Fertil. & Steril.* 1998; 70 (1): 60-66.
- [52] Pelinck MJ, et al. **“Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection”**. *Human Reprod.* 1998; 13 (4): 960-963.
- [53] Van Royen E, et al. **“Multinucleation in cleavage stage embryos”**. *Human Reprod.* 2003; 18 (5): 1062-1069.
- [54] Cuadernos de embriología clínica. ASEBIR. **“II-Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos”**. Comisión de trabajo. ASEBIR. Coordinadores: Ardoy M y Calderón G. Ponentes: Cuadros J, Herrero R, Figueroa MJ, Moreno JM, Ortiz A, Prados F, Rodríguez L, Santaló J, de los Santos MJ y Ten J. Madrid 2007.
- [55] Prados FJ, et al. **“The cleavage stage embryo”**. *Human Reprod.* 2012; 27 (S1): i50-i71.
- [56] Richards T. **“IVF update”**. *BMJ.* 1986; 292: 1156-1157.
- [57] Jamieson ME, et al. **“The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro”**. *Human Reprod.* 1994; 9 (4): 709-715.
- [58] Bavister B. **“Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts”**. *Human Reprod. Update*, 1995; 1: 91-148.
- [59] Beyer CE, et al. **“Preimplantation genetic screening outcomes are associated with culture conditions”**. *Human Reprod.* 2009; 24 (5): 1212-1220.

- [60] Gleicher N, et al. **“Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces embryo aneuploidy: direct evidence from preimplantation genetic screening (PGS)”**. *Reprod. Biology and Endocrinology*. 2010; 8: 140-144.
- [61] Verpoest W, et al. **“Chromosomal aneuploidy in embryos conceived with unstimulated cycle IVF”**. *Human Reprod.* 2008; 23 (10): 2369-2371.
- [62] Massie JAM, et al. **“Ovarian stimulation and the risk of aneuploid conceptions”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (3): 970-972.
- [63] Yakin K, et al. **“Oocyte dysmorphism is not associated with aneuploidy in the developing embryo”**. *Fertil. & Steril.* 2007; 88 (4): 811-816.
- [64] Obradors A, et al. **“Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 93 (2): 675-679.
- [65] Kuliev A, et al. **“Meiosis errors in over 20000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing”**. *RBO*. 2011; 22: 2-8.
- [66] Schmutzler AG, et al. **“Oocyte morphology on day 0 correlates with aneuploidy as detected by polar body biopsy and FISH”**. *Gynec. Obstetrics*. 2014; 289 (2): 445-450.
- [67] Zhang XY, et al. **“Chromosome abnormality rates in human embryos obtained from in-vitro maturation and IVF treatment cycles”**. *RBO*. 2010; 21: 552-559.
- [68] Combelles CMH, et al. **“Cellular and genetic analysis of oocytes and embryos in a human case of spontaneous oocyte activation”**. *Human Reprod.* 2011; 26 (3): 545-552.
- [69] Mantikou E, et al. **“Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos”**. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1822: 1921-1930.
- [70] Rabinowitz M, et al. **“Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres”**. *Fertil. & Steril.* 2012; 97 (2): 395-401.
- [71] Munné S, et al. **“Intra-age, intercenter, and intercycle differences in chromosomes abnormalities in oocytes”**. *Fertil. & Steril.* 2012; 97 (4): 935-942.
- [72] Fragouli E, et al. **“The origin and impact of embryonic aneuploidy”**. *Human Genetics*. 2013; 132 (9): 1001-1013.

- [73] Delhanty JDA. **“The origins of genetic variation between individual human oocytes and embryos: implications for infertility”**. *Human Fertil.* 2013; 16 (4): 241-245.
- [74] Scott Sills E, et al. **“Determining parental origin of embryos aneuploidy: analysis of genetic error observed in 305 embryos derived from anonymous donor oocyte IVF cycles”**. *Molecular Cytogenetics.* 2014; 7:68-75.
- [75] Zheng P, Dean J. **“Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis”**. *PNAS.* 2009; 106 (18): 7473-7478.
- [76] Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, et al. **“Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfer”**. *Human Reprod.* 1995; 10, 2427-2431.
- [77] Pickering S, Braude S. **“ABC of subfertility. Further advances and uses of assisted conception technology”**. *BMJ.* 2003; 327: 1156-1158.
- [78] Devaux A, Levy R. **“How to improve assisted reproductive techniques results? Biological aspects”**. *Gynecol Obstet Fertil.* 2006; 34 (9): 781-785.
- [79] Kamphuis E, et al. **“Are we overusing IVF?”** *BMJ.* 2014; 348: g252.
- [80] Donoso P, Staessen C, Fauser BCJM and Devroey P. **“Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF”**. *Human Reprod.* 2007; 13 (1): 15–25.
- [81] Mastenbroek S, et al. **“In vitro fertilization with Preimplantation Genetic Screening”**. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357 (1): 9-17.
- [82] Kahraman S, et al. **“The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques”**. *Prenat. Diagn.* 2004; 2(4): 307-311.
- [83] Grifo J, et al. **“Ten-year experience with preimplantation genetic diagnosis (PGD) at the New York University School of Medicine Fertility Center”**. *Fertil. & Steril.* 2007; 88 (4): 978-981.
- [84] Donoso P, et al. **“Prognostic factors for delivery in patients undergoing repeated preimplantation genetic aneuploidy screening”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (6): 2362-2364.
- [85] Verpoest W, et al. **“Cumulative reproductive outcome after preimplantation genetic diagnosis: a report on 1498 couples”**. *Human Rerod.* 2009; 24 (11): 2951-2959.

- [86] Ginsburg ES, et al. **“Use of preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening in the United States: a Society for Assisted Reproductive Technology Writing Group paper”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 96 (4): 865-868.
- [87] Ogilvie CM, et al. **“Preimplantation genetic diagnosis: an overview”**. *J. Histochem. Cytochem.* 2005; 53 (3): 255-60.
- [88] Gleicher N, et al. **“Preimplantation genetic screening: “established” and ready for prime time?”** *Fertil. & Steril.* 2008; 89 (4): 780-788.
- [89] Baart EB, et al. **“Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF”**. *Human Reprod.* 2006; 21 (1): 223-233.
- [90] Huang A, et al. **“The rate of mosaicism in pregnancies from couples with infertility”**. *Fertil. & Steril.* 2006; 86 (Suppl. 3): S22.
- [91] Coulam CB, et al. **“Discordance among blastomeres renders preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy ineffective”**. *J. Assist Reprod. Genet.* 2007; 24: 37-41.
- [92] Krieg SA, et al. **“Case report: Normal pregnancy after tetraploid karyotype on trophoctoderm biopsy”**. *Fertil. & Steril.* 2009; 92 (3): 1169.e9-1169.e10.
- [93] Johnson DS, et al. **“Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophoctoderm and inner cell mass”**. *Molecular Human Reprod.* 2010; 16 (12): 944-949.
- [94] V. Echten-Areds J, et al. **“Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review”**. *Human Reprod. Update.* 2011; 17 (5): 620-627.
- [95] Haddad G, et al. **“Mosaic pregnancy after transfer of a “euploid” blastocyst screened by DNA microarray”**. *J. Ovarian Research.* 2013; 6: 70-74.
- [96] Capalbo A, et al. **“FISH reanalysis of inner cell mass and trophoctoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no mayor diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage”**. *Human Reprod.* 2013; 28 (8): 2298-2307.
- [97] Ghevaria H, et al. **“The contribution of germinal mosaicism to human aneuploidy”**. *Citogen. Genome Research.* 2014; 144 (4): 264-274.

- [98] Taylor TH, et al. **“The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans”**. Human Reprod. Update. 2014; 20 (4): 571-581.
- [99] Forman EJ, et al. **“Embryos whose polar bodies contain isolated reciprocal chromosome aneuploidy are almost always euploid”**. Human Reprod. 2013; 28 (2): 502-508.
- [100] Capalbo A, et al. **“Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryos development”**. Human Reprod. 2013; 28 (2): 509-518.
- [101] Bazrgar M, et al. **“Self-correction of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos and embryonic stem cells”**. Stem Cells Development. 2013; 22 (17): 2449-2456.
- [102] Barbash-Hazan S, et al. **“Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential”**. Fertil. & Steril. 2009; 92 (3): 890-896.
- [103] Bradley CK, et al. **“Cell lines from morphologically abnormal discarded IVF embryos are typically euploid and unaccompanied by intrachromosomal aberrations”**. RBO. 2014; 28 (6): 780-788.
- [104] Pen R, et al. **“Preimplantation genetic screening (PGS) for aneuploidy in couples undergoing donor egg in vitro fertilization cycles”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl. 1): S238.
- [105] Wagner-Coughlin C, et al. **“Preimplantation genetic screening (PGS) in donor egg cycles: evidence for a beneficial effect”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl. 1): S308.
- [106] Labarta E, et al. **“Incidence of embryo aneuploidies in natural and stimulated cycles in the same oocyte donor. Preliminary results”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl. 1): S310.
- [107] Checa MA, et al. **“IVF/ICSI with or without preimplantation genetic screening for aneuploidy in couples without genetic disorders: a systematic review and meta-analysis”**. J. Assist. Reprod. Genet. 2009; 26: 273-283.
- [108] Meyer LR, et al. **“A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the “good prognosis” patient”**. Fertil. & Steril. 2009; 91 (5): 1731-1738.

- [109] Deng A Wang W-H. **“Assessment of aneuploidy formation in human blastocyst resulting from cryopreserved donor eggs”**. *Molecular Cytogenetics*. 2015; 8: 12-19.
- [110] Goldman KN, et al. **“Long-term cryopreservation of human oocytes does not increase embryonic aneuploidy”**. *Fertil. & Steril.* 2015; 103 (3): 662-668.
- [111] Cohen J, et al. **“Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates”**. *Fertil. & Steril.* 2007; 87 (3): 496-503.
- [112] Hegedus CM, et al. **“The effect of day 3 embryo biopsy on thawed embryo transfer outcomes”**. *Fertil. & Steril.* 2008; 90 (Suppl. 1): S296.
- [113] Kinzer DR, et al. **“What is the potential of cryopreserved blastocysts derived from embryos biopsied for preimplantation genetic diagnosis?”** *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (4): S128.
- [114] Taylor TH, et al. **“The effects of different laser pulse lengths on the embryo biopsy procedure and embryo development to the blastocyst stage”**. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010; 27: 663-667.
- [115] Zhang L, et al. **“Reliable preimplantation genetic diagnosis in thawed human embryos vitrified at cleavage stages without biopsy”**. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011; 28: 597-602.
- [116] Zakharova EE, et al. **“Biopsy of human morula-stage embryos: outcome of 215 IVF/ICSI cycles with PGS”**. *Plos One.* 2014; 9 (9): e106433.
- [117] Scott KL, et al. **“Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing”**. *Fertil. & Steril.* 2013; 100 (3): 608-614.
- [118] Tur-Kaspa I, et al. **“To PGD or not to PGD: is there a magic number of oocytes to start with?”** *Fertil. & Steril.* 2007; 88 (Suppl. 1): 231-232.
- [119] Summers MC, et al. **“Quantitative decision-making in preimplantation genetic (aneuploidy) screening (PGS)”**. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2009; 26: 487-502.
- [120] Orris JJ, et al. **“The utility of embryo banking in order to increase the number of embryos available for preimplantation genetic screening in advanced maternal age patients”**. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010; 27: 729-733.

- [121] Ata B, et al. **“Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated”**. RBO. 2012; 24: 614-620.
- [122] Chatziparasidou A, et al. **“Accumulation of oocytes and/or embryos by vitrification: a new strategy for managing poor responder patients undergoing pre implantation diagnosis”**. F1000Research. 2014; 2: 240-249.
- [123] Braude P, Flinter F. **“Use and misuse of preimplantation genetic testing”**. BMJ. 2007; 335: 752-754.
- [124] Melzer D, and col. **“Genetic test for common diseases: new insights, old concerns”**. BMJ. 2008; 336: 590-593.
- [125] Mersereau JE, et al. **“Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (4): 1287-1289.
- [126] Verpoest W. **“Preimplantation genetic diagnosis: design or too much design”**. F, V & V in ObGyn. 2009; 1 (3): 2008-222.
- [127] Cooper AR and Jungheim ES. **“Preimplatation Genetic Testing: indications and controversies”**. Clin. Lab. Med. 2010; 30 (3): 519-531.
- [128] Ly KD, et al. **“Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo?”** J. Assis. Reprod. Genet. 2011; 28: 833-849.
- [129] Hurley R. **“Are new technologies in infertility treatment always good news?”** BMJ. 2013; 347: f6004.
- [130] Wright CF et al. **“Policy challenges of clinical genome sequencing”**. BMJ. 2013; 347: f6845.
- [131] Edelman E, et al. **“A practical guide to interpretation and clinical application of personal genomic screening”**. BMJ. 2009; 339: b4253.
- [132] Flinter F. **“Should we sequence everyone’s genome? No”** BMJ. 2013; 346: f3132.
- [133] Sahin L, et al. **“Is preimplantation genetic diagnosis the ideal embryo selection method in aneuploidy screening?”** J. Medical Sciences. 2014; 30: 491-498.
- [134] Mastenbroek S, Repping S. **“Preimplantation Genetic Screening: back to the future”**. Human Reprod. 2014; 29 (9): 1846-1850.

- [135] Magli MC, et al. **“Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement”**. Fertil. & Steril. 2007; 87 (3): 534-541.
- [136] Holt J, et al. **“Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval”**. Human Reprod. 2007; 22 (2): 548-557.
- [137] Moayeri SE, et al. **“Day-3 embryo morphology predicts euploidy among older subjects”**. Fertil. & Steril. 2008. 89 (1): 118-123.
- [138] Luna M, et al. **“Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 (≥ 10 cells), bringing into question current embryological dogma”**. Fertil. & Steril. 2008; 89 (2): 358-363.
- [139] Buehler N, et al. **“Potential of fast-cleaving embryos”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (1): 243-244.
- [140] Choi HW, et al. **“The association between preimplantation embryo morphology and the incidence of chromosome aneuploidy”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl. 1): S489.
- [141] Florensa M, et al. **“Relationship between embryo morphology on day-3 and day-5 and chromosomal abnormalities in different preimplantation genetic diagnosis (PGD) indications”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl. 1): S303.
- [142] Frumkin T, et al. **“Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation to their developmental potential”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl. 1): S303.
- [143] Kotze DJ, et al. **“Deceptive appearances: moving beyond morphology in embryo selection. A picture is not worth 23 chromosomes”**. Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl. 1): S372.
- [144] Munné S, Tomkin G, Cohen J. **“Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations”**. Fertil. & Steril. 2009; 91 (3): 943-945.
- [145] Wells D. **“Embryo aneuploidy and the role of morphological and genetic screening”**. RBO. 2010; 21: 274-277.
- [146] Fragouli E, Wells D. **“Aneuploidy in the human blastocyst”**. Cytogen. Genome Research. 2011; 133: 149-159.

- [147] Scott KL; et al. **“Characterizing the relationship between morphologic embryonic development and ploidy status as assessed by 24 chromosome microarray PGD”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (Suppl. 4): S122-S123.
- [148] Alfarawati S, et al. **“The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (2): 520-524.
- [149] Eaton JL, et al. **“Influence of embryo sex on development to the blastocyst stage and euploidy”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (3): 936-939.
- [150] Ajduk A, Zernicka-Goetz M. **“Advances in embryo selection methods”**. *F1000 Biology Reports.* 2012; 4: 11-15.
- [151] Mertzaniidou A, et al. **“Evolution of aneuploidy up to Day 4 of human preimplantation development”**. *Human Reprod.* 2013; 28 (6): 1716-1724.
- [152] Dekel-Naftali M, et al. **“Chromosomal integrity of human preimplantation embryos at different days post fertilization”**. *J. Assist. Reprod. Genetic.* 2013; 30: 633-648.
- [153] Mertzaniidou A, et al. **“Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos”**. *Human Reprod.* 2013; 28 (1): 256-264.
- [154] Huang J, et al. **“Chromosomal characteristics at cleavage and blastocyst stages from the same embryos”**. *J. Assist. Reprod. & Genetics.* 2015; 32 (5): 781-787.
- [155] Fragouli E, et al. **“Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryo”**. *Molecular Human Reprod.* 2014; 20 (2): 117-126.
- [156] Geraedts JPM. **“Obscure effect of aneuploidy on embryo morphology”**. *Molec. Human Reprod.* 2014; 20 (2): 101-102.
- [157] Vega M, et al. **“Blastulation rates decline in a linear fashion from euploid to aneuploid embryos with single versus multiple chromosomal errors”**. *Fertil. & Steril.* 2014; 102 (2): 394-398.
- [158] Capalbo A, et al. **“Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts”**. *Human Reprod.* 2014; 29 (6): 1173-1181.

- [159] Conaghan J, et al. **“Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial”**. *Fertil. & Steril.* 2013; 100 (2): 412-419.e5.
- [160] Campbell A, et al. **“Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics”**. *RBO.* 2013; 26: 477-485.
- [161] Campbell A, et al. **“Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS”**. *RBO.* 2013; 27: 140-146.
- [162] Paternot G, et al. **“Semi-automated morphometric analysis of human embryos can reveal correlations between total embryo volume and clinical pregnancy”**. *Human Reprod.* 2013; 28 (3): 627-633.
- [163] Swain JE. **“Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS?”** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013; 30: 1081-1090.
- [164] VerMilyea MD, et al. **“Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multicentre study”**. *RBO.* 2014; 29: 729-736.
- [165] Kaser DJ, Racowsky C. **“Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review”**. *Human Reprod. Update.* 2014; 20 (5): 617-631.
- [166] Kramer YG, et al. **“Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal?”** *J. Assist. Reprod. & Genetics.* 2014; 31 (9): 1231-1242.
- [167] Ottolini C, et al. **“COMMENTARY. A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging”**. *RBO.* 2014; 28: 273-275.
- [168] Campbell A, et al. **“COMMENTARY. Aneuploidy is a causal factor of delays in blastulation: author response to “A cautionary note against aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging”**. *RBO.* 2014; 28: 279-283.
- [169] Yang Z, et al. **“Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients**

- undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes". BMC Medical Genomics. 2014; 7:38-51.
- [170] Diamond MP, et al. "Using the *Eeva* Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience". J. Assist. Reprod. Genet. 2015; 32: 61-68.
- [171] Chawla M, et al. "Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study". J. Assis. Reprod. & Genetics. 2015; 32 (1): 69-75.
- [172] Rienzi L, et al. "No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study". RBO. 2015; 30: 57-66.
- [173] Katz-Jaffe MG, Gardner DK. "Embryology in the era of proteomics". Theriogenology. 2007; 68 (S1): S125-S130.
- [174] Katz-Jaffe MG, Gardner DK. "Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception?" RBO. 2008; 17 (0): 497-501.
- [175] Katz-Jaffe MG, et al. "The role of proteomics in defining the human embryonic secretome". Molecular Human Reprod. 2009; 15 (5): 271-277.
- [176] Picton HM, et al. "Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro". Molecular Human Reprod. 2010; 16 (8): 557-569.
- [177] Hardarson T, et al. "Non-invasive metabolomics profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial". Human Reprod. 2012; 27 (1): 89-96.
- [178] Rivera Egea R, et al. "OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology". J. Human Reprod. Sci. 2014; 7 (2): 73-92.
- [179] Milachich T. "Review Article. New advances of preimplantation and prenatal genetic screening and noninvasive testing as a potential predictor of health status of babies". BioMed Research International. 2014; Vol. 2014, Article ID 306505.

- [180] Kaser DJ, et al. **“Embryo biopsy for aneuploidy detection in the general infertility population”**. *Semin. Reprod. Medicine*. 2014; 32 (2): 100-106.
- [181] Munné S, et al. **“Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities”**. *Fertil. & Steril*. 1995; 64 (2): 382-391.
- [182] Staessen C, et al. **“Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial.”** *Human Reprod*. 2004; 19 (12): 2849-2858.
- [183] Mastenbroek S, et al. **“Preimplantation genetic screening of embryos for chromosome abnormalities reduces the success rate of in vitro fertilisation (IVF) by nearly a third in older women, according to a European Study”**. *New England J. of Medicine*. 2007; 356: 9-17.
- [184] Thum M-Y, et al. **“Relationship between women’s age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment”**. *Fertil. & Steril*. 2008; 90 (2): 315-321.
- [185] Twisk M, et al. **“No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy”**. *Human Reprod*. 2008; 23 (12): 2813-2817.
- [186] Vialard F, et al. **“Oocyte aneuploidy mechanisms are different in two situations of increased chromosomal risk: older patients and patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization”**. *Fertil. & Steril*. 2007; 87 (6): 1333-1339.
- [187] Staessen C, et al. **“Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer”**. *Human Reprod*. 2008; 23 (12): 2818-2825.
- [188] Schoolcraft WB, et al. **“Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial”**. *Fertil. & Steril*. 2009; 92 (1): 157-162.
- [189] Hardarson T, et al. **“Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial”**. *Human Reprod*. 2008; 23 (12): 2806-2812.

- [190] Mersereau JE, et al. **“Preimplantation genetic screening in older women: a cost-effectiveness analysis”**. *Fertil. & Steril.* 2008; 90 (3): 592-598.
- [191] Debrock S, et al. **“Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 93 (2): 364-373.
- [192] Eaton JL, et al. **“Influence of patient age on the association between euploidy and day-3 embryo morphology”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (1): 365-367.
- [193] Paes de Almeida Ferreira Braga D, et al. **“Contributing factors for the incidence of aneuploidy in older patients undergoing intracytoplasmic sperm injection cycles”**. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012; 29: 911-916.
- [194] Rabinowitz M, et al. **“Effects of advanced maternal age are abrogated in 122 patients undergoing transfer of embryos with euploid microarray screening results at cleavage stage”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (4) Suppl.: S80.
- [195] Rius M, et al. **“Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (1): 413-416.
- [196] Liu J, et al. **“DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic”**. *Biology of reprod.* 2012; 87 (6): 148, 1-9.
- [197] Handyside AH, et al. **“Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilization”**. *Europe. J. Human Genetics.* 2012; 20: 742-747.
- [198] Taylor TH, et al. **“Blastocyst euploidy and implantation rates in a young (>35 years) and old (≥35 years) presumed fertile and infertile patient population”**. *Fertil. & Steril.* 2014; 102 (5): 1318-1323.
- [199] Sunkara SK, Seshadri S. **“Increase in older women presenting as unexplained subfertility may explain overuse of in vitro fertilization”**. *BMJ.* 2014; 348: 1583.
- [200] Franasiak JM, et al. **“The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15169 consecutive trophoderm**

- biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening**". *Fertil. & Steril.* 2014; 101 (3): 656-663.e1.
- [201] Mantzouratou A, et al. **"Viable aneuploidy mechanisms in embryos from couples with poor reproductive histories undergoing preimplantation genetic screening"**. *Human Reprod.* 2007; 22 (7): 1844-1853.
- [202] Weghofer A, et al. **"Aneuploidy rates in embryos from women with prematurely declining ovarian function: a pilot study"**. *Fertil. & Steril.* 2007; 88 (1): 90-94.
- [203] Finn A, et al. **"Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients"**. *RBO.* 2010; 21: 381-390.
- [204] Souza Setti A, et al. **"Are poor responders patients at higher risk for producing aneuploid embryos in vitro?"** *J. Assist. Reprod. Gene.* 2011; 28: 399-404.
- [205] Musters AM, et al. **"Preimplantation genetic diagnosis (PGD): Perspectives of patients with high risk of transmitting genetic disorders"**. *Fertil. & Steril.* 2008; 90 (Suppl.): S296.
- [206] Kilani Z, et al. **"Chromosome analysis in embryos from young patients with previous parity"**. *RBO.* 2014; 29 (3): 333-339.
- [207] Marquard K, et al. **"Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years"**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (4): 1473-1477.
- [208] Ogasawara M, et al. **"Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages"**. *Fertil. & Steril.* 2000; 73 (2): 300-304.
- [209] Franssen MTM, et al. **"Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study"**. *BMJ.* 2006; *BMJ*, doi:10.1136/bmj.38735.459144.2F.
- [210] Lathi RB, et al. **"Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis"**. *Fertil. & Steril.* 2008; 89 (2) 353-357.
- [211] Young D, et al. **"Impact of aeuploidy following unexplained recurrent miscarriage"**. *Fertil. & Steril.* 2009; 92 (Suppl. 3): S200.
- [212] Wang N, et al. **"Preimplantation Genetic Screening: An effective testing for infertile and repeated miscarriage patients?"** *Obst. And. Gynecol. Internat.* 2010; 2010: ID120130.

- [213] Musters A, et al. **“Pregnancy outcome after preimplantation genetic screening or natural conception in couples with unexplained recurrent miscarriage: a systematic review of the best available evidence”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (6): 2153-2157.e3.
- [214] Hodes-Wertz, B, et al. **“Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos”**. *Fertil. & Steril.* 2012; 98 (3): 675-680.
- [215] Fujisawa Y, et al. **“Assessment of chromosomal abnormalities in spontaneous abortions and potential efficiency of preimplantation genetic screening”**. *Fertil. & Steril.* 2008; 90 (Suppl.): S307.
- [216] Hudson SBA, et al. **“Preimplantation genetic screening in a case of recurrent trisomy 21 offspring”**. *Fertil. & Steril.* 2009; 91 (3): 930.e17-930.e18.
- [217] Al-Asmar N, et al. **“Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage”**. *Fertil. & Steril.* 2012; 98 (1): 145-150.
- [218] Forman EJ, et al. **“Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates”**. *Human Reprod.* 2012; 27 (4): 1217-1222.
- [219] Conn CM et al. **“Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions”**. *Human Genet.* 1998; 102 (1): 117-123.
- [220] Molina Gomes D, et al. **“Preconceptional diagnosis for Robertsonian translocation as an alternative to preimplantation genetic diagnosis in two situations: a pilot study”**. *J. Assist. Genet.* 2009; 26: 113-117.
- [221] Fiorentino F, et al. **“Polymerase chain reaction-based detection of chromosomal imbalances on embryos: the evolution of preimplantation genetic diagnosis for chromosomal translocations”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (6): 2001-2011.e6.
- [222] Rius M, et al. **“Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hybridization”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 96 (1): 134-142.
- [223] Treff NT, et al. **“Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced**

- translocations in preimplantation human embryos**". *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (5): 1606-1612.e2.
- [224] Fiorentino F, et al. **"PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization"**. *Human Reprod.* 2011; 26 (7): 1925-1935.
- [225] Munné S. **"Preimplantation Genetic Diagnosis for aneuploidy and translocations using Array Comparative Genomic Hybridization"**. *Current Genomics.* 2012; 13:463-470.
- [226] Alfarawati S, et al. **"Embryos of Robertsonian Translocation carriers exhibit a mitotic interchromosomal effect that enhances genetic instability during early development"**. *Plos Genetics.* 2012; 8 (10): e1003025.
- [227] Ko DS, et al. **"Preimplantation genetic diagnosis outcomes and meiotic segregation analysis of robertsonian translocation carriers"**. *Fertil. & Steril.* 2013; 99 (5): 1369-1376.
- [228] Idowu D, et al. **"Pregnancy outcomes following 24-chromosome preimplantation genetic diagnosis in couples with balanced reciprocal or Robertsonian translocations"**. *Fertil. & Steril.* 2015; 103 (4): 1037-1042.
- [229] Kasikova K, et al. **"Sperm meiotic segregation, aneuploidy and high risk of delivering an affected offspring in carriers of non-Robertsonian translocation t(13;15)"**. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010; 29: 693-698.
- [230] Georgiou I, et al. **"Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method"**. *Asian J. Andrology.* 2006; 8 (6): 643-673.
- [231] Dubey A, et al. **"The influence of sperm morphology on preimplantation genetic diagnosis cycles outcome"**. *Fertil. & Steril.* 2008; 89 (6): 1665-1669.
- [232] Weng SP, et al. **"Complex chromosome abnormality in patients with in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)"**. *Fertil. & Steril.* 2008; 90 (Suppl. 1): S239.
- [233] Nicopoulos JDM, et al. **"The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection?"** *Human Reprod.* 2008; 23 (2): 240-250.
- [234] Mateu E, et al. **"Aneuploidies in embryos and spermatozoa from patients with Y chromosome microdeletions"**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (7): 2874-2877.

- [235] Figueira RCS, et al. **“Morphological nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (3): 990-993.
- [236] Zouli C, et al. **“A man with 47,XYY karyotype, prolactinoma and a history of first trimester recurrent miscarriages in his wife”**. *Hormones.* 2011; 10 (1): 72-75.
- [237] Vialard F, et al. **“The high frequency of sperm aneuploidy I Klinefelter patients and in nonobstructive azoospermia is due to meiotic errors in euploid spermatocytes”**. *J. Andrology.* 2012; 33 (6): 1352-1359.
- [238] Kirkpatrick G, et al. **“A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes”**. *Fertil. & Steril.* 2008; 90 (Suppl. 1): S314.
- [239] Rodrigo L, et al. **“Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples”**. *Fertil. & Steril.* 2011; 95 (3): 1005-1012.
- [240] Enciso M, et al. **“Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities”**. *Human Reprod.* 2013; 28 (6): 1707-1715.
- [241] Esbert M, et al. **“Preimplantation genetic screening on patients with meiotic disorders”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 94 (Suppl. 4): S15.
- [242] Harton GL, et al. **“Chromosomal disorders and male infertility”**. *Asian J. Andrology.* 2012; 14: 32-39.
- [243] Voullaire L, et al. **“High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure”**. *Fertil. & Steril.* 2007; 87 (5): 1053-1058.
- [244] Pagidas K, et al. **“Predictive value of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated IVF-ET cycles among women with recurrent implantation failure”**. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2008; 25: 103-106.
- [245] Martínez MC, et al. **“Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment”**. *Fertil. & Steril.* 2010; 93 (1): 289-292.

- [246] Greco E, et al. **“Comparative Genomic Hybridization selection for blastocysts for repeated implantation failure treatment: a pilot study”**. BioMed Research Internat. 2014; ID 457913.
- [247] Fritz MA. **“EDITORIAL COMMENTARY. Perspectives on the efficacy and indications for preimplantation genetic screening: where are we now?”** Human Reprod. 2008; 23 (12): 2617-2621.
- [248] Basille C, et al. **“Preimplantation genetic diagnosis: State of the art”**. EJOG. 2009 145 (1): 9-13.
- [249] Harper J. et al. **“ESHRE PAGES. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium steering committee”**. Human Reprod. 2010; 25 (4): 821-823.
- [250] Schoolcraft W, et al. **“Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage”**. Fertil. & Steril. 2010; 94 (5): 1700-1706.
- [251] Brezina PR, et al. **“CLINICAL REVIEW. Preimplantation genetic testing”**. BMJ. 2012; 345: e5908.
- [252] Brezina PR, Kutteh WH. **“STATE OF THE ART REVIEW. Clinical applications of preimplantation genetic testing”**. BMJ. 2014; 349: g7611-7623.
- [253] Harper J, et al. **“NEW DEBATE. What next for preimplantation genetic screening?”** Human Reprod. 2008; 23 (3): 478-480.
- [254] Jansen RPS, et al. **“DEBATE-CONTINUED. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy”**. Human Reprod. 2008; 23 (7): 1476-1478.
- [255] Yakin K and Urman B. **“DEBATE-CONTINUED. What next for preimplantation genetic screening? A clinician’s perspective”**. Human Reprod. 2008; 23 (8): 1686-1690.
- [256] Simpson JL. **“DEBATE-CONTINUED. What next for preimplantation genetic screening? Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient”**. Human Reprod. 2008; 23 (10): 2179-2181.

- [257] Fauser BCJM. **“EDITORIAL COMMENTARY. Preimplantation genetic screening: the end of an affair?”** Human Reprod. 2008; 23 (12): 2622-2625.
- [258] Vanneste E. et al. **“DEBATE. What next for preimplantation genetic screening? High mitotic chromosome instability rate provides the biological basis for the low success rate”.** Human Reprod. 2009; 24 (11): 2679-2682.
- [259] Hernández ER. **“DEBATE CONTINUED. What next for preimplantation genetic screening? Beyond aneuploidy”.** Human Reprod. 2009; 24 (7): 1538-1541.
- [260] Scott RT, et al. **“Prospective, randomized, blinded and paired analysis of 24 chromosome microarray PGD(MPGD) vs 9 chromosome FISH PGD (FPGD) in dispersed cleavage stage human embryos: MPGD has superior consistency”.** Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl.): S306.
- [261] DeUgarte CM, et al. **“Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis”.** Fertil. & Steril. 2008; 90 (4): 1049-1054.
- [262] Obradors A, et al. **“Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report”.** Human Reprod. 2008; 23 (8): 1949-1956.
- [263] Thornhill AR, et al. **“Array CGH for use in clinical preimplantation genetic screening”.** Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl.): S306.
- [264] Levy B, et al. **“The accuracy and consistency of whole genome preimplantation genetic diagnosis (PGD): a comparison of two independent methods- microarray PGD (MPGD) and comparative genomic hybridization (CGH)”.** Fertil. & Steril. 2008; 90 (Suppl.): S305.
- [265] Daphnis DD, et al. **“Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH”.** MHR-Basic Science of Reprod. Medicin. 2008; 14 (2): 117-125.
- [266] Scriven PN, Bossuyt PMM. **“Diagnostic accuracy: theoretical models for preimplantation genetic testing of a single nucleus using the fluorescence in situ hybridization technique”.** Human Reprod. 2010; 25 (10): 2622-2628.
- [267] Fragouli E, et al. **“Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage”.** Human Reprod. 2008; 23 (11): 2596-2608.

- [268] Mir P, et al. **“Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening”**. Human Reprod. 2010; 25 (7): 1812-1817.
- [269] Harper JC, Harton G. **“The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening”**. Fertil. & Steril. 2010; 94 (4): 1173-1177.
- [270] Northrop LE, et al. **“SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts”**. Molecular Human Reprod. 2010; 16 (8): 590-600.
- [271] Devine K, et al. **“Does newly available 24-chromosome (24C) preimplantation genetic screening (PGS) improve IVF outcomes in patients at risk for aneuploidy? First year’s experience at a large, university-based center”**. Fertil. & Steril. 2010; 94 (4): S123.
- [272] Khoury C, et al. **“Preimplantation genetic screening (PGS) with thophoectoderm biopsy (TB) following embryo cleavage biopsy. A case series”**. Fertil. & Steril. 2011; 95 (Suppl. 4): S25-S26.
- [273] Alfarawati S, et al. **“First birth after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis”**. Human Reprod. 2011; 26 (6): 1560-1574.
- [274] Forman EJ, et al. **“Clinical Experience Using SNP-based Comprehensive Screening in Patients with Recurrent Pregnancy Loss”**. Fert. & Steril. 2011; 95 (4) P-25. S17-S18.
- [275] Richards MPM. **“VIEWS & REVIEWS. How do we begin?”** BMJ. 2011; 343: 5580-5581.
- [276] Scriven PN, et al. **“FISH for pre-implantation genetic diagnosis”**. J. of visualized experiments; 2011. DOI: 10.3791/2570.
- [277] Gutiérrez-Mateo C, et al. **“Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos”**. Fertil. & Steril. 2011; 95 (3): 953-958.
- [278] Handyside AH. **“PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: seeing the wood and the trees”**. RBO. 2011; 23: 686-691.
- [279] Vanneste E, et al. **“PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization”**. Human Reprod. 2011; 26 (4): 941-949.

- [280] Bisignano A, et al. **“PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes: advantages and disadvantages of competing platforms”**. RBO. 2011; 23: 677-685.
- [281] Mastenbroek S, et al. **“Preimplantatio genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs”**. Human Reprod. Update. 2011; 17 (4): 454-466.
- [282] Bisignano A, et al. **“Reply: PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: a responsible path towards greater utility”**. RBO. 2012; 24: 4-5.
- [283] Gleicher N, Barad DH. **“A review of, and commentary of, the ongoing second clinical introduction of preimplantation genetic screening (PGS) to routine IVF practice”**. J. Assist. Reprod. Genet. 2012 (29): 1159-1166.
- [284] Scott Jr. RT, et al. **“Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study”**. Fert. & Steril. 2012; 97 (4): 870-875.
- [285] Forman EJ, et al. **“Comprehensive chromosomal screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer”**. Fertil. & Steril. 2013; 100 (3): 718-724.
- [286] Hens K, et al. **“Comprehensive embryo testing. Experts’ opinions regarding future directions: an expert panel study on comprehensive embryo testing”**. Human Reprod. 2013; 28 (5): 1418-1525.
- [287] Meldrum DR. **“Introduction: Preimplantation genetic screening is alive and very well”**. Fertil. Steril. 2013; 100 (3): 593-594.
- [288] Rubio C. **“New insights in aneuploidy screening: old principles, new approaches”**. Fertil. Steril. 2013; 100 (3): 652-653.
- [289] Hou Y, et al. **“Genome Analyses of single human oocytes”**. Cell. 2013; 15: 1492-1506.
- [290] Handyside AH, et al. **“24-chromosome copy number analysis:a comparison of available technologies”**. Fertil. & Steril 2013; 100 (3): 595-602.
- [291] Scott Jr. RT, et al. **“Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases**

- in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial**". *Fertil. & Steril.* 2013; 100 (3): 697-703.
- [292] Rubio C, et al. **"Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials"**. *Fertil. & Steril.* 2013; 99 (5): 1400-1407.
- [293] Keltz MD, et al. **"Preimplantation Genetic Screening (PGS) with Comparative Genomic Hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomeres biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages"**. *J. Assist Reprod. Genet.* 2013; 30: 1333-1339.
- [294] Scott Jr RT. **"Comprehensive chromosome screening with synchronous blastocyst transfer: time for a paradigm shift"**. *Fertil. & Steril.* 2014; 102 (3): 660-661.
- [295] Wells D, et al. **"Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation"**. *J. Med. Genet.* 2014; 51: 553-562.
- [296] Fiorentino F, et al. **"Development and validation of a next generation sequencing-based protocol for 24 chromosome aneuploidy screening of embryos"**. *Fertil. & Steril.* 2014; 101 (5): 1375-1382.e2.
- [297] Natesan SA, et al. **"Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders"**. *RBO.* 2014; 29: 600-605.
- [298] Wells D. **"Next-generation sequencing: the dawn of a new era for preimplantation genetic diagnostics"**. *Fertil. & Steril.* 2014; 101 (5): 1250-1251.
- [299] Gleicher N, et al. **"REVIEW. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review"**. *Reprod. Biology and Endocrinology.* 2014; 12: 22-30.
- [300] Coco R. **"Review Article. Reprogenetics: Preimplantational genetics diagnosis"**. *Gene. And Molec. Biology.* 2014; 37 (Suppl. 1): 271-284.
- [301] Chen CK, et al. **"REVIEW ARTICLE. New perspectives on preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening"**. *Taiwanese J. Obst. & Gynec.* 2014; 53: 146-150.

- [302] Adler A, et al. **“Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophectoderm biopsies”**. RBO. 2014; 28: 485-491.
- [303] Fiorentino F, et al. **“Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles”**. Human Reprod. 2014; 29 (12): 2802-2813.
- [304] Ramasamy R, et al. **“Fluorescent in situ hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications”**. Fertil. & Steril. 2014; 102 (6): 1534-1539.
- [305] Wang L, et al. **“Validation of copy number variation sequencing for detecting chromosome imbalances in human preimplantation embryos”**. Biol. Reprod. 2014; 91 (2): 37, 1-8.
- [306] Fernández SF, et al. **“A 24-chromosome FISH technique in preimplantation genetic diagnosis: validation of the method”**. Syst. Biol. In Reprod. Medicine. 2015; 61 (3): 171-177.
- [307] Lee E, et al. **“The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review”**. Human Reprod. 2015; 30 (2): 473-483.
- [308] Treff NT, et al. **“Methods for comprehensive chromosome screening of oocytes and embryos: capabilities, limitations, and evidence of validity”**. J. Assist. Reprod. Genet. 2012; 29: 381-390.
- [309] Mir P, et al. **“False positive rate of an array CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3”**. J. Assist. Reprod Genet. 2013; 30: 143-149.
- [310] Dimitriadou E, et al. **“Single cell segmental aneuploidy detection is compromised by S phase”**. Molecular Cytogenetics. 2014; 7: 46-55.
- [311] Werner MD, et al. **“Clinically recognizable error rate after the transfer of comprehensive chromosomal screened euploid embryos is low”**. Fertil. & Steril. 2014; 102 (6): 1613-1618.
- [312] De Ryke M, et al. **“ESHRE PDG Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011”**. Human Reprod. 2015; 30 (8): 1763-1789.
- [313] Registro SEF. **“Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de Reproducción Asistida (IA y FIV/ICSI). Año 2013.”**

https://www.registrosef.com/public/Docs/sef2013_IAFIV.pdf

- [314] Fasouliotis SJ, Schenker JG. **“Preimplantation Genetic Diagnosis principles and ethics”**. Human Reprod. 1998; 13 (8): 2238-2245.
- [315] Peyvandi F, et al. **“Prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis: novel technologies and state of the art of PGD in different regions of the world”**. Haemophilia. 2011; 17 (Suppl. 1): 14-17.
- [316] Farra C, et al. **“The utilization of pre-implantation genetic testing in the absence of governance: a real-time experience”**. Clin. Genetics. 2014; 86: 177-180.
- [317] Dietrich K. **“Robert Edwards, joint founder of ESHRE, honoured as Nobel laureate”**. Focus on Reproduction. January 2011: 6-8.
- [318] Dahdouh EM, et al. **“Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials”**. RBO. 2015; 30: 281-289.
- [319] Goldman KN, et al. **“Association of body mass index with embryonic aneuploidy”**. Fertil. & Steril. 2015; 103 (3): 744-748.
- [320] McCoy RC, et al. **“Common variants spanning PK4 are associated with mitotic-origin aneuploidy in human embryos”**. Science. 2015; 348 (6231): 235-238.
- [321] Carbone L, Chavez SL. **“Mammalian pre-implantation chromosomal instability: species comparison, evolutionary considerations, and pathological correlations”**. Syst. Biol. Reprod. Medicine. 2015; published online: 14 sept 2015.