



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
University of Oviedo

## MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

# “Estudios prenatales en pacientes sometidas a Técnicas de Reproducción Asistida en el Hospital Universitario Central de Asturias”

**AUTORA DEL TRABAJO FIN  
DE MÁSTER:**

Ángela M<sup>a</sup> Muñoz Romero

**TUTORAS:**

Vanesa Castañón Bernardo

Mónica Viejo Díaz

**Julio 2020**

## AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizados todos estos meses de esfuerzo y dedicación a este máster, y al presente trabajo, solo me queda agradecer a todas las personas que me han ayudado durante todo este tiempo y han compartido conmigo esta maravillosa e intensa experiencia.

En primer lugar, me gustaría agradecer enormemente a mis tutoras, Vanesa Castañón y Mónica Viejo, por su infinito compromiso con este trabajo, su apoyo, su máxima atención y disponibilidad, y su grandísima ayuda. Todo este proceso ha sido mucho más fácil gracias a ellas y a su esfuerzo. Ha sido un auténtico placer.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a todos los profesores del máster que me han ayudado con sus enseñanzas a superar esta etapa, pero en especial a Elena por su infinita disponibilidad y dedicación ante cualquier problema que pudiese presentarse, por su entrega y paciencia con nosotros, y por ser más que una profesora en muchos momentos, mostrándonos su apoyo para que todo pudiese salir adelante sin problemas pese a todos los obstáculos que pudiesen presentarse.

Por supuesto, me gustaría agradecer a mis compañeros de máster, ya que gracias a ellos mi estancia en Oviedo ha merecido mucho más la pena de lo que pensaba en un principio, superando, sin duda, mis expectativas y haciendo de esta una experiencia increíble e inolvidable. En especial, tengo que agradecer a mis supercompis y amigas, M<sup>a</sup> Angels y Noelia, por todas nuestras quedadas, nuestras noches de OT, nuestras charlas y todo el ánimo que me han brindado siempre.

Y, por último, pero no menos importante, tengo que agradecer a mi familia y amigos por el apoyo incondicional que me han mostrado en todo momento para poder superar cada uno de mis objetivos, y porque sin ellos yo no estaría donde estoy a día de hoy.

## ABREVIATURAS

<b>TRA</b>	Técnicas de Reproducción Asistida
<b>IA</b>	Inseminación Artificial
<b>IAC</b>	Inseminación Artificial de Cónyuge
<b>IAD</b>	Inseminación Artificial de Donante
<b>FIV</b>	Fecundación <i>in vitro</i>
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
<b>DGP</b>	Diagnóstico Genético Preimplantacional
<b>MESA</b>	<i>Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration</i> (Aspiración espermática epididimaria microquirúrgica)
<b>TESE</b>	<i>Testicular Sperm Extraction</i> (Extracción de espermatozoides del testículo por biopsia)
<b>TESA</b>	<i>Testicular Sperm Aspiration</i> (Aspiración percutánea de espermatozoides del testículo)
<b>PESA</b>	<i>Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration</i> (Aspiración espermática epididimaria percutánea)
<b>MDSA</b>	<i>Microsurgical Deferential Sperm Aspiration</i> (Aspiración espermática deferencial microquirúrgica)
<b>DCC</b>	Defectos Cardíacos Congénitos
<b>AZF</b>	Factor de Azoospermia
<b>SBW</b>	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
<b>SA</b>	Síndrome de Angelman
<b>SET</b>	<i>Single Embryo Transfer</i> (Transferencia de un único embrión)
<b>TD</b>	Tasa de detección
<b>TFP</b>	Tasa de falsos positivos
<b>TN</b>	Translucencia Nucal
<b>βhCG</b>	Fracción libre de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana

**PAPP-A** *Pregnancy-Associated Plasma Protein-A* (Proteína A plasmática asociada al embarazo)

**T13** Trisomía 13

**T18** Trisomía 18

**T21** Trisomía 21

**AFP** Alfa-fetoproteína

**uE3** Estriol

**ADN** Ácido Desoxirribonucleico

**ADN-ic** ADN libre circulante

**FF** Fracción Fetal

**TPNI** Test Prenatal No Invasivo

**CIR** Crecimiento Intrauterino Retardado

**BC-TC** Biopsia Corial por vía Transcervical

**BC-TA** Biopsia Corial por vía Transabdominal

**VIH** Virus de Inmunodeficiencia Humana

**PCR** *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

**QF-PCR** *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa fluorescente cuantitativa)

**CGH** *Comparative Genomic Hybridization* (Hibridación genómica comparativa)

**HUCA** Hospital Universitario Central de Asturias

**EOC** Estimulación Ovárica Controlada

**GnRH** *Gonadotropin-Releasing Hormone* (Hormona liberadora de gonadotropinas)

**FSH** *Follicle Stimulating Hormone* (Hormona folículo-estimulante)

**REM** Recuento de Espermatozoides Móviles

**COC** Complejo Cúmulo-Ovocito

**ASEBIR** Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

**TEC** Transferencia de Embriones Criopreservados



Universidad de Oviedo  
Universidá d'Oviéu  
University of Oviedo

## Estudios prenatales en pacientes sometidas a Técnicas de Reproducción Asistida en el Hospital Universitario Central de Asturias

<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solución salina tamponada por fosfatos)
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> (Hibridación fluorescente in situ)
<b>LA</b>	Líquido Amniótico
<b>VC</b>	Vellosidad Corial
<b>STR</b>	<i>Short Tandem Repeat</i> (Repeticiones en tándem cortas)
<b>FDA</b>	Formamida
<b>ADM-2</b>	<i>Aberration Detection Method 2</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
<b>PI</b>	Prueba Invasiva
<b>BOE</b>	Boletín Oficial del Estados
<b>ESHRE</b>	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i> (Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana)
<b>ICMART</b>	<i>International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology</i> (Comité Internacional de Monitoreo de Tecnologías Reproductivas Asistidas)
<b>SIRHA</b>	Sistema de Información de Reproducción Humana Asistida



## RESUMEN

Desde finales del siglo XX, las técnicas de reproducción asistida (TRA) han formado parte de la historia reproductiva de muchas parejas, y gracias a los avances científicos y técnicos, ha sido posible el aumento de las tasas de gestación de nacidos vivos con la utilización de dichas técnicas. En este trabajo, se ha analizado el resultado de los estudios prenatales invasivos realizados a pacientes sometidas a TRA en la Unidad de Reproducción del HUCA para comprobar si las gestaciones concebidas mediante estas técnicas presentan un mayor riesgo que las concebidas espontáneamente. Además, se ha analizado la incidencia de las pruebas invasivas (PI) realizadas a las pacientes sometidas a TRA en el HUCA y a mujeres del resto de la población asturiana para indicar en qué grupo existe una mayor incidencia de PI. De todos los estudios prenatales invasivos realizados, ya sea a pacientes del HUCA o a mujeres que alguna vez acudieron al mismo con la idea de ser madres, en la mayoría de los casos, se obtuvieron unos cariotipos normales (46,XX/46,XY) y un rango de peso normal en todos los recién nacidos. Respecto a la incidencia de PI, los resultados del estudio demostraron una similitud en ambos grupos. El pequeño tamaño de la muestra analizada hace que los resultados no lleguen a ser representativos, y que, por tanto, se necesiten más estudios para conseguir evidencias claras con respecto a los objetivos propuestos en este trabajo. Además, al tratarse de un estudio descriptivo, los resultados pueden estar influenciados por factores ajenos a dichos objetivos.

**Palabras clave:** técnicas de reproducción asistida; pruebas invasivas; gestación; cariotipo.

## ABSTRACT

Since the late twentieth century, assisted reproductive techniques (ART) have been part of the reproductive history of many couples, and thanks to scientific and technical advances, it has been possible to increase gestation rates of live newborns with the use of these techniques. In this work, the results of invasive prenatal studies carried out on patients undergoing ART in the HUCA Reproduction Unit have been analyzed to check whether pregnancies conceived using these techniques present a higher risk than those conceived spontaneously. In addition, the incidence of invasive tests (IT) performed on patients undergoing ART in HUCA and women from the rest of the Asturian population has been analyzed to indicate in which group is there a higher incidence of (IT). On all of the invasive prenatal studies carried out, either in HUCA patients or in women who came to it with the idea of being mothers, normal karyotypes (46,XX/46,XY) and a normal weight range were obtained for all newborns in most cases. Regarding the incidence of IT, the results of the study showed a similarity in both groups. The small size of the analyzed sample means that the results do not become representative, and therefore, more studies are needed to get clear evidence regarding the objectives proposed in this work. Furthermore, being a descriptive study, the results may be influenced by factors unrelated to these objectives.

**Keywords:** assisted reproduction techniques; invasive tests; gestation; karyotype.

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Técnicas de Reproducción Asistida .....	1
1.2 Riesgos perinatales asociados a las Técnicas de Reproducción Asistida .....	4
1.2.1 Riesgo de anomalías congénitas .....	5
1.2.2 Riesgo de anomalías genéticas .....	6
1.2.3 Riesgo de gestaciones múltiples .....	7
1.2.4 Riesgo de parto pretérmino .....	9
1.2.5 Riesgo de aborto .....	10
1.2.6 Riesgo de bajo peso al nacer .....	11
1.2.7 Riesgos a largo plazo .....	11
1.3 Pruebas de diagnóstico prenatal .....	12
1.3.1 Técnicas no invasivas .....	13
1.3.2 Estrategias de cribado prenatal para las trisomías 18 y 21 .....	15
1.3.3 Técnicas invasivas .....	17
1.3.4 Pruebas genéticas diagnósticas .....	19
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1 Tipo de estudio y participantes .....	21
3.2 Criterios de inclusión .....	21
3.3 Criterios de exclusión .....	21
3.4 Protocolos .....	22
3.4.1 Estimulación ovárica controlada y punción folicular .....	22
3.4.2 Inseminación artificial .....	22
3.4.3 Fecundación <i>in vitro</i> / Inyección intracitoplasmática de espermatozoides .....	23
3.4.4 Transferencia embrionaria y criopreservación .....	26
3.4.5 Transferencia de embriones criopreservados (TEC) .....	28
3.4.6 Amniocentesis .....	28
3.4.7 Biopsia corial .....	34
3.4.8 QF-PCR .....	35
3.4.9 Array CGH .....	37





3.5 Análisis estadístico .....	41
4. RESULTADOS .....	41
4.1 Edad media de las pacientes sometidas a estudio .....	41
4.2 Análisis de los ciclos de la Unidad de Reproducción .....	42
4.3 Análisis de los partos registrados en Asturias y en la Unidad de Reproducción.....	44
4.4 Relación entre estudios prenatales invasivos y partos de la Unidad de Reproducción y la población asturiana .....	47
4.5 Análisis de los resultados de los estudios prenatales invasivos .....	49
4.6 Análisis estadístico de los estudios prenatales invasivos entre las pacientes sometidas a TRA y la población general .....	53
5. DISCUSIÓN .....	55
5.1 Edad media de las pacientes sometidas a estudio .....	55
5.2 Análisis de los ciclos de la Unidad de Reproducción .....	56
5.3 Análisis de los partos registrados en Asturias y en la Unidad de Reproducción.....	59
5.4 Análisis de los resultados de los estudios prenatales invasivos .....	60
5.5 Análisis estadístico de los estudios prenatales invasivos entre las pacientes sometidas a TRA y la población general .....	64
5.6 Limitaciones y puntos fuertes del estudio .....	64
6. CONCLUSIONES .....	65
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de un embrión en día +3 según los criterios morfocinéticos de clasificación de ASEBIR (A, B, C y D) .....	26
<b>Figura 2.</b> Partos registrados en Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	44
<b>Figura 3.</b> Partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	45
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de pruebas invasivas realizadas en pacientes sometidas a TRA en la U.R del HUCA en relación con el número total de partos registrados en la misma unidad desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	54
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de pruebas invasivas realizadas en gestantes que concibieron de forma espontánea en relación con el número total de partos registrados en toda la comunidad autónoma de Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Edad media de las pacientes sometidas a TRA en la Unidad de Reproducción del HUCA desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	42
<b>Tabla 2.</b> Ciclos realizados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	43
<b>Tabla 3.</b> Partos registrados en Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	44
<b>Tabla 4.</b> Partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	45
<b>Tabla 5.</b> Estudios prenatales invasivos realizados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	47
<b>Tabla 6.</b> Resultados de estudios prenatales invasivos realizados a pacientes de la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019 ....	49
<b>Tabla 7.</b> Resultados de estudios prenatales invasivos realizados a pacientes que acudieron a la Unidad de Reproducción del HUCA en algún momento desde el año 2014 hasta el año 2019.....	51
<b>Tabla 8.</b> Relación entre el número total de pruebas invasivas y número total de partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA y en toda la comunidad autónoma de Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019 .....	53

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Técnicas de Reproducción Asistida

Desde el nacimiento de Louise Brown, el primer bebé nacido por fecundación *in vitro* en Reino Unido en 1978, las técnicas de reproducción asistida (TRA) han formado parte de la historia reproductiva de muchas parejas (American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Obstetric Practice, 2016). Gracias a los avances científicos y técnicos, ha sido posible el aumento de las tasas de gestación de nacidos vivos con la utilización de dichas técnicas. Más de 200.000 bebés nacen anualmente en todo el mundo por TRA, y se estima que más de 5 millones de niños han sido concebidos mediante los procedimientos de TRA desde el nacimiento de Louise Brown (Hoorsan et al., 2017; Lei et al., 2019).

Las TRA constituyen un conjunto amplio de procedimientos caracterizados por la actuación directa sobre los gametos (ovocitos y espermatozoides) y/o embriones, con el objetivo de favorecer la fecundación y la transferencia de embriones en la cavidad uterina. Una de las clasificaciones de forma generalizada que puede hacerse de las diferentes técnicas de reproducción asistida, de menor a mayor complejidad, engloba a la inseminación artificial (IA), que puede ser conyugal (IAC) o de donante (IAD), y a la fecundación *in vitro* (FIV), por técnica convencional o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Además de estas, también existen otras técnicas como el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), la extracción espermática, la donación de ovocitos y semen, o la preservación de la fertilidad (Sociedad Española de Fertilidad, 2011).

La inseminación artificial (IA) es la técnica más sencilla de las TRA y consiste en depositar los espermatozoides en la cavidad uterina de la mujer por medio del instrumental adecuado para conseguir que el óvulo y el espermatozoide se encuentren en una de las trompas de Falopio, con la cronología adecuada para que la fecundación sea posible. La paciente debe de tener capacidad para ovular de forma espontánea o mediante tratamiento, y al menos una trompa de Falopio permeable. Esta técnica puede llevarse a cabo tanto con semen de cónyuge como con semen de donante (Grupo de interés de ética y buena práctica de la Sociedad Española de Fertilidad, 2016).

La fecundación *in vitro* (FIV) es la técnica más utilizada y conocida dentro del campo de la reproducción asistida, y consiste en obtener los gametos masculinos (espermatozoides) y femeninos (ovocitos) para que la fecundación tenga lugar fuera del organismo de la mujer (*in vitro*) al ponerlos en contacto en el laboratorio (Grupo de interés de ética y buena práctica de la Sociedad Española de Fertilidad, 2016).

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es una variedad de la FIV, que consiste en introducir un espermatozoide en el interior de un ovocito. En dicha técnica se necesita una intervención más directa sobre el proceso de fecundación, ya que, en este caso, no se produce de forma espontánea, como sí ocurre en la FIV. Otra gran diferencia entre la ICSI y la FIV es que en esta última se necesita un ovocito y una gran cantidad de espermatozoides, sin embargo, en la ICSI solo es necesario un único espermatozoide para introducirlo en el óvulo. En ambas técnicas se necesitan unas condiciones y unos medios de cultivo óptimos para facilitar que se lleve a cabo el proceso de fecundación y el posterior desarrollo embrionario (Sociedad Española de Fertilidad, 2011).

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es un conjunto de procedimientos destinados a analizar las características genéticas de los embriones obtenidos, generalmente, mediante ICSI, con el objetivo de seleccionar aquellos embriones genéticamente sanos, que no presenten anomalías estructurales ni mutaciones que conlleven la aparición de enfermedades monogénicas, para su posterior transferencia al útero, y aumentar, de esta forma, la probabilidad de conseguir el nacimiento de un niño sano (Sociedad Española de Fertilidad, 2011; Grupo de interés de ética y buena práctica de la Sociedad Española de Fertilidad, 2016).

La extracción espermática consiste en un procedimiento cuya finalidad es obtener espermatozoides a partir del tejido testicular, del epidídimo o de la vía seminal para la realización de TRA. Las técnicas de extracción más utilizadas son las siguientes: MESA (aspiración espermática epididimaria microquirúrgica); TESE (extracción espermática testicular mediante biopsia); TESA (aspiración espermática testicular mediante punción) y PESA (aspiración espermática epididimaria mediante punción). Además, existen otras técnicas de recuperación de espermatozoides, entre las que se encuentran: MDSA

(aspiración espermática deferencial microquirúrgica) y MICRO-TESE (microdissección TESE) (Brassesko, 2011).

Por otro lado, la donación de ovocitos u ovodonación es un contrato voluntario, gratuito, formal y confidencial concertado entre una mujer que dona sus óvulos (donante) y un centro autorizado, para que los óvulos sean cedidos a otra mujer (receptora) y puedan ser utilizados mediante técnicas de reproducción asistida con el fin de obtener un embarazo (Grupo de interés de ética y buena práctica de la Sociedad Española de Fertilidad, 2016). No obstante, aunque la donación sea altruista, las donantes reciben una cuantía económica en “calidad de compensación” por las posibles complicaciones que pueden darse durante el proceso. Es un proceso al que se puede recurrir en aquellos casos en los que los óvulos de la mujer no presentan la calidad suficiente para lograr un embarazo; se han agotado y, por tanto, no se pueden extraer de la reserva ovárica, o la mujer es portadora de una alteración genética que se asocia con la transmisión de una enfermedad. La donación de ovocitos puede llevarse a cabo por cualquier mujer mayor de 18 años y menor de 35, y una buena salud tanto física como psicológica. En cuanto al número de donaciones que pueden llevarse a cabo, lo que queda establecido es un máximo de 6 recién nacidos vivos procedentes de una misma donante (lo mismo ocurre con la donación de semen). En la actualidad, la identidad de las donantes es anónima, aunque puede solicitarse algún dato que no implique la identificación de la persona, siempre que sea necesario, por cuestiones de salud que puedan poner en riesgo la vida de la gestante o del recién nacido (Brassesko, 2011).

Finalmente, los tratamientos de preservación de la fertilidad tienen como objetivo proporcionar una oportunidad de conseguir un embarazo en un futuro, si la paciente (o el paciente) lo desea o si no recupera la función reproductora, ya que en muchas ocasiones dicha función se recupera y no llega a ser necesario utilizar los gametos preservados. Es importante destacar que estos tratamientos no garantizan la gestación. Esta decisión puede tomarse por numerosas circunstancias, por ejemplo, el diagnóstico de un cáncer, la situación económica, el deseo de postergar la maternidad, etc. Los métodos para llevar a cabo dicha preservación son: la criopreservación de semen y tejido testicular inmaduro, la criopreservación de embriones, y la criopreservación de ovocitos y corteza ovárica (Tarín et al., 2017; Simopoulou et al., 2018).

## 1.2 Riesgos perinatales asociados a las Técnicas de Reproducción Asistida

Después de más de 30 años de uso de las TRA, es sabido que la mayoría de los embarazos llevados a cabo por estas técnicas finalizan con el nacimiento de niños sanos (Vulliemoz et al., 2012). Sin embargo, desde 1987, y aún más con la introducción de la ICSI en 1992, algunos autores han puesto de manifiesto una cierta preocupación por el aumento de complicaciones obstétricas y perinatales asociadas a estos tratamientos, que podrían provocar que los bebés concebidos a través de las TRA tuviesen un mayor riesgo que los concebidos espontáneamente (El-Chaar et al., 2009). Como ejemplo de algunos de los procedimientos realizados durante las TRA, que pueden manifestarse en ese riesgo llegando a afectar a los gametos y/o embriones, aparece el uso de varios fármacos tanto para conseguir la estimulación de la ovulación y la recuperación de ovocitos como para el soporte de la fase lútea. Y además de esto, también habría que añadir la manipulación que se ejerce sobre dichos gametos y/o embriones en técnicas como FIV o ICSI, siendo esta mucho más directa y “agresiva” en la ICSI (Hoorsan et al., 2017).

El origen de estas complicaciones es un tema que aún está por resolver. Los elementos que pueden contribuir a aumentar los defectos congénitos incluyen la edad materna avanzada, la patología subyacente de los propios pacientes infértiles o los procedimientos llevados a cabo en las TRA (manipulación, fármacos, etc.). Recientemente, se ha dirigido la atención hacia errores epigenéticos que podrían ser intrínsecos en la pareja infértil o estimulados como consecuencia del tratamiento de infertilidad en sí. Además, en algunos estudios se descubrió que los medios de cultivo de embriones utilizados en la FIV pueden predisponer al embrión a trastornos de impronta (American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Obstetric Practice, 2016). La clave de esta incertidumbre se debe a la enorme dificultad en la interpretación de los resultados, ya que los grupos control que se emplean para la comparación no son siempre los adecuados. Debido a la imposibilidad ética de llevar a cabo el estudio perfecto (un estudio randomizado con parejas estériles), las estimaciones de los riesgos de todos los estudios realizados son el resultado de la acción conjunta de la infertilidad y del tratamiento. De esta forma, es posible que los embarazos concebidos por TRA en una población con una infertilidad de base, no sean estrictamente comparables con los embarazos conseguidos de forma espontánea en una población “sana”, sino con los

conseguidos espontáneamente por parejas tras un tiempo de esterilidad (Ricciarelli y Fernández-Shaw, s.f.).

### 1.2.1 Riesgo de anomalías congénitas

Entre un 3 y 5 % de los niños nacidos por concepción natural son diagnosticados con una anomalía congénita. Existen estudios que muestran que las TRA pueden aumentar la incidencia de malformaciones congénitas en un 25-40%, provocando, de esta forma, que los niños concebidos por dichas técnicas presenten un mayor riesgo de sufrir una serie de enfermedades (Hoorsan et al., 2017). A pesar de los numerosos estudios realizados sobre este tema, no existe un consenso sobre la cuantificación del riesgo que conllevan las TRA. Algunos estudios analizados concluyen que la ICSI no representa riesgos de malformaciones adicionales a los que pueda conllevar el proceso de FIV, aunque la primera requiera una mayor manipulación de los gametos. Por tanto, no se observan diferencias significativas entre ambas técnicas en referencia al aumento del riesgo de anomalías congénitas. Sin embargo, sí parece haberlas cuando se comparan los resultados obtenidos entre niños nacidos de forma espontánea y niños nacidos mediante TRA, mostrando así un riesgo superior en estos últimos (El-Chaar et al., 2009).

Otros estudios establecen que el riesgo de malformaciones congénitas puede atribuirse, en parte, a la patología subyacente a la infertilidad de la pareja, ya que aquellas que tardan más de un año en concebir de forma espontánea presentan un mayor riesgo que la población general. Por tanto, sigue sin haber evidencia suficiente para afirmar que el aumento del riesgo de malformaciones congénitas en los niños nacidos de técnicas de reproducción asistida se debe a la propia técnica o a la causa de infertilidad/esterilidad, entre otras (Vulliemoz et al., 2012; Ricciarelli y Fernández-Shaw, s.f.).

Las principales anomalías que aparecen son defectos gastrointestinales, cardiovasculares y musculoesqueléticos, aunque también pueden asociarse a hipospadias, defectos genitourinarios, labio leporino, atresia esofágica y atresia anorrectal (von Wolff y Haaf, 2020). Los defectos cardíacos congénitos (DCC) son las formas más comunes de anomalías congénitas, y una causa significativa de mortalidad perinatal. Según el registro de Eurocat, los DCC ocurren en aproximadamente el 0,76% de los nacidos vivos. La Sociedad Europea para la Reproducción y Embriología Humana, y un estudio realizado en 2017, muestran un aumento de hasta un 50% en el riesgo de DCC en los embarazos de



FIV/ICSI en comparación con los concebidos espontáneamente (Hoorsan et al., 2017; Giorgione et al., 2018). Es importante destacar que, aunque el riesgo relativo de anomalías congénitas tras TRA es un 25-40% mayor que en concepciones espontáneas, el riesgo absoluto es muy pequeño, ya que estas anomalías son poco frecuentes. Otra importancia que debe ser mencionada es el hecho de que el riesgo de anomalías congénitas se vincula tanto a embarazos únicos como múltiples, y aunque algunos estudios asocian un mayor riesgo de anomalías a los embarazos múltiples, otros no encuentran diferencias significativas entre ellos (Vulliemoz et al., 2012).

### 1.2.2 Riesgo de anomalías genéticas

En algunos casos, la infertilidad puede deberse a un origen genético y, por tanto, el tratamiento exitoso de las TRA puede facilitar la transmisión intergeneracional de anomalías genéticas. Existe una mayor prevalencia de anomalías cromosómicas estructurales en hombres y mujeres infértiles. En hombres oscila del 0,96% (con normozoospermia) al 13,7% (con azoospermia), siendo las anomalías de cromosomas sexuales y las translocaciones autosómicas las más comunes. En mujeres, la prevalencia de las translocaciones balanceadas autosómicas recíprocas oscila entre el 1,14% y 1,92%, y son más frecuentes (3,25%) en mujeres que han presentado al menos un aborto (en la población general este porcentaje se encuentra entre el 0,16% y 0,85%). Sin embargo, la detección de estas anomalías puede llevarse a cabo mediante la realización de un cariotipo en hombres que presentan azoospermia u oligozoospermia severa, y en parejas con fallos de implantación o abortos en repetición. Además, la transmisión de dichas anomalías podría evitarse con la utilización del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) (Ricciarelli y Fernández-Shaw, s.f.).

Las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y (Yq), en concreto la región AZF, pueden causar oligozoospermia y azoospermia, pudiendo llegar a aparecer hasta en un 6% de los hombres con oligozoospermia severa. En el caso de hombres normozoospermicos, estas solo se encuentran presentes en un 0,3%. De esta forma, los hijos concebidos de hombres oligozoospermicos con microdeleciones Yq heredarán este fenotipo, pudiendo producirse otras deleciones “de novo” que resulten en un fenotipo más perjudicial en la descendencia (von Wolff y Haaf, 2020).



Se ha demostrado un incremento significativo en el riesgo de anomalías cromosómicas en niños concebidos mediante FIV/ICSI (1,4% - 3,55%) comparado con los estimados de la población general (0,3% - 0,4%). Este incremento parece ser debido a la patología subyacente en el hombre, y no a la técnica en sí, ya que cuando los resultados proceden de niños nacidos por estas TRA de parejas infértiles sin factor masculino, el riesgo de padecer anomalías cromosómicas disminuye a valores próximos a los encontrados tras gestaciones espontáneas (Giorgione et al., 2018). Además de esto, también es posible que la estimulación ovárica y las condiciones de cultivo puedan inducir cambios epigenéticos, que provocan modificaciones en la impronta genómica a largo plazo, contribuyendo así a un desarrollo anormal de los embriones. Existen algunas enfermedades epigenéticas que han sido asociadas a las TRA, como son el S. de Beckwith-Wiedemann (SBW), el S. de Angelman (SA) y el S. de hipometilación maternal (Cortessis et al., 2018). Es importante mencionar que la incidencia general de estas afecciones es muy baja (<1/12000 nacimientos presentan S. de hipometilación maternal; 1/13700 SBW, y 1/16000 SA) y, en consecuencia, no está recomendado el screening prenatal en estos casos (Vulliemoz et al., 2012). Según los resultados obtenidos de varios estudios, se observó una importante hipometilación en el gen H19, así como la hipermetilación de otros dos genes en el semen de hombres con infertilidad idiopática en comparación con los controles de pacientes fértiles. Además, se encontró también una hipometilación del gen H19 en las placentas de los niños concebidos mediante FIV/ICSI. Parece que la placenta es más susceptible a la inducción de anomalías epigenéticas por factores parentales y ambientales en comparación con el embrión/feto. En el metiloma placentario, se demostraron diferencias significativas entre las gestaciones concebidas de forma espontánea y las concebidas tras TRA, en numerosos genes relevantes para el desarrollo embrionario. A pesar de esto, y como consecuencia del número limitado de estudios, sigue sin haber un consenso sobre los posibles efectos epigenéticos relacionados con la metilación de genes y los efectos asociados con la estimulación hormonal (von Wolff y Haaf, 2020).

### 1.2.3 Riesgo de gestaciones múltiples

Se estima que aproximadamente un 20% de las gestaciones múltiples se producen de forma espontánea, un 40% se deben al tratamiento de estimulación de la ovulación, y el otro 40% al uso de las TRA. Los riesgos se incrementan de manera desproporcionada

en relación al número de fetos, y la monocigidad también se relaciona con tasas más altas de resultados adversos. La incidencia de gemelos monocigóticos se duplica cuando se realizan tratamientos de reproducción asistida en comparación con la concepción natural, aunque dicha incidencia sigue siendo muy baja tras la realización de TRA (Vulliemoz et al., 2012).

Las complicaciones maternas más importantes asociadas a la gestación múltiple son la diabetes gestacional, el parto prematuro y la preeclamsia, y respecto a las complicaciones que pueden afectar al feto, las más frecuentes son el retraso en el crecimiento y la asincronía en el desarrollo del mismo (El-Chaar et al., 2009). La muerte de uno o más fetos puede producirse hasta en un 25% de las gestaciones múltiples tras TRA en el primer trimestre del embarazo, aunque esto no significa que tenga que afectar a la supervivencia del otro feto o a la madre (Hoorsan et al., 2017).

Como es sabido, a mayor número de fetos, mayor riesgo materno-fetal durante la gestación. Por tanto, en un intento de favorecer la evolución del embarazo, se puede recurrir a la reducción embrionaria, teniendo en cuenta que se acompaña de un alto riesgo de aborto y parto pretérmino, sin olvidar el dilema ético que se plantea en numerosas ocasiones, y los problemas psicológicos y sociológicos que conlleva su realización. (El-Chaar et al., 2009). Es una técnica muy poco frecuente en la práctica clínica, ya que siempre se pretende evitar la gestación múltiple, y es labor del equipo médico intentar llevarlo a cabo, aunque ello conlleve un descenso en las tasas de gestación, a pesar de la presión por parte de la pareja por conseguir el embarazo lo antes posible. Es muy importante destacar el hecho de que no se trata de una técnica de elección, sino de la última alternativa a seguir (Muñoz, 2012).

Uno de los métodos para limitar las gestaciones múltiples es el uso de protocolos de estimulación en dosis bajas cuando se lleva a cabo una IA. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que limitar la transferencia a un embrión por ciclo (FIV/ICSI) es la estrategia más eficaz para evitar estos embarazos múltiples, y minimizar así los riesgos de prematuridad y sus complicaciones asociadas (von Wolff y Haaf, 2020). Además, también quedan demostradas las altas tasas de embarazo con la SET (Single Embryo Transfer). Es importante aclarar que estas tasas de embarazo son elevadas porque se trata de tasas acumuladas (Lei et al., 2019).

Por tanto, la técnica de reducción embrionaria solo debería practicarse cuando no quedara ninguna oportunidad de que se produjera una reabsorción espontánea del embrión. Esto llega a ocurrir entre el 16 y 43% de los casos de gestación múltiple, aunque es controvertido afirmar cuándo ocurre la reabsorción espontánea, ya que hay estudios que muestran que dicha reabsorción ocurre entre la 9ª y la 12ª semana, y otros que afirman que el 90% de ellas tienen lugar antes de la 7ª semana y nunca después de la 13ª. El momento óptimo para realizar esta técnica queda comprendido entre la semana 8 y 9 de gestación, ya que realizarla más tarde supondría mayores dificultades técnicas, e incrementaría el tiempo de cirugía. La reducción embrionaria es una alternativa generalmente aceptada en gestaciones cuádruples, pero la controversia sigue estando presente en gestaciones triples, a pesar de que las cifras de mortalidad perinatal se encuentren entre el 5 y el 20%, ya que existen estudios que muestran una tasa de prematuridad menor en gestaciones triples reducidas, sin embargo, la tasa de aborto es mayor (Muñoz, 2012; von Wolff y Haaf, 2020).

#### 1.2.4. Riesgo de parto pretérmino

Los niños concebidos mediante TRA presentan una mayor probabilidad de ser prematuros, y esto podría atribuirse a la alta tasa de embarazo múltiple asociada a dichas técnicas, como se ha mencionado anteriormente (Würfel et al., 1992; Takyi y Santolaya-Forgas, 2017). Numerosos estudios y metaanálisis afirman que el riesgo relativo de parto pretérmino se duplica tras tratamientos de reproducción asistida al compararlo con las gestaciones concebidas de forma natural, y, además, existe un aumento adicional y estadísticamente significativo en el riesgo de parto prematuro en gemelos tras FIV en comparación con gemelos concebidos de forma espontánea (El-Chaar et al., 2009; von Wolff y Haaf, 2020).

Tras la estimulación de la ovulación con gonadotropinas se produce un aumento en los niveles de relaxina producido por los cuerpos lúteos, que permanece durante todo el embarazo. Este incremento puede provocar cambios en el cérvix de forma prematura, y, en consecuencia, puede dar lugar a un parto prematuro. Por tanto, aunque la infertilidad por sí misma puede elevar el riesgo de parto pretérmino, es el uso previo de gonadotropinas el mayor responsable del incremento de dicho riesgo, y es por esto, por lo que todas las gestaciones llevadas a cabo tras ciclos estimulados con gonadotropinas

pueden presentar una mayor probabilidad de parto prematuro (Hoorsan et al., 2017). Otras causas que se asocian con el aumento del riesgo de prematuridad son: el factor iatrogénico, la pérdida fetal temprana en una gestación múltiple, y la utilización de ovocitos de donante en TRA (Vulliemoz et al., 2012). En referencia a esto último, un estudio realizado en China demostró que las pacientes que se sometieron a FIV con ovocitos de donante presentaban un mayor riesgo de parto prematuro junto con otros resultados perinatales adversos (Moreno-Sepulveda y Checa, 2019).

### 1.2.5 Riesgo de aborto

La incidencia de aborto en las gestaciones concebidas de forma espontánea durante el primer trimestre de embarazo, se estima entre un 10-20%. Dicha incidencia depende, tanto en los embarazos espontáneos como en los realizados mediante TRA, del periodo de gestación y de la edad materna, cuyo aumento tiene un efecto negativo sobre los ovocitos, y en menor medida, sobre la receptividad del útero (Ricciarelli y Fernández-Shaw, s.f.).

A pesar de la existencia de diversos estudios en los que se afirma que el riesgo de aborto es mayor en los embarazos de TRA que en los naturales, los resultados son contradictorios (American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Obstetric Practice, 2016). Mientras que en algunos estudios se afirma que dichos embarazos tienen un aumento notablemente significativo en el riesgo de aborto, y es la TRA la responsable de este aumento (Helmerhorst et al., 2004; Wisborg et al., 2010), en otros no se encuentran diferencias significativas, y defienden que el riesgo es mayor en pacientes infértiles, con o sin tratamiento, que en parejas sin problemas de infertilidad (Basso y Olsen, 2005; Jaques et al., 2010). Sin embargo, todos ellos sí parecen coincidir en el hecho de que no hay diferencias en la técnica de reproducción asistida utilizada (FIV o ICSI) (Ricciarelli y Fernández-Shaw, s.f.).

Varios estudios establecen una relación entre la infertilidad y un incremento en las tasas de aborto, siendo los grupos de mayor riesgo las mujeres que han sufrido abortos espontáneos previos, las que presentan síndrome de ovario poliquístico, y aquellas que llegan a desarrollar síndromes de hiperestimulación ovárica (Vulliemoz et al., 2012).

### 1.2.6 Riesgo de bajo peso al nacer

Aunque la prematuridad debido al embarazo múltiple es un claro factor de riesgo de bajo peso al nacer (<2500g), muy bajo peso (<1500g) y extremado bajo peso (<1000g), los embarazos únicos concebidos tras TRA siguen demostrando un mayor riesgo de bajo peso al nacer en comparación con los embarazos únicos concebidos de forma natural (von Wolff y Haaf, 2020). De acuerdo con los resultados obtenidos en diferentes estudios, este riesgo puede ser de dos hasta cuatro veces mayor en embarazos únicos tras TRA, y de cinco hasta siete veces mayor en gestaciones múltiples (Takyi y Santolaya-Forgas, 2017).

La prematuridad parece no ser el único factor responsable del bajo peso de los recién nacidos derivados de TRA, ya que el riesgo relativo de que los bebés sean pequeños para la edad gestacional también aumenta en, aproximadamente, un 40-60%, lo que sugiere que existen otros factores que influyen en este riesgo, como pueden ser: la causa de la infertilidad en la madre y el padre, el ciclo de tratamiento, y el medio de cultivo utilizado (Vulliemoz et al., 2012). Varios estudios realizados afirman que el riesgo de bajo peso al nacer disminuye con la transferencia de un único embrión (Hoorsan et al., 2017; von Wolff y Haaf, 2020).

### 1.2.7 Riesgos a largo plazo

El desarrollo físico y psicológico de los niños nacidos mediante TRA es, sin duda, uno de los aspectos más importantes a discutir sobre los posibles efectos adversos de estos tratamientos. En general, los resultados neuromotores, cognitivos, de lenguaje y de comportamiento en niños nacidos después de FIV o ICSI (embarazos únicos o gemelares) parecen ser similares a los niños concebidos naturalmente (Rumbold et al., 2017). Con respecto al crecimiento de los niños, parece haber poco impacto a los 12 años (Basatemur et al., 2010). Esta afirmación concuerda con la hipótesis de Barker, la cual predice que las condiciones prenatales adversas pueden tener consecuencias a largo plazo en los adultos (Vulliemoz et al., 2012).

La desnutrición durante el embarazo se asocia con un mayor riesgo de enfermedad coronaria, diabetes tipo II, parálisis cerebral e hipertensión. Por tanto, es legítimo cuestionar si las TRA podrían estar asociadas con trastornos cardiometabólicos en la edad adulta o incluso durante la adolescencia (Hoorsan et al., 2017). En un metaanálisis de 19 estudios en los que se compararon 2112 niños concebidos tras FIV con 4096 niños

concebidos naturalmente, se encontró que la presión arterial sistólica y diastólica de la descendencia de FIV aumentó, así como el grosor de los vasos sanguíneos (Guo et al., 2017). Para evaluar el metabolismo de la glucosa, se compararon 7 estudios que incluyeron 477 niños de FIV con 1852 niños concebidos espontáneamente. En este caso, aunque los niveles de insulina en ayunas de los niños concebidos tras FIV aumentaron significativamente, no se encontraron diferencias significativas para los niveles de glucosa en ayunas. En general, solo se mostró una tendencia hacia un metabolismo anormal de la glucosa (von Wolff y Haaf, 2020).

Por otro lado, respecto al metabolismo de los lípidos, no se observa ninguna evidencia concluyente de un incremento en el peso al nacer o anomalías relevantes en dicho metabolismo (von Wolff y Haaf, 2020). En otra revisión sistemática que incluye 22 estudios sobre el desarrollo cognitivo de niños concebidos mediante ICSI, se determina un mayor riesgo de deterioro cognitivo en estos comparados con los niños concebidos de manera espontánea (Catford et al., 2017; Rumbold et al., 2017).

### 1.3 Pruebas de diagnóstico prenatal

Los embriones humanos están predispuestos a presentar anomalías cromosómicas que pueden ser el resultado de una no disyunción cromosómica dependiente de la edad materna, o puede deberse a errores aleatorios meióticos o mitóticos tempranos no relacionados con la edad. Las anomalías cromosómicas son responsables de una proporción significativa de fallos en el embarazo y malos resultados reproductivos, incluida la pérdida gestacional temprana tanto en embarazos concebidos naturalmente como en aquellos concebidos mediante TRA (Arian et al., 2020). El término “diagnóstico prenatal” hace referencia a todas las acciones diagnósticas destinadas a descubrir durante el embarazo dichas anomalías cromosómicas que puede presentar el feto al nacer (Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2013). La detección prenatal de las anomalías genéticas, capaces de provocar diversas discapacidades en el individuo, es uno de los grandes retos de la medicina y ciencia actual. Este diagnóstico prenatal requiere la obtención de material genético a partir de una técnica invasiva, ya sea una biopsia corial o una amniocentesis. Ambas pruebas no son inocuas y, por tanto, llevan asociado un riesgo de pérdida gestacional. El coste ético y económico, así como la baja rentabilidad diagnóstica si se realizaran a todas las gestantes, hace que no cumplan los

criterios para que dichas pruebas sean recomendadas de forma indiscriminada a toda la población. Es por esto, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias de cribado (o screening) mediante pruebas inocuas y relativamente fáciles de realizar, con las que poder identificar a las gestantes con fetos que presentan un alto riesgo de tener alguna anomalía genética. Es a este grupo al que se le recomiendan las diferentes pruebas diagnósticas, siendo fundamental la opinión de ambos progenitores para tomar una decisión. Dichas pruebas inocuas se caracterizan por llevar a cabo tanto el análisis de marcadores ecográficos del feto como el de marcadores bioquímicos de la sangre materna, que pueden estar alterados en caso de presentar una alteración fetal (Arian et al., 2020).

Dentro del cribado prenatal de alteraciones cromosómicas fetales, es conveniente distinguir las aneuploidías fetales más comunes, entre las que se encuentran las trisomías de los cromosomas 21, 18 y 13. La trisomía 21 o síndrome de Down ha sido uno de los principales objetivos por tratarse de la aneuploidía más frecuente en recién nacidos, y la causa más frecuente de retraso mental severo. Actualmente, se observa un aumento de su prevalencia debido, principalmente, al incremento de la edad materna (Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2013). Antes de la incorporación del screening o cribado de aneuploidías, una de las indicaciones para realizar una prueba invasiva era la edad de la paciente, sin embargo, en la actualidad, esta se realiza valorando el riesgo, independientemente de la edad (Würfel et al., 1992; Arian et al., 2020).

Para que pueda aceptarse un cribado poblacional, este debe presentar, como mínimo, una tasa de detección (TD) del 75% y una tasa de falsos positivos (TFP) no superior al 5%. Actualmente, no existe un programa de cribado de anomalías genéticas establecido a nivel nacional, y respecto al nivel autonómico, es muy dispar, ya que presenta diferentes tipos de cribados y pruebas diagnósticas ofertadas, y escasos controles de calidad de dichos programas, llegando incluso a ser inexistentes en muchos casos (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018b).

### 1.3.1 Técnicas no invasivas

- *Marcadores ecográficos*

El marcador ecográfico por excelencia es, sin duda, la translucencia nucal (TN) o grosor de la zona econegativa de la nuca del feto. El aumento del grosor de la TN, medida entre las semanas 11 y 14, se correlaciona con la presencia de aneuploidías,



principalmente, con la trisomía 21 y la monosomía X (Síndrome de Turner) (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018b). La mayor TD se alcanza cuando se realiza en la semana 11, sin embargo, es a partir de la semana 12 cuando es posible una evaluación con un mejor rendimiento de otros marcadores ecográficos y una buena exploración de la anatomía del feto, por lo que esta semana es la más recomendada para llevar a cabo la medida de la TN. La TN es una técnica no invasiva, por lo que no lleva asociado un riesgo de pérdida gestacional. Además, es el marcador ecográfico que presenta una mayor efectividad y, por tanto, la ecografía del primer trimestre presenta un papel muy importante en el diagnóstico prenatal de las aneuploidías. Se recomienda que dicha ecografía incluya una primera valoración morfológica del embrión de cabeza, tronco y extremidades (Cavoretto et al., 2017). Aquellas gestaciones con una TN superior al percentil 99 o superior a 3,5 mm que presentan un cariotipo normal, son susceptibles de la realización de una ecografía morfológica que incluya una valoración cardiaca y un estudio de citogenética molecular (array CGH) (Suela et al., 2017).

- *Marcadores bioquímicos*

Los marcadores bioquímicos hacen referencia a proteínas detectadas en la sangre materna, y su incremento o descenso se correlaciona con las anomalías fetales, especialmente con la trisomía 21. Según la edad gestacional en la que presentan una mejor TD, se distinguen, por un lado, los marcadores bioquímicos del primer trimestre y, por otro lado, los del segundo trimestre (Cavoretto et al., 2017). Dentro de los marcadores del primer trimestre se encuentran la fracción  $\beta$  libre de la gonadotropina coriónica ( $\beta$ -hCG), que está elevada en la trisomía 21, y la proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A), que aparece disminuida en la trisomía 21. Y finalmente, como marcadores bioquímicos del segundo trimestre aparecen: la alfafetoproteína (AFP) y el estriol (uE3), ambos disminuidos en la trisomía 21, y la inhibina A, que se encuentra elevada (Caliskan et al., 2020).

La determinación en sangre materna de  $\beta$ -hCG y PAPP-A se trata de una técnica mínimamente invasiva, ya que solo requiere una extracción de sangre, y se puede realizar entre la semana 9 y 13. Sin embargo, la mayor TD mediante estos marcadores bioquímicos se consigue entre las semanas 9 y 11, siendo menor en la semana 13, al igual que ocurre con la TN (Cavoretto et al., 2017).



- *Test de ADN libre circulante*

En los últimos años, el análisis del ADN libre circulante (ADN-lc) en la sangre materna se ha incorporado como un nuevo método de cribado de aneuploidías fetales, incrementándose, de esta forma, la TD de la trisomía 21 por encima del 99%, y disminuyéndose la TFP por debajo del 0,1%. Esta técnica no invasiva también analiza los cromosomas 18 y 13 con una TD del 98% (Arian et al., 2020). El test de ADN-lc se basa en analizar el ADN libre circulante en el plasma materno del que, aproximadamente, un 10% es de origen placentario (el 90% procede de células maternas), y su realización no se recomienda antes de la semana 10, aunque no se ha establecido un límite superior (Gray y Wilkins-Haug, 2018; Wang et al., 2020).

Para calcular el riesgo final se tienen en cuenta tanto la edad materna como la edad gestacional, así como las características de la gestante y del embarazo. El rendimiento de este test depende de la proporción de ADN placentario (fracción fetal o FF), de forma que cuanto mayor sea esta, mayor va a ser el rendimiento. La FF es, por tanto, el factor principal determinante de la precisión del test, y debe ser como mínimo del 4% para que se pueda conseguir un resultado fiable (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018b; Arian et al., 2020). Es importante mencionar que los altos riesgos de este análisis requieren confirmación con una técnica invasiva (amniocentesis o biopsia corial), ya que el origen del ADN fetal circulante en el plasma materno no es realmente fetal sino placentario y, por tanto, este test no es diagnóstico (Wang et al., 2020). Respecto a los resultados negativos, estos no excluyen al 100%. También cabe destacar el hecho de que, aunque el análisis del ADN-lc es un buen método de cribado para la trisomía 21, la ecografía de la semana 12 muestra una información más amplia, por lo que es insustituible como parte del control de la gestación. Además, este test no detecta mosaicos ni trisomías parciales, y tampoco proporciona información sobre defectos de crecimiento (Galeva et al., 2019).

### 1.3.2 Estrategias de cribado prenatal para las trisomías 18 y 21

- *Cribado ecográfico del primer trimestre*: se basa en el valor de la TN. Presenta una tasa de detección del 60-65% y una TFP del 5%.

- *Cribado combinado del primer trimestre*: se trata de una combinación entre la TN como marcador ecográfico, y la  $\beta$ -hCG y la PAPP-A como marcadores bioquímicos. La TD es superior al 90% y la TFP próxima al 3%.
- *Cribado bioquímico del segundo trimestre a partir del test doble*: se analizan, únicamente, la  $\beta$ -hCG y la PAPP-A como marcadores bioquímicos, sin tener en cuenta ningún marcador ecográfico. La TD de este cribado se encuentra cerca del 60%, obteniendo un 5% como TFP.
- *Cribado bioquímico del segundo trimestre mediante el test triple*: en este caso, solo se cuantifican tres marcadores bioquímicos (AFP,  $\beta$ -hCG libre y uE3). No se analiza ningún marcador ecográfico. Su TD es del 60% y su TFP llega hasta el 5%.
- *Cribado bioquímico del segundo trimestre a partir del test cuádruple*: se analizan cuatro marcadores bioquímicos (AFP,  $\beta$ -hCG libre, uE3 e inhibina A), sin tener en cuenta ningún marcador ecográfico. En este caso, tanto la TD como la TFP coinciden con los valores del *cribado bioquímico del segundo trimestre mediante test doble* (TD superior al 75% y TFP inferior al 3%).
- *Cribado integrado*: se combinan marcadores bioquímicos y ecográficos del primer trimestre (TN y PAPP-A) con marcadores bioquímicos del segundo trimestre (todos los analizados en el test cuádruple).

Como se mencionó anteriormente, no existe un programa de cribado de anomalías cromosómicas establecido a nivel nacional, sin embargo, la estrategia de cribado más adecuada, y que se ha consolidado en, prácticamente, todas las comunidades autónomas tanto en el ámbito privado como en el público, es el *cribado combinado del primer trimestre* (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018b). Este método es el más completo y utilizado para la detección temprana de anomalías cromosómicas en el primer trimestre del embarazo. Las valoraciones de los diferentes marcadores ecográficos y bioquímicos se deben combinar con la edad materna para estimar el riesgo fetal de las trisomías 21 y 18 (Galeva et al., 2019). Las variables de la prueba de detección deben ajustarse con factores que pueden modificar los marcadores bioquímicos para mejorar la precisión. Dentro de estos factores se encuentran: características del embarazo y maternas, edad gestacional, peso materno, origen étnico, hábito de fumar, diabetes mellitus y el método de concepción. El mejor rendimiento de este cribado se obtiene cuando el análisis de los marcadores bioquímicos ( $\beta$ -hCG libre y la PAPP-A) se realiza

entre la semana 9 y 11 de gestación, y la medición de la TN entre la semana 11 y 12. Sin embargo, también puede llevarse a cabo en un solo tiempo, realizando la valoración ecográfica y bioquímica el mismo día (Arian et al., 2020).

Actualmente, se lleva a cabo en muchas comunidades autónomas un cribado denominado *cribado de contingencia*, donde a las gestantes con un alto riesgo en el cribado combinado de primer trimestre se les realiza un test prenatal no invasivo (TPNI), para que solo aquellas que presenten un riesgo en TPNI se sometan a la técnica invasiva, siempre y cuando el feto no presente ninguna malformación ni el riesgo sea superior al 1/50, o la TN se encuentre por encima del percentil 99 (Sánchez-Durán et al., 2019; Wang et al., 2020).

### 1.3.3 Técnicas invasivas

- Amniocentesis

La amniocentesis ha sido un método convencional para obtener información genética fetal desde finales de los años sesenta. Consiste en la punción de la cavidad amniótica por vía abdominal para conseguir una muestra de líquido amniótico (Daum et al., 2019). La realización de esta técnica debe llevarse a cabo a partir de la semana 16, no antes de la semana 15, ya que el corion no está fusionado con el amnios y, por tanto, se hace más difícil la llegada a la cavidad amniótica y, además, se asocia con un riesgo tres veces mayor de pérdida gestacional y una mayor frecuencia de anomalías músculo-esqueléticas (Würfel et al., 1992; Jummaat et al., 2019). Esta técnica invasiva presenta una tasa de éxito muy próxima al 100%, siempre y cuando se realice por un experto, y una tasa de pérdida fetal inferior al 1%. Además, son muy inusuales los fallos de cultivo (< 1%) y de contaminación materna, y presenta una tasa de mosaicismo inferior a la que pueda obtenerse con la biopsia corial (Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2013).

Varios estudios hacen mención al término de “amniocentesis tardía” cuando el procedimiento se realiza a partir de la semana 24. La probabilidad de que aparezcan hallazgos ecográficos anormales después de una exploración realizada antes de la semana 24, se encuentra entre un 6 y un 17%. Según un estudio, estos hallazgos ecográficos anormales hacen referencia a defectos cardiovasculares y anomalías cerebrales, como ventriculomegalia, agenesia de cuerpo calloso, comunicación interventricular,

microcefalia, tetralogía de Fallot, crecimiento intrauterino retardado (CIR), hernia diafragmática, etc. Este mismo estudio demuestra que la amniocentesis tardía puede ser una herramienta útil y segura para detectar anomalías fetales de aparición tardía, pero también presenta efectos adversos como el parto prematuro y la muerte fetal intrauterina (Daum et al., 2019).

Las indicaciones para la realización de la amniocentesis son las siguientes: riesgo igual o superior a 1/250 para trisomía 21 o 18 por test combinado o cribado bioquímico, o riesgo superior a 1/50 si se realiza test de ADN-1c; anomalía cromosómica parental; anomalía fetal ecográfica; resultado positivo de ADN-1c; resultado no concluyente de biopsia corial, y anomalía discordante en gemelos monocoriales diamnióticos (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018b; Galeva et al., 2019).

- *Biopsia corial*

Se basa en la extracción de una muestra de trofoblasto por vía transcervical (BC-TC) o vía transabdominal (BC-TA). El riesgo de pérdida fetal de esta técnica invasiva es de 0,1% en BC-TC y 0,2% en BC-TA, y la tasa de éxito es de un 99% para ambas extracciones. Sin embargo, en ese 1% de los casos restantes en los que pueden obtenerse resultados no concluyentes debido a la sospecha de un mosaicismo, contaminación materna o fallo en el cultivo, es preciso recurrir a la realización de otra técnica invasiva (amniocentesis) (Würfel et al., 1992). En caso de sospecha de un mosaicismo, como ocurre en el caso de una trisomía 18 sin alteraciones ecográficas, debe recomendarse realizar una amniocentesis para su confirmación, ya que esta proporciona información del cariotipo real del feto. Sin embargo, si se requiere un estudio molecular (descartar la presencia de una mutación patogénica), es preferible la realización de una biopsia corial en lugar de una amniocentesis, ya que proporciona una cantidad de ADN mayor y de muy buena calidad (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018b). No se recomienda la realización de la biopsia corial antes de la semana 10, puesto que este método se asocia a defectos fetales en las extremidades (reducción de los miembros inferiores) y síndromes oromandibulares (micrognatia y microglosia). Además, tampoco debe realizarse en el caso de que exista un sangrado vaginal o una infección materna por VIH, hepatitis B o hepatitis C (Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2013).

Dentro de las indicaciones para la realización de la biosia corial se encuentran: alto riesgo de aneuploidía en el cribado del primer trimestre ( $> 1/250$  o  $> 1/50$  si se realiza el test de ADN-1c); TN superior a percentil 99; anomalía cromosómica parental; estudio molecular de enfermedad genética estudiada previamente y conocida la mutación causal; anomalía estructural fetal detectada en la ecografía del primer trimestre; pérdida gestacional precoz en gestaciones por encima de la semana 10 de embarazo, y resultado positivo en el test de ADN-1c (Galeva et al., 2019).

#### 1.3.4 Pruebas genéticas diagnósticas

Las pruebas diagnósticas que pueden llevarse a cabo se dividen en dos grandes grupos: el estudio clásico citogenético (cariotipo) y las pruebas de citogenética molecular (QF-PCR y array CGH).

El *cariotipo* es una prueba considerada como el “gold standard”, ya que permite hallar cambios en el número y/o en la estructura de los cromosomas. De esta forma, es capaz de detectar tanto alteraciones desequilibradas (deleciones o duplicaciones) como equilibradas (inversiones o translocaciones equilibradas). Una de las ventajas que presenta el cariotipo frente a las pruebas de citogenética molecular es su capacidad para mostrar la localización del material genético del genoma completo. Sin embargo, es una prueba altamente dependiente del cultivo y, además, en caso de muestras procedentes de pérdidas fetales, presenta un alto riesgo de contaminación, siendo este muy poco frecuente en muestras de líquido amniótico. Otras de las limitaciones que presenta es su lentitud en muestras de vellosidad corial, pudiendo llegar incluso a no llevarse a cabo, y su resolución, detectando alteraciones por encima de 5 o 10 millones de pares de bases (Mb) (Arian et al., 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, una de las pruebas de citogenética molecular que puede realizarse es la *QF-PCR* (Quantitative Fluorescent PCR), aplicando el estudio de microsatélites. Esta prueba permite el diagnóstico de las aneuploidías más frecuentes, incluyendo la monosomía X y las triploidías, sin necesidad de cultivar las muestras, y de una forma rápida y barata, pero, generalmente, se combina con un cultivo a largo plazo y el cariotipo convencional (Allen et al., 2006; Mann y Ogilvie, 2012). Una de sus limitaciones es su capacidad de detectar, únicamente, las alteraciones de los cromosomas estudiados, no llegando a conocer el tipo de trisomía, y si es libre o no,

siendo fundamental el conocimiento de su origen para un adecuado asesoramiento genético a la paciente o pareja. De ahí, la importancia de realizar al mismo tiempo el cultivo para llevar a cabo el estudio citogenético (Shin et al., 2016).

Otra de las pruebas genéticas que ha ganado importancia en los últimos años, gracias al avance de las tecnologías, es el *microarray o array CGH* (array de hibridación genómica comparativa), también denominado cariotipo molecular. Esta prueba permite llevar a cabo el análisis molecular y la identificación de pequeñas pérdidas o ganancias de todo el material genético, proporcionando una información más detallada sobre el feto en comparación con el cariotipo, y presentando una mayor resolución, por lo que hace que tenga una mayor capacidad diagnóstica (Liu et al., 2012; Suela et al., 2017). Otra de las ventajas que presenta es que no precisa de un cultivo de la muestra, y los resultados pueden estar disponibles entre 5 y 12 días (Arian et al., 2020). Todo esto queda demostrado en el estudio mencionado con anterioridad sobre la amniocentesis tardía, en el cual se muestra que en aquellas gestantes en las que se realiza dicha amniocentesis a partir de la semana 24, el uso de array CGH como prueba genética aumenta las tasas de detección de anomalías fetales y presenta un tiempo de respuesta más corto (12 días) en comparación con el análisis clásico citogenético (cariotipo) (Daum et al., 2019).

Una de las limitaciones de esta prueba diagnóstica es su incapacidad para detectar reordenamientos equilibrados (translocaciones e inversiones) y mosaicismos de bajo grado (el porcentaje de mosaicismo es inferior al 10-20%). Tampoco permite hallar la localización de la alteración, y es por esto, por lo que es necesario combinar esta prueba con el cariotipo para poder proporcionar un adecuado asesoramiento genético a la pareja (Suela et al., 2017). El coste, la falta de disponibilidad en muchos centros y la probabilidad de encontrar VOUS (alteración no identificada previamente en la población de pacientes sanos de un laboratorio que da lugar a un resultado incierto), cuya interpretación puede generar incertidumbre en la gestante si se decide comunicarlo, son otros de los inconvenientes del microarray (Daum et al., 2019).

Debido a las limitaciones y ventajas de cada una de las pruebas disponibles para el diagnóstico prenatal, estas se realizan de una forma secuencial, valorando siempre la sospecha diagnóstica o los marcadores ecográficos presentes.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el presente trabajo se ha planteado la siguiente hipótesis:

- Hipótesis: Existe un mayor riesgo de complicaciones perinatales en gestaciones concebidas mediante TRA que en gestaciones espontáneas.

Para comprobar esta hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos:

- Objetivo principal: Analizar el resultado de las pruebas invasivas para el diagnóstico prenatal en pacientes sometidas a TRA en la U.R del HUCA.
- Objetivo secundario: Analizar la incidencia de las pruebas invasivas realizadas en pacientes sometidas a TRA en la U.R del HUCA.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Tipo de estudio y participantes

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo un estudio descriptivo observacional y retrospectivo en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

El tamaño muestral se ha determinado a partir de la revisión de 393 partos de pacientes procedentes de la Unidad de Reproducción Asistida del HUCA entre los años 2014 y 2019. Además, se ha analizado si dichas pacientes se sometieron a una prueba invasiva para diagnóstico prenatal.

### 3.2 Criterios de inclusión

- Mujeres mayores de 18 años y menores de 40 años en el momento de inicio del estudio de esterilidad.
- Mujeres sin hijos previos sanos con la misma pareja.
- Consentimiento informado firmado.

### 3.3 Criterios de exclusión

- Esterilización voluntaria previa.
- Contraindicación médica documentada para el tratamiento de esterilidad o para la gestación.
- Imposibilidad para realizar el tratamiento.



- Existencia de embriones criopreservados en otro centro.

### 3.4 Protocolos

#### 3.4.1 Estimulación ovárica controlada y punción folicular

Antes de iniciar con el proceso de estimulación ovárica y con la programación del ciclo, se administran anticonceptivos orales a la paciente durante un periodo de, aproximadamente, 20 días.

La estimulación ovárica controlada (EOC) se lleva a cabo de forma individual para cada paciente, adaptando las dosis y el tipo de gonadotropinas requeridas en función de las necesidades y respuesta de cada mujer en base al recuento de folículos antrales y ciclos previos realizados, fundamentalmente. En la mayor parte de los casos, se sigue un protocolo corto de EOC por antagonistas de GnRH hasta la observación mediante ecografía de tres o más folículos de entre 16-18 mm en ambos ovarios, momento a partir del cual se debe llevar a cabo el desencadenamiento de la ovulación a través de la administración de hCG (*Ovitrelle*®). En los casos en los que exista un riesgo de hiperestimulación ovárica, se utilizan antagonistas de GnRH con el fin de poder desencadenar la ovulación con análogos de la GnRH.

Las punciones foliculares de cada paciente, que se realizan en caso de FIV o ICSI, se programan a las 36 h después de la administración de hCG, y se realizan en el quirófano de la unidad de reproducción en condiciones de esterilidad y bajo la sedación de las pacientes con Propofol. Antes de llevar a cabo esto, el ginecólogo realiza un lavado vaginal con suero fisiológico a cada paciente y, a continuación, lleva a cabo la punción de los folículos en ambos ovarios utilizando una aguja de punción ovárica guiada por ecografía vaginal. Tanto la aspiración del líquido folicular como su traslado inmediato en tubos de ensayo al laboratorio es realizado por una de las enfermeras de la unidad.

#### 3.4.2 Inseminación artificial

En el caso de que a la paciente se le vaya a realizar una inseminación artificial, la dosis de gonadotropinas que se utiliza para llevar a cabo la EOC es baja, ya que el objetivo es evitar el desarrollo de varios folículos dominantes que pueden dar lugar a un embarazo gemelar o múltiple. Por tanto, la dosis de gonadotropinas empleada en estos casos es inferior a las utilizadas en los casos de FIV o ICSI.



El tratamiento comienza el tercer día del ciclo con la administración de 50 UI/ml de FSH recombinante subcutánea (en algunos casos puede variar entre 37,5 y 75 UI/ml). La paciente es la encargada de autoadministrarse, diariamente, esta dosis, y debe acudir a consulta para un control ecográfico el 5º o 6º día del ciclo, momento a partir del cual se realizan controles ecográficos cada dos días para controlar el tamaño del folículo dominante. Cuando algún folículo alcanza los 16-18 mm, como se ha mencionado anteriormente, se desencadena la ovulación con la administración de hCG (36 h antes de realizar la técnica). En caso de que se desarrollen más de dos folículos de ese tamaño, se cancela la técnica, y si se encuentran entre uno y dos folículos, se debe informar a la paciente del riesgo de gestación gemelar. Es importante destacar que el objetivo de la EOC, en el caso de que se vaya a realizar IA, es conseguir un único folículo dominante.

El día de la inseminación la paciente o la pareja (IAC) entregan la muestra seminal, que se procesa en el laboratorio mediante la técnica de gradientes de densidad inmediatamente antes de su utilización. Una vez capacitada la muestra seminal, se carga en una cánula específica para la inseminación intrauterina, de forma que esta se introduce dentro del útero hasta 1 cm del fondo uterino, habiendo utilizado previamente un espéculo vaginal que permite la visualización del cérvix uterino. Para que pueda realizarse la IA, es fundamental conseguir un recuento de espermatozoides móviles (REM) igual o superior a 5 millones/ml. Después de la inseminación, se administra un comprimido de 200 mg de progesterona cada 8 h por vía vaginal con el objetivo de apoyar la fase lútea.

En aquellos casos en los que se realiza IAD, la muestra seminal procede de un banco externo, y llega al laboratorio en unas condiciones óptimas de transporte el mismo día en el que se realiza la técnica.

#### 3.4.3 Fecundación *in vitro* / Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Una vez trasladados los tubos de ensayo con el líquido folicular al laboratorio, se vuelcan en unas placas de Petri calefactadas a 37°C dentro de una campana de flujo laminar para su observación. El biólogo de la unidad es el responsable de revisar las placas y recoger todos los complejos cúmulo-ovocito (COCs) obtenidos con ayuda de una micropipeta de 1000 µm de diámetro. Los COCs obtenidos son depositados en otras placas de Petri con medio de cultivo para gametos (*Sydney IVF Gamete Buffer*, Cook®) y buffer HEPES para facilitar su manejo fuera de la incubadora y, de esta forma, mantener

unas condiciones óptimas controladas hasta la finalización del recuento de COCs. Tras depositar todos los COCs en las placas con medio de cultivo para gametos, se trasladan a una placa con 4 pocillos con medio de fertilización (*Sydney IVF Fertilization Medium, Cook®*), y se mantienen en la incubadora a 37°C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 6% durante 3 h, aproximadamente.

A la hora de seleccionar la técnica de fecundación que se va a realizar a la paciente, se tienen en cuenta una serie de factores, entre los que se encuentran: la edad, el historial clínico de la paciente, la realización o no de ciclos anteriores y, principalmente, el REM obtenido del hombre. De esta forma, si en la muestra seminal se obtienen más de 3 millones de espermatozoides móviles progresivos/ml, y no existe ninguna contraindicación previa, la técnica que podría llevarse a cabo de forma óptima sería la FIV clásica. Sin embargo, si por el contrario se obtiene un REM inferior a 3 millones/ml, la técnica más adecuada sería la ICSI, ya que uno de los requisitos fundamentales para que pueda llevarse a cabo la FIV es obtener un REM superior a 3 millones, y, además, para la ICSI no es necesario tener una alta concentración de espermatozoides, puesto que solo se microinyecta uno por cada óvulo. En este caso, la capacitación seminal para realizar FIV o ICSI se lleva a cabo mediante la técnica swim-up. Esta técnica recupera un menor número de espermatozoides móviles en comparación con la técnica de gradientes de densidad y, por tanto, se produce una peor selección espermática. Sin embargo, como tanto para FIV como para ICSI la concentración de espermatozoides no es tan determinante como sí lo es para la IA, la técnica de swim-up es perfectamente válida. Además, con dicha técnica se evita la presencia de sílice (utilizado en la técnica de gradientes) que puede dificultar el proceso de ICSI. No obstante, la elección de una técnica u otra puede variar dependiendo del centro de reproducción o clínica a la que asista la paciente o pareja, ya que dicha elección es tomada por el biólogo o embriólogo que realiza la técnica.

Si la técnica de fecundación a realizar es la FIV, a las 3 h de haberse realizado la punción folicular, se procede a inseminar los ovocitos, que permanecen en los pocillos con medio de fertilización, con una concentración determinada de espermatozoides. Dicha concentración puede variar dependiendo de la unidad de reproducción o clínica en la que se lleve a cabo el proceso, sin embargo, en la Unidad de Reproducción del HUCA la concentración estándar de espermatozoides que se utiliza para la FIV es de  $1,5 \times 10^5$ ,

ya que esta es la concentración que se considera óptima para conseguir una correcta fecundación reduciendo al máximo el posible riesgo de poliespermia asociado a dicha técnica.

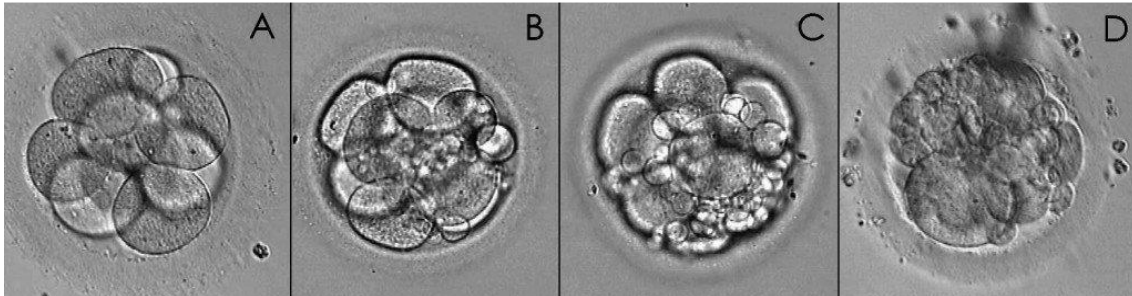
Por otro lado, en el caso de que sea la ICSI la técnica elegida, se deben decumular previamente los COCs de forma química y mecánica, simultáneamente, antes de microinyectar los ovocitos. Para ello, los COCs se depositan en una gota de 80 UI de hialuronidasa (*SynVITRO Hyalase*, *Origio*®), y se aspiran y sueltan suavemente con ayuda de un Flexipet de 140 µm hasta eliminar todas las células de la granulosa. Es muy importante mencionar que todo este proceso no debe superar el minuto de duración, ya que podría ocasionar daños graves al ovocito. Una vez decumulados los ovocitos, se mantienen en medio de fertilización dentro de la incubadora hasta que se lleve a cabo la ICSI.

Las placas de ICSI se preparan de la siguiente forma: se colocan seis gotas de 5 µl de medio de cultivo para gametos con buffer HEPES (*Sydney IVF Gamete Buffer*, *Cook*®), donde se depositan los ovocitos; dos gotas de 4 µl de polivinilpirrolidona (*PVP Clinical Grade*, *Origio*®), donde se deposita 1 µl de medio con espermatozoides, y, por último, una gota de 5 µl de *Gamete*, que es un medio de cultivo que se utiliza como gota de lavado. Una vez esto, se traslada la placa al micromanipulador para llevar a cabo la microinyección de los ovocitos, y, finalmente, tras realizar la microinyección, los óvulos se mantienen en la incubadora hasta el día siguiente. Cabe destacar el hecho de que la distribución de las gotas en las placas de ICSI también puede variar dependiendo de la unidad de reproducción o clínica.

Para comprobar si la fertilización se lleva a cabo de forma correcta, se deben visualizar 2 corpúsculos polares y 2 pronúcleos, y dicha valoración debe realizarse entre 16-18 h post FIV/ICSI. Tras la fertilización, los cigotos formados se mantienen en microgotas con medio de cultivo en la incubadora durante los días posteriores hasta el momento de la transferencia.

La evaluación de los embriones se realiza una vez al día durante todo el periodo de desarrollo embrionario siguiendo los criterios morfocinéticos establecidos en la clasificación de ASEBIR. Finalmente, los embriones son catalogados como tipo A, B, C

y D, siendo A el de mejor calidad y D el de peor calidad (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, 2015).



**Figura 1.** Clasificación de un embrión en día +3 según los criterios morfocinéticos de clasificación de ASEBIR (A, B, C y D).

#### 3.4.4 Transferencia embrionaria y criopreservación (TEC)

En la mayoría de los casos, la transferencia embrionaria se realiza en día +2 y +3, exceptuando algún caso en el que algunos embriones se llevan hasta estadio de mórula (día +4) o de blastocisto (día +5 o +6), transfiriéndose, de esta forma, en día +4, +5 o +6 (es menos frecuente la transferencia en día +6). El número de embriones transferidos varía entre 1 y 2 en función del número de embriones viables disponibles, de la calidad de estos, y del historial clínico y el deseo de la propia paciente.

La transferencia embrionaria se realiza en el quirófano de la unidad de reproducción bajo unas condiciones de esterilidad y un ambiente de luz tenue, evitándose así la sobreexposición de los embriones a la luz. Para ello, se utiliza un catéter de transferencia (*Guardia Access Embryo Transfer Cathether, Cook®*) compuesto por una parte interna y otra externa. Esta última se introduce por la vagina llegando hasta el útero para canalizar la parte interna del catéter, siendo esta la utilizada como soporte para los embriones. El biólogo es el responsable de cargar los embriones en el catéter junto con medio de transferencia (*Culture médium, Cook®*), y depositarlos en el último tercio del útero de la paciente con ayuda del ginecólogo, guiado por ecografía abdominal.

Tras las transferencias, los embriones de buena calidad que quedan sin transferir son vitrificados, quedando a disposición de las parejas para su posterior utilización. La vitrificación es una técnica de criopreservación que consiste en la exposición de los embriones a elevadas concentraciones de crioprotector y a muy bajas temperaturas (-

196°C), consiguiendo así un enfriamiento brusco, que evita la formación de cristales de hielo que pueden dañar a las células del embrión. La vitrificación de los embriones se lleva a cabo, en la mayoría de los ciclos, en día +3. No obstante, aquellos embriones que en día +3 no cumplen los criterios para poder ser vitrificados, se mantienen en cultivo largo para observar su evolución, pudiendo ser vitrificados en estadio de mórula o de blasto.

Otro criterio establecido para la vitrificación de los embriones es la segmentación de los ciclos de las pacientes, que se lleva a cabo en aquellos casos en los que existe riesgo de hiperestimulación u otra contraindicación para la transferencia en fresco.

Los procesos de vitrificación y desvitrificación se llevan a cabo mediante protocolos de *Vitrolife*, dónde se utilizan dos kits: uno para el proceso de vitrificación (*RapidVit Omni, Vitrolife®*) con tres soluciones, y otro para el proceso de desvitrificación (*RapidWarm Omni, Vitrolife®*), el cual contiene cuatro soluciones. Ambos procesos se realizan en placas calefactadas a 37°C, pero siguen unos tiempos diferentes.

- Tiempos de vitrificación
  - Solución 1 → de 5 a 20 min
  - Solución 2 → 2 min
  - Solución 3 → de 30 a 45 seg

Una vez transcurridos los últimos 30-45 seg, se carga la pajuela con un máximo de 2 embriones, dependiendo de la calidad de estos y de las preferencias de las pacientes o parejas. Si los embriones son de buena calidad, y la paciente o pareja no quiere una transferencia de 2 embriones, se cargan de forma independiente, es decir, un único embrión por pajuela. Si, por el contrario, los embriones no son de muy buena calidad, y la paciente o pareja decide transferir dos embriones a la vez, se procede a ello. Una vez cargada la pajuela con el embrión o embriones, se deposita, inmediatamente, en nitrógeno líquido. El sistema de vitrificación utilizado es el sistema cerrado.

- Tiempos de desvitrificación

Para iniciar el proceso de desvitrificación es fundamental sacar la pajuela cerrada del nitrógeno líquido y depositarla, rápidamente, en la primera solución.

- Solución 1 → 1 min

- Solución 2 → 3 min
- Solución 3 → 5 min
- Solución 4 → de 5 a 10 min

#### 3.4.5 Transferencia de embriones criopreservados

Los embriones vitrificados pueden ser transferidos en sucesivas ocasiones tras realizar una correcta preparación endometrial, cuyo objetivo consiste en preparar el endometrio para recibir al embrión, permitir la implantación de dicho embrión en el útero, y mantener los estadíos iniciales de la gestación hasta que la placenta asuma cierta autonomía.

El tratamiento se inicia el primer día de menstruación de la paciente mediante la administración de 150 mg de estradiol, los cuales se administran cada 72 h en parches por vía transdérmica. Tras 15 días, se realiza un control ecográfico para observar el estado del endometrio, y, cuando este se encuentra en un estado óptimo trilaminar, se pautan 600 mg de progesterona al día por vía vaginal, repartidos en 3 dosis de 200 mg cada 8 h hasta la semana 12 del tratamiento. Es importante destacar cuándo debe realizarse la transferencia, de forma que si los embriones están vitrificados en día +3, estos se transfieren al 4º día desde el inicio de la progesterona. Si, por el contrario, dichos embriones se vitrifican en día +4, estos se transferirán al 5º día desde el inicio de la progesterona, y así sucesivamente. La noche anterior a la transferencia embrionaria y la mañana antes de acudir a consulta, la paciente debe tomar la dosis de progesterona vía oral y, además, debe beber 3 o 4 vasos de agua desde 1 hora antes de la transferencia para favorecer con ello una correcta colocación uterina.

Toda la medicación pautada se mantiene hasta el día en el que se realice la prueba de embarazo a la paciente (15 días después de la transferencia), de forma que, si el test de embarazo resulta negativo o la paciente vuelve a tener la menstruación, se suspende la medicación. Por el contrario, si este resultado es positivo se mantiene el tratamiento hasta acudir nuevamente a consulta 5 semanas después.

#### 3.4.6 Amniocentesis

Si, finalmente, la paciente resulta embarazada, una de las pruebas de diagnóstico prenatal invasivas a las que puede someterse para analizar si el feto presenta alguna anomalía cromosómica o defecto genético, es la amniocentesis.

Una vez recogido en un falcon la muestra de líquido amniótico, se mezcla el contenido y se reparte en dos tubos rotulados. Es muy importante rotular todos los tubos y los falcons con el número de muestra, las iniciales de la paciente y la fecha de siembra.

Se centrifugan los dos tubos durante 10 min a 1200 rpm, y se deja 1,5 ml de suspensión en el tubo 1 y 2,5 ml en el tubo 2. A continuación, se preparan los frascos de cultivo, incorporando: 3 ml de medio F1 en el frasco de cultivo 1, 2 ml de medio F2 en el frasco de cultivo 2, y 4 ml de medio F2 en el frasco de cultivo 3. Tras esto, se añaden 1,5 ml de medio F1 (*Amniomed Plus, Euroclone®*) en el tubo 1, se mezcla bien todo el contenido, y se depositan los 3 ml en el frasco de cultivo 1. Por otro lado, se añaden 2,5 ml de medio F2 (*Amniochome Plus, Lonza®*) en el tubo 2, se mezcla el contenido y se depositan 3 ml en el frasco de cultivo 2, y los otros 2 ml restantes, en el frasco de cultivo 3. De esta forma, cada frasco de cultivo tiene que tener un total de 6 ml de medio. Una vez conseguido esto, se guardan dichos frascos en el incubador para iniciar el cultivo celular en monocapa.

En el caso de que el volumen de líquido amniótico recogido sea inferior a 12 ml, se siguen los siguientes pasos:

- Si el volumen de la muestra recogida está entre 6 - < 12 ml, se deben realizar solo dos cultivos (frascos de cultivo 1 y 3).
- Si el volumen de líquido amniótico obtenido se encuentra entre 4-6 ml, se lleva a cabo un único cultivo (frasco de cultivo 1).
- Si el volumen es inferior a 4 ml, también se realiza un solo cultivo, pero en este caso, sin centrifugación previa. Finalmente, se añade medio F1 hasta alcanzar los 6 ml de medio en total.

Si la muestra de líquido amniótico contiene un coágulo, se siguen los mismos pasos que se describieron anteriormente, solo que después de centrifugar y añadir el medio de cultivo al tubo, se debe resuspender vigorosamente con una pipeta Pasteur para disgregar dicho coágulo.

A partir del 6º o 7º día, se lleva a cabo una revisión de los cultivos y se añaden 3 ml de medio nuevo (*Amniomed Plus, Euroclone®* para el tubo 1, y *Amniochome Plus, Lonza®* para el tubo 2) con una pipeta estéril. El tipo de medio tiene que ser el mismo con el que se inició el cultivo y debe estar atemperado a 37°C. Del 7º al 9º día, se observa



el crecimiento de los cultivos tanto de forma macroscópica como de forma microscópica, utilizando un microscopio invertido con el objetivo de 10x para poder observar el índice mitótico.

Según la observación del crecimiento celular, se pueden seguir los siguientes pasos:

- Cambio parcial: se extraen 2-3 ml del medio de cultivo en crecimiento, y se añaden 2-3 ml de medio de cultivo nuevo (*Amniomed Plus*, *Euroclone*® para el tubo 1, y *Amniochome Plus*, *Lonza*® para el tubo 2) atemperado a 37°C utilizando una pipeta estéril.
- Cambio completo: se decanta todo el medio de cultivo del frasco en un vaso de precipitado, y se añaden 3-5 ml de medio nuevo (*Amniomed Plus*, *Euroclone*® para el tubo 1, y *Amniochome Plus*, *Lonza*® para el tubo 2) atemperado a 37°C con pipeta estéril.
- Se tripsiniza el cultivo.

- *Tripsinización*

Se descongela tripsina-EDTA al 1%, y se atempera el medio de cultivo en baño a 37°C. Se decanta el medio en un tubo de centrifuga, previamente rotulado, y se lleva a cabo la tripsinización del cultivo para separar las células del frasco con tripsina-EDTA. Para ello, se lava el falcon con 1 ml de tripsina-EDTA, y se vierte al tubo de centrifuga. Se añaden 2 ml de tripsina-EDTA al frasco, y se deja actuar durante 45 min a temperatura ambiente. Una vez esto, se vierte, de nuevo, la solución al tubo de centrifuga, dejando únicamente el volumen suficiente para cubrir la superficie del frasco, y se deja actuar durante 1-2 min más.

A continuación, se observa al microscopio invertido durante un máximo de 5 min, ya que el medio no puede estar demasiado tiempo en contacto con la tripsina-EDTA, y se mueve o se golpea suavemente el frasco hasta conseguir que las células se desprendan totalmente del recipiente.

Una vez tripsinado el medio, se añaden 6 ml del medio de cultivo que le corresponde (*Amniomed Plus*, *Euroclone*® para el tubo 1, y *Amniochome Plus*, *Lonza*® para el tubo 2) para inhibir la tripsina-EDTA, de forma que se detiene la reacción y se impide que



dicha enzima destruya las células. Finalmente, se revisa el cultivo al día siguiente y se cambia el medio de cultivo.

- *Parada del cultivo*

Si se decide sacrificar los cultivos, se deben realizar dos cambios de medio el día anterior a la parada del cultivo, uno a primera hora del día y otro siempre después de las 13:00, para que, de esta forma, transcurran entre 19 y 20 h hasta la parada. Es muy importante tener en cuenta que este tiempo debe ser bastante exacto, puesto que corresponde al ciclo celular (19-20 h).

Para llevar a cabo la parada del cultivo, primero se atempera la solución hipotónica, se descongela la tripsina-EDTA al 1%, y se atempera el medio de cultivo en baño a 37°C. Posteriormente, se saca del frigorífico el Colcemid (sustancia que inhibe la formación del huso mitótico, interrumpiendo así el crecimiento celular durante la metafase). Después de 9 h, se añaden 100 µl de Colcemid con una micropipeta a cada frasco, y se incuban durante 45 min en una estufa de CO<sub>2</sub>. Es importante mencionar que, a partir de este paso, no es necesario emplear la cabina de flujo laminar.

A continuación, se añade la solución Earle (4ml/falcon), se deja actuar durante 2-3 min, se agita y se deposita en el tubo correspondiente. Esta solución salina equilibrada se utiliza para el mantenimiento a corto plazo de un cultivo celular en presencia de CO<sub>2</sub>. Tras esto, se añade tripsina-EDTA (1,5ml/falcon) durante 5 min a 37°C.

En el siguiente paso, se procede a observar la separación de las células del fondo del frasco con el microscopio invertido, moviendo o golpeando el frasco suavemente hasta conseguir su total desprendimiento. Finalmente, se vierte el contenido del tubo de centrifuga al falcon, se agita para recoger las células en suspensión, y se vuelve a depositar en el tubo de centrifuga.

Se añaden 3 ml de medio de cultivo en el falcon (*Amniomed Plus*, *Euroclone*® para el tubo 1, y *Amniochome Plus*, *Lonza*® para el tubo 2), en el cual se ha llevado a cabo la tripsinización, para continuar con el cultivo de células que no han conseguido desprenderse totalmente. Dicha “reserva celular” se utiliza en caso de que sea necesario para completar el estudio. A continuación, se centrifugan los 6 ml de medio de cultivo durante 6 min a 1600 rpm y se elimina el sobrenadante con una pipeta, dejando 1 ml de

volumen para resuspender el pellet. Esto último se consigue con ayuda del vórtex o golpeando el tubo con el dedo para disgregarlo.

Una vez ejecutado este paso, se añade gota a gota una solución hipotónica de KCl (*Gibco*®) hasta alcanzar 1 ml, manteniendo el tubo en el vórtex. Dicha solución de KCl se utiliza para provocar la entrada de agua en el interior de las células como consecuencia de la alta concentración de sales que hay en el interior de las mismas. De esta forma, se consigue que el citoplasma aumente su volumen y que los cromosomas permanezcan “flotando” en su interior. Después de esto, se enrasan los tubos con la solución hipotónica hasta alcanzar los 6 ml, se voltean suavemente dos veces y se mantienen durante 32-33 min en baño a 37°C.

Una vez transcurrido este tiempo, se sacan los tubos y se añaden, inicialmente, 10 gotas de Carnoy (fijador), y transcurridos unos segundos, se depositan otras 20 gotas. El fijador se incorpora gota a gota para evitar la aglutinación celular. Se resuspende suavemente dos veces y se dejan a temperatura ambiente durante 14 min. A continuación, se centrifugan los tubos a 1600 rpm durante 6 min, se decanta el sobrenadante hasta llegar al pellet (sin tocarlo), y se añaden 6,5 ml de Carnoy (gota a gota) manteniendo el tubo en vórtex. Se vuelve a centrifugar durante 6 min a 1600 rpm, se vuelve a decantar el sobrenadante, y, de nuevo, se incorporan otros 6,5 ml de Carnoy en vórtex. En esta ocasión, una vez añadido el fijador, se mantienen los tubos abiertos durante 20 min a 4°C.

Finalmente, se lleva a cabo una última centrifugación a 1600 rpm durante 6 min, se dejan los tubos a -20°C durante 8-10 min y, posteriormente, se trasladan al frigorífico y se mantienen a 4°C hasta realizar las preparaciones cromosómicas.

- *Preparaciones cromosómicas*

Para llevar a cabo las preparaciones cromosómicas, se colocan, en primer lugar, los tubos en una gradilla en orden numérico correlativo y en grupos para evitar posibles problemas asociados al procesar varias muestras al mismo tiempo. Dichas preparaciones se realizan sobre portaobjetos que deben ser previamente desengrasados, son depositados en agua destilada y se mantienen a 4°C hasta ser utilizados.

Se escurre el exceso de agua de los portaobjetos que vayan a ser utilizados, apoyando uno de los bordes sobre un papel de filtro, se colocan en posición horizontal y,

finalmente, se dejan secar al aire. Es fundamental etiquetar los portaobjetos con el número de referencia de las muestras en la zona esmerilada.

A continuación, se resuspende el pellet de los tubos con una cantidad de Carnoy proporcional al tamaño del sedimento celular (pellet) para que pueda llevarse a cabo la tinción, y, posteriormente, se depositan dos o tres gotas sobre cada portaobjetos. Las preparaciones cromosómicas se almacenan en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  en cajas hasta su utilización.

Antes de llevar a cabo la tinción, se deben “envejecer” los portaobjetos en una estufa y, dependiendo del tipo de muestra, se modifican las condiciones de temperatura y tiempo. Estos pueden dejarse en estufa durante 1 h a  $90^{\circ}\text{C}$ , si se necesitan obtener las bandas GTG con urgencia, o durante 2 h a  $60^{\circ}\text{C}$ . Otra opción es dejar en estufa durante toda la noche a  $60^{\circ}\text{C}$ . Es muy importante sacar los portaobjetos de la estufa, como mínimo, 10 min antes de realizar la tinción para que puedan atemperarse.

- *Bandeo cromosómico (Bandas GTG)*

El bandeo cromosómico es una técnica de tinción diferencial que da lugar a la formación de bandas claras y oscuras a lo largo del eje de los cromosomas. Esta técnica se utiliza para la obtención del cariotipo de cada una de las muestras y, por tanto, como herramienta de identificación de cada cromosoma, ya que el patrón de bandas que se produce es característico de cada par cromosómico. Las bandas GTG se consiguen mediante desnaturalización y digestión de ciertas regiones del cromosoma (heterocromatina) a partir de Tripsina (enzima) y Giemsa (colorante).

Para llevar a cabo este proceso, se introducen los portaobjetos con la suspensión celular en tripsina previamente preparada en baño a  $37^{\circ}\text{C}$ . El tiempo puede variar desde pocos segundos hasta minutos dependiendo del envejecimiento de los portaobjetos, de las condiciones ambientales (humedad y temperatura) y de la temperatura de la enzima. En caso de utilizar tripsina líquida, el baño puede estar a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ .

La acción de la tripsina se amortigua introduciendo los portaobjetos, inmediatamente después, en buffer PBS. A continuación, se tiñen los portaobjetos con Giemsa (al 5 o 7%) durante un tiempo variable, se lavan con agua destilada, se dejan secar al aire y, finalmente, se observan al microscopio en campo claro (objetivo 100x).

### 3.4.7 Biopsia corial

El análisis del cariotipo fetal obtenido a partir del crecimiento de la muestra de vellosidad corial permite detectar, como se comentó anteriormente, la posible existencia de anomalías cromosómicas numéricas y/o estructurales del feto. El análisis citogenético de las muestras obtenidas por vellosidad corial consta de 2 partes:

- *Método directo o cultivo corto:* consiste en la preparación rápida y directa de las vellosidades con fines de identificación de metafases, para lo que normalmente se requieren entre 2 y 3 h. Se hace uso de las células de citotrofoblasto con mitosis espontánea, por lo que se encuentran en división y proliferación rápida. No hay riesgo de contaminación materna, pero presenta un cierto riesgo de detectar anomalías confinadas a la placenta (2% de resultados no concluyentes). Esto último se debe a la utilización de células del citotrofoblasto que pueden representar, en raras ocasiones, células procedentes de la placenta y no presentes en el embrión. Es por esto, por lo que es necesario confirmar las anomalías halladas mediante un cultivo largo o líquido amniótico (amniocentesis), a excepción de las trisomías 21, las trisomías sexuales (XXY, XYY y XXX) y las anomalías cromosómicas estructurales. Tiene un riesgo de 1/3000 de falsos negativos (anomalía fetal y placenta normal). Actualmente, el método directo es sustituido de forma generalizada por el análisis con QF-PCR.
- *Método de cultivo largo:* se necesitan alrededor de 3 semanas. Se utilizan las células cultivadas *in vitro* a partir del núcleo mesenquimatoso. El bajo número de divisiones en estas regiones enlentece y dificulta el diagnóstico prenatal en este tipo de cultivos. Además, existe un mayor riesgo de contaminación materna dando lugar a resultados erróneos, sin embargo, presenta una menor probabilidad de detectar una anomalía confinada a la placenta y de producir falsos negativos. Se recomienda realizar un cultivo largo, siempre que no se lleve a cabo un microarray, después de QF-PCR o cultivo corto.

Para evitar la contaminación con células maternas, que es la principal causa de discordancia entre cultivos a corto y largo plazo, se sugiere la disección cuidadosa de la muestra con ayuda del microscopio óptico, con la finalidad de descartar cualquier tejido que no sea de origen fetal.

- *Análisis cromosómico*

El estudio se lleva a cabo mediante la técnica de bandeado GTG (con un mínimo de 400 bandas por cada juego haploide) y utilizando un microscopio en campo claro (objetivo 100x). Para el estudio básico se analiza, como mínimo, un cultivo primario realizando un recuento del número de cromosomas y la identificación de los cromosomas sexuales en 10 metafases. De esta forma, se excluyen mosaicos superiores a un 20% con un 95% de confianza.

Se identifican un mínimo de 5 metafases con mayor resolución de bandas, aunque depende del motivo del estudio. El análisis de las metafases consiste en la comparación de cada par de cromosomas homólogos, banda por banda. Si un cromosoma del par homólogo está implicado en un entrecruzamiento con otro cromosoma, el par de homólogos debe ser analizado de forma independiente en otra metafase para asegurar que no haya reordenamiento estructural.

El análisis debe anotarse en la hoja de estudio al microscopio donde debe figurar el código de la muestra, el cultivo del que procede, el número de portaobjetos al que corresponde y el cariotipo resultante.

El estudio de un único cultivo se acepta cuando:

- Se ha realizado un análisis previo con QF-PCR o FISH por sospecha de aneuploidía y:
  - El cariotipo es masculino.
  - El cariotipo confirma una trisomía/monosomía detectada a partir de esas técnicas.
- El padre o la madre es portador/a de un reordenamiento y:
  - El feto femenino tiene un derivado desequilibrado del reordenamiento.
  - El feto femenino tiene el reordenamiento heredado del padre.

#### 3.4.8 QF-PCR

La realización de la técnica de diagnóstico rápido QF-PCR permite el estudio de aneuploidias de los cromosomas 13,18, 21 X e Y en muestras de líquido amniótico (LA) o vellosidad corial (VC). En caso de que se analice el ADN del líquido amniótico, solo es necesario realizar una extracción. Sin embargo, si la muestra procede de las

vellosidades coriales, son necesarias dos extracciones de ADN independientes, en las cuales se deben seleccionar fragmentos de vellosidad corial de diferentes zonas para reducir el riesgo de mosaicismos confinados a placenta.

- *Extracción de ADN*

La extracción de ADN de la muestra se lleva a cabo mediante la utilización de un kit comercial (*InstaGene*) que es habitualmente utilizado en los análisis de QF-PCR por su rapidez y por garantizar la extracción en cantidades mínimas de la muestra.

En la utilización del kit, se centrifugan 200  $\mu$ l de suspensión celular a 12000 rpm durante 3 min. A continuación, se añaden 200  $\mu$ l de la matriz *InstaGene*® (matriz compuesta por una resina, cuya finalidad es absorber los productos de lisis celular que interfieren con el proceso de amplificación de ADN, produciendo así un sustrato mejorado para llevar a cabo dicha amplificación), y se incuba a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente, se agita en un vórtex durante 10 seg y se vuelve a incubar a 95°C durante 7 min. Finalmente, se vuelve a agitar el tubo en el vórtex durante otros 10 seg y se centrifuga a 12000 rpm durante 3 min. Es importante almacenar la muestra preparada a -20°C cuando no esté siendo utilizada.

La extracción de ADN procedente de la vellosidad corial se lleva a cabo mediante el método *salting out* o precipitación salina, donde las muestras se encuentran en presencia de altas concentraciones de sales, que dan lugar a una disminución en la solubilidad de las proteínas, y como consecuencia, a su precipitación. Después de la digestión enzimática en la que se produce la lisis celular a partir de una solución con proteinasa K, se incuban los tubos durante 1 h a 65°C, agitándolos en un vórtex cada 10 min. Seguidamente, se añaden 500  $\mu$ l de NaCl, y se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min. Tras esto, se traslada el sobrenadante a otro tubo y se añaden 600  $\mu$ l de isopropanol para que se produzca la precipitación del ADN. La mezcla resultante se incuba en hielo durante 10 min y, posteriormente, se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo, se decanta el sobrenadante, se lava el pellet con etanol al 70% y se centrifuga a 12000 rpm durante otros 5 min. Finalmente, se vuelve a decantar el sobrenadante y se disuelve el ADN en una solución TE (Tris-HCl 10 mM, Ph 1,4 y EDTA 1 Mm, Ph 8), almacenándolo a 4°C durante 24 h.

- *Amplificación de ADN*

Para llevar a cabo la amplificación del ADN, se utiliza un kit comercial (*Aneufast*®) que contiene unos marcadores STRs (short tandem repeat) para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. Se utilizan, por un lado, dos marcadores (S1 y S2) para realizar el diagnóstico inicial de aneuploidías, y, por otro lado, cuatro marcadores específicos (M13, M18, M21 y MXY) que pueden utilizarse como copia de seguridad en caso de que los marcadores S1 y S2 no sea informativos. Este kit utiliza un sistema de cinco tipos de fluorocromos para marcar las secuencias STRs, permitiendo conocer su tamaño y localización, además del número de cromosomas analizados.

En el siguiente paso, se centrifugan las muestras de ADN extraído a 12000 rpm durante 3 min y, posteriormente, se añaden 5 µl de ADN por tubo de PCR (coger siempre el sobrenadante sin tocar las bolitas en el caso del líquido amniótico, ya que interfieren en la PCR), obteniendo un volumen final de 15 µl. Finalmente, se mantiene todo en hielo o a 4°C hasta introducirlo en el termociclador para iniciar la reacción de amplificación.

Al cabo de 3 h, aproximadamente, finaliza el programa de PCR, pudiéndose extraer las alícuotas de 1,5 µl de producto amplificado para realizar la electroforesis capilar. Mientras se mantienen las muestras de ADN amplificado a 4°C, se prepara una mezcla inicial de FDA (Formamida) y LIZ 500 (marcador de peso molecular) según el número total de muestras (40 µl FDA x n + 0,3 µl LIZ 500 x n, siendo “n” el número de muestras). A continuación, se preparan las siguientes diluciones:

- 40 µl (mezcla FDA + LIZ) + 1,5 µl S1 + 1,5 µl S2
- 20 µl (mezcla FDA + LIZ) + 1,5 µl M13 + 1,5 µl M18 + 1,5 µl M21 + 1,5 µl MXY

Una vez preparadas las diluciones, se incorporan las alícuotas en los distintos tubos eppendorf rotulados donde figura “AN” (*Aneufast*) y el código de la muestra. Finalmente, se cargan en el secuenciador automático de ADN para que se pueda llevar a cabo la electroforesis capilar.

### 3.4.9 Array CGH

Esta técnica, como se comentó anteriormente, permite la detección de pérdidas o ganancias del genoma sin la necesidad de disponer de un cultivo celular. Se basa en la



realización de la técnica Hibridación Genómica Comparada (CGH) con un control sobre una plataforma de arrays (aCGH). Para el análisis bioinformático se utiliza el algoritmo ADM-2 (*Aberration Detection Method 2*), estableciéndose en 5 el número mínimo de oligonucleótidos consecutivos para considerar una alteración en el número de copias. Existen varios formatos de arrays a partir de los cuales puede llevarse a cabo esta técnica. En este caso, se ha utilizado el formato “arrays 8x”.

- *Preparación de muestras*

Para llevar a cabo la preparación de las muestras, en primer lugar, es necesario preparar el termociclador y el hielo seco. Se descongelan los buffers (BSA y buffer de enzimas de restricción) del kit de marcaje (*Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit, Agilent®*), se mezcla el contenido con ayuda de suaves golpes con el dedo, y se centrifuga durante unos segundos. Es importante mantener los reactivos en hielo durante su uso y congelarlos, inmediatamente, a  $-20^{\circ}\text{C}$  cuando no se estén utilizando.

Para cada reacción, se añaden  $0,5\ \mu\text{g}$  de ADN genómico en la placa y se enrasa con agua destilada hasta conseguir el volumen final indicado para cada caso. En la muestra con ADN digerido, debe añadirse agua destilada hasta alcanzar un volumen de  $10,1\ \mu\text{l}$ , y en la muestra con ADN sin digerir, se añade agua destilada hasta los  $13\ \mu\text{l}$ .

A continuación, se prepara el Master Mix en hielo para digerir el ADN, mezclando los siguientes reactivos en el orden correspondiente hasta conseguir un volumen total de  $2,9\ \mu\text{l}$  de Master Mix:  $1\ \mu\text{l}$  agua destilada +  $1,3\ \mu\text{l}$  buffer acetilado +  $0,1\ \mu\text{l}$  BSA +  $0,25\ \mu\text{l}$  Alu I (enzima de restricción de corte) +  $0,25\ \mu\text{l}$  Rsa I (enzima de restricción de corte). Una vez preparado, se añaden los  $2,9\ \mu\text{l}$  de Master Mix en cada tubo con ADN, siendo el volumen final  $13\ \mu\text{l}$  ( $10,1\ \mu\text{l} + 2,9\ \mu\text{l}$ ), y se mezcla bien todo el contenido con la micropipeta.

Se incuban las muestras en el termociclador a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 h para que se lleve a cabo la digestión del ADN. Una vez transcurrido este tiempo, se vuelven a incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 20 min para inactivar la enzima de digestión, y, finalmente, se mantienen a  $4^{\circ}\text{C}$ , pudiendo continuar con el marcaje o almacenándolas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes.



- *Marcaje de muestras*

Los fluorocromos utilizados para el marcaje de las muestras, Cy5 y Cy3, son muy sensibles al ozono y a la luz, y se degradan con ciclos repetidos de congelación/descongelación. De ahí la importancia de minimizar la exposición a la luz durante el proceso de marcaje.

Se centrifugan las muestras a 6000 g durante 1 min, y se añaden 2,5 µl de primer aleatorio en cada tubo, consiguiendo así un volumen final de 15,5 µl. Se mezcla el contenido con ayuda de la micropipeta, y se introducen las muestras en el termociclador (3 min a 95°C las muestras con ADN digerido / 10 min a 95°C las muestras con ADN sin digerir). Una vez transcurrido este tiempo, se mantienen las muestras a 4°C y se centrifugan durante 1 min a 6000 g.

A continuación, se preparan dos Master Mix de marcaje, uno para Cy5 (paciente) y otro para Cy3 (control), con un volumen total de 10 µl. Para ello, se mezclan los siguientes reactivos en el orden correspondiente:

- Master Mix 1 (paciente): 5 µl buffer de reacción + 2,5 µl dNTPs + 1,5 µl Cy5-dUTP + 1 µl ADN polimerasa Klenow Exo (-)
- Master Mix 2 (control): 5 µl buffer de reacción + 2,5 µl dNTPs + 1,5 µl Cy3-dUTP + 1 µl ADN polimerasa Klenow Exo (-)

En el siguiente paso, se añaden los 10 µl de los Master Mix en cada tubo, consiguiendo un volumen total de 25,5 µl, y se mezcla el contenido con ayuda de la micropipeta. Después, se introducen las muestras en el termociclador, en primer lugar, a 37°C durante 2 h y, en segundo lugar, a 65°C durante 10 min. Tras esto, se mantienen las muestras a 4°C, pudiéndose almacenar hasta un mes a -20°C.

- *Purificación de muestras marcadas*

Es muy importante tener en cuenta que durante el proceso de purificación no se deben mezclar las muestras de Cy3 con las de Cy5.

Se centrifugan las muestras a 6000 g durante 1 min, y se añaden 430 µl de TE (pH 8) en cada tubo. Para la purificación de cada muestra, se rotula un tubo eppendorf de 2 ml en el dorsal, se coloca su correspondiente columna de purificación en el interior y se incorpora el ADN marcado dentro de la columna. A continuación, se tapa la columna y

se centrifuga a 14000 rpm durante 12 min a temperatura ambiente. Se decanta el sobrenadante y se coloca, de nuevo, la columna en el interior del tubo. Se añaden otros 480  $\mu$ l de TE (pH 8) en cada columna y se vuelve a centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo, se invierte la columna y se coloca en un tubo eppendorf nuevo de 2 ml (rotulado en tapa y dorsal). Se centrifuga a 14000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente para obtener la muestra purificada, y se añade la cantidad necesaria de TE hasta obtener un volumen final de 9,5  $\mu$ l. Tras esto, se incuban los tubos con el ADN marcado en Cy3 y Cy5 en hielo durante 5 min, y se resuspende el contenido 10 veces con la micropipeta.

Finalmente, se combina la muestra del paciente (marcada con Cy5) con su correspondiente control (marcado con Cy3) en un tubo limpio de 200  $\mu$ l para obtener un volumen final de 16  $\mu$ l. Los ADNs marcados pueden conservarse hasta 1 mes a  $-20^{\circ}\text{C}$  en oscuridad.

- *Preparación de muestras marcadas para hibridación*

Antes de preparar las muestras para la hibridación, se debe preparar el agente de bloqueo (*Blocking Agent*). Este se usa para bloquear los elementos repetitivos en el ADN objetivo y la hibridación no específica. Para ello, se añaden 1350  $\mu$ l de agua destilada en el vial que contiene el agente de bloqueo liofilizado (*aCGH Blocking Agent*), que está incluido en el kit de hibridación (*Oligo aCGH/ChIP-on-ChIP Hybridization Kit, Agilent®*). Se mantiene a temperatura ambiente durante 1 h, y se mezcla el contenido con el vórtex antes de su uso o almacenamiento. El agente de bloqueo puede prepararse con antelación y almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tras esto, se prepara el Master Mix de hibridación, mezclando en el orden correspondiente los reactivos hasta conseguir un volumen total de 29  $\mu$ l (2  $\mu$ l ADN de Cot-1 humano + 4,5  $\mu$ l agente de bloqueo aCGH + 22,5  $\mu$ l buffer de hibridación HI-RPM).

A continuación, se añaden los 29  $\mu$ l del Master Mix de hibridación al tubo que contiene la mezcla con los ADNs marcados con Cy5 y Cy3 hasta conseguir un volumen final de 45  $\mu$ l, resuspendiendo el contenido con la micropipeta. En este caso, se centrifuga el tubo de forma rápida, únicamente, para conseguir que se unifique el contenido en el

fondo. Se transfiere la muestra al termociclador para incubarla, en primer lugar, a 95°C durante 3 min, y, en segundo lugar, a 37°C durante 30 min. Finalmente, se saca la muestra del termociclador y se centrifuga durante 1 min, quedando preparada para la hibridación.

- *Hibridación del microarray y lavado post-hibridación*

Se colocan los 45 µl de la mezcla de hibridación en la junta del portaobjetos (ensamblado en la cámara de hibridación según las instrucciones del fabricante), y se coloca el microarray con el lado impreso hacia la mezcla de hibridación. Finalmente, se incuba en el termociclador a 65°C durante 30-40 h.

El lavado de microarrays después de la hibridación se lleva a cabo para eliminar el ADN marcado que no se ha unido durante la hibridación.

En cámaras de tinción de vidrio separadas, se preparan 400 ml de cada una de las soluciones de lavado (*Oligo aCGH Wash Buffer 1 / Oligo aCGH Wash Buffer 2 / Stabilization and Drying Solution*). El buffer 2 de lavado se precalienta a 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, se desmonta el array CGH de la base, dónde se depositó la muestra, y se realiza el lavado, sumergiéndolo en el buffer 1 a temperatura ambiente durante 5 min. Tras este tiempo, se introduce durante 1 min en el buffer 2, previamente calentado a 37°C. Finalmente, se saca con mucha lentitud para que el cristal se vaya secando, y se coloca en el molde del escáner para llevar a cabo la lectura.

### 3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectuó mediante la versión 3.6.0 del programa R (*R Development Core Team*). Se procedió a analizar la incidencia de estudios prenatales invasivos en pacientes sometidas a TRA y en gestantes que concibieron de forma espontánea, en relación con el número total de partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA y en toda la comunidad autónoma de Asturias.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Edad media de las pacientes sometidas a estudio

En la siguiente tabla (Tabla 1), se muestra la edad media de las pacientes, diferenciando entre las técnicas de reproducción asistida a las que se sometieron, de la Unidad de Reproducción del HUCA desde el año 2014 hasta el año 2019.

	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<b>FIV/ICSI</b>	-	35,3 ( $\pm 3,1$ )	36 ( $\pm 3,1$ )	36,2 ( $\pm 3,1$ )	36,4 ( $\pm 3,6$ )	36,8 ( $\pm 3,7$ )
<b>IAC</b>	-	34,3 ( $\pm 2,8$ )	34 ( $\pm 2,8$ )	33,3 ( $\pm 3,3$ )	34 ( $\pm 2,9$ )	33,8 ( $\pm 3,2$ )
<b>IAD</b>	-	34,6 ( $\pm 2,7$ )	35,3 ( $\pm 2,9$ )	34,8 ( $\pm 3,0$ )	34,2 ( $\pm 4,4$ )	33,7 ( $\pm 3,8$ )
<b>TEC</b>	-	-	-	-	-	-

**Tabla 1.** Edad media de las pacientes sometidas a TRA en la Unidad de Reproducción del HUCA desde el año 2014 hasta el año 2019.

Como se puede observar, en el año 2014 no se ha indicado la edad media de las pacientes. Esto se debe a que, durante ese año, no se llegó a registrar la edad de algunas pacientes por varias causas, entre las que se encuentran: cambios que se produjeron en el sistema informático, cambios de hospital por parte de las pacientes, etc.

En el caso de la transferencia de embriones criopreservados (TEC), no se registra la edad media, ya que la edad que figura en los registros de la Unidad de Reproducción es aquella que presentan dichas pacientes en el momento en el que se lleva a cabo la vitrificación de los embriones.

Haciendo referencia a la tendencia de la edad media de las pacientes durante los 5 años en los que se ha llevado a cabo el registro, se puede observar como en el caso de las técnicas de FIV/ICSI, dicha edad ha ido aumentando ligeramente con el paso de los años, aunque este aumento no llega a ser significativo, ya que la edad media en 2015 fue de unos 35,3 años y en 2019 de 36,8 años. Respecto a la IAC, se puede apreciar cómo la tendencia ha sido prácticamente constante, manteniéndose una edad media de unos 34 años. Finalmente, en el caso de la técnica de inseminación artificial con semen de donante (IAD), se observa un ligero descenso en la edad media de las pacientes con el paso de los años, registrándose una edad media de unos 34,6 años en 2015 y 33,7 años en 2019. Como se puede observar, este descenso no llega a ser muy significativo.

#### 4.2 Análisis de los ciclos de TRA de la Unidad de Reproducción del HUCA

A continuación, se muestran los resultados correspondientes al número total de ciclos realizados en el HUCA, clasificados según la técnica empleada, durante todo el periodo de estudio (2014-2019).

	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
<b>FIV/ICSI</b>	188	269	261	209	222	165
<b>IAC</b>	212	189	199	188	151	128
<b>IAD</b>	-	20	27	53	32	41
<b>TEC</b>	74	95	103	107	99	125
<b>TOTAL</b>	474	573	590	557	504	459

**Tabla 2.** Ciclos realizados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019.

Al observar la tabla 2, se puede apreciar, a simple vista, la ausencia del número de ciclos de IAD en 2014. Esto se debe a que en el registro de ese año se agrupó el número de ciclos de IAC e IAD en un mismo grupo. Por tanto, el número de ciclos que aparece indicado en IAC se corresponde con la suma de ciclos de IAC y ciclos de IAD.

Analizando los datos obtenidos de los ciclos de FIV, se demuestra que el número máximo de ciclos durante los 5 años de estudio tuvo lugar en 2015 (269 ciclos), produciéndose un descenso en los siguientes años hasta los 165 ciclos que se realizaron en 2019. Respecto al número de ciclos de IAC, se observa una clara tendencia descendente con el paso de los años, alcanzando el número máximo de ciclos en 2014 (212 ciclos) y el mínimo en 2019 con 128 ciclos. Es importante mencionar, haciendo referencia a lo comentado con anterioridad, que el número de ciclos de IAC en 2014 habría sido inferior si se hubiesen registrado por separado los ciclos de IAC y de IAD.

En el caso de los ciclos de IAD, se demuestra, claramente, cómo esta técnica es la menos utilizada por las pacientes y/o parejas, llegando a un máximo de tan solo 53 ciclos durante el año 2017. A partir de este año, se observa un descenso, consiguiendo realizar un total de 32 ciclos en 2018 y 41 ciclos en 2019. Finalmente, observando los datos de los ciclos registrados de TEC, se puede detectar un aumento con el paso de los años, partiendo de 74 ciclos en 2014 y alcanzando los 125 ciclos en 2019, aunque se registró un pequeño descenso en 2018 (99 ciclos).

Analizando en la tabla el número total de ciclos realizados en cada año (incluyendo todas las técnicas), se observa que en 2016 fue cuando se registró el máximo número de ciclos (590), y en 2019 el mínimo (459 ciclos).

Al tratarse de un estudio descriptivo, estos resultados pueden estar influenciados por factores ajenos a los objetivos del estudio, como puede ser la disponibilidad de personal, entre otros.

### 4.3 Análisis de los partos registrados en Asturias y en la Unidad de Reproducción del HUCA

A continuación, se muestra el número total de partos registrados en Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019, representados mediante una tabla (Tabla 3) y una gráfica (Figura 2). En ellas se incluyen tanto los partos procedentes de gestaciones naturales como los correspondientes a gestaciones concebidas mediante TRA.

	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>TOTAL</b>
<b>PARTOS</b>	6095	5983	6016	5943	5731	5152	34920

**Tabla 3.** Partos registrados en Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019.



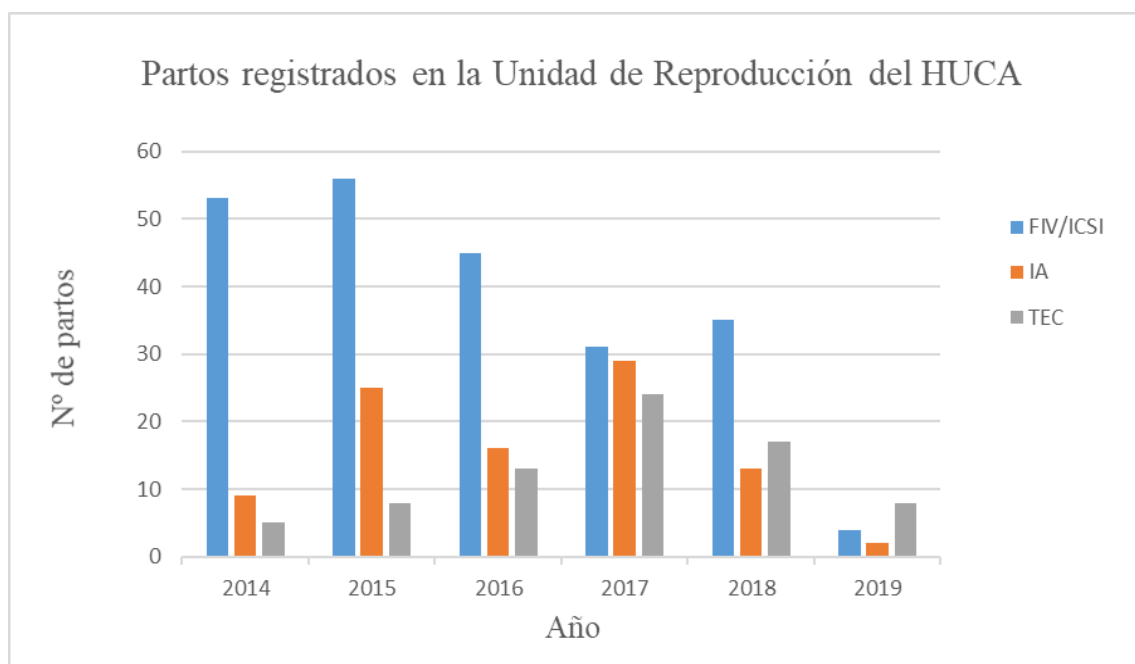
**Figura 2.** Partos registrados en Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019.

El principal aspecto a destacar es la tendencia, prácticamente constante, que se ha seguido con el paso del tiempo, observándose un pequeño descenso en los dos últimos años. El año en el que se registró el mayor número de partos en la comunidad autónoma de Asturias fue en 2014 con un total de 6095 partos, mientras que el año en el que se registró el menor número de partos, con un total de 5152 partos, fue en 2019.

Los datos representados en la tabla 4 hacen referencia al número total de partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA, correspondientes al periodo en el que se desarrolla este estudio. En la figura 3 se representa la evolución de dichos datos de una forma más visual.

	2014	2015	2016	2017	2018	2019	TOTAL
<b>FIV/ICSI</b>	53	56	45	31	35	4	224
<b>IA</b>	9	25	16	29	13	2	94
<b>TEC</b>	5	8	13	24	17	8	75
<b>TOTAL</b>	67	89	74	84	65	14	393

**Tabla 4.** Partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019.



**Figura 3.** Partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019.

Al observar los datos, se puede apreciar, claramente, cómo 2019 fue el año en el que se registró un menor número de partos (14 partos). Existen varias causas que pueden explicar este hecho, por un lado, que el parto de las gestaciones llevadas a cabo durante el año 2019 se dé en el año 2020, es decir, aún no se ha producido y, por otro lado, la recopilación de los datos puede estar incompleta debido a que algunas pacientes no enviaron la información necesaria en el momento en el que se llevó a cabo el análisis de dichos datos. También se puede llegar a la conclusión de que el mayor número de partos registrados en cada año se obtuvo en pacientes sometidas a FIV/ICSI (224 partos en total), y, por el contrario, el menor número de partos se registró en aquellas pacientes que se sometieron a una TEC (75 partos en total), exceptuando el año 2019, donde se registró un mayor número, precisamente, en pacientes sometidas a una transferencia de embriones criopreservados (8 partos). Es importante comentar que los datos obtenidos durante el año 2019 pueden no ser representativos por el motivo expuesto anteriormente, respecto al hecho de que los datos obtenidos durante ese año estén incompletos.

En cuanto a la tendencia marcada por los partos registrados a partir de cada una de las TRA, puede apreciarse un mayor número de partos en pacientes sometidas a FIV/ICSI en 2014 (53 partos) y 2015 (56 partos), seguido de un descenso en los siguientes años, llegando a alcanzar los 35 partos en 2018, y tan solo 4 en 2019. Si analizamos los resultados obtenidos de IA, no se observa una tendencia clara, ya que hay picos máximos y mínimos con el paso del tiempo, es decir, se observa un aumento en el número de partos en los años 2015 (25 partos) y 2017 (29 partos), y un descenso en los años 2016 (13 partos) y 2018 (17 partos). Finalmente, respecto a los datos de las pacientes sometidas a una TEC, sí se puede apreciar, en este caso, una tendencia ascendente hasta el año 2017, donde se registra el máximo número de partos conseguidos con esta técnica (24 partos), produciéndose, posteriormente, un descenso en los siguientes dos años con un total de 17 partos en 2018 y 8 partos en 2019.

Otro aspecto a comentar puede ser el año en el que se registró un mayor número de partos (incluyendo todas las TRA), siendo este el año 2015 con un total de 89 partos gracias a la utilización de dichas técnicas.



#### 4.4 Relación entre estudios prenatales invasivos y partos de la Unidad de Reproducción y la población asturiana

En la tabla que aparece a continuación (Tabla 5), se muestran los estudios prenatales invasivos (PI), diferenciando entre las TRA a las que se sometieron las pacientes, realizados en la Unidad de Reproducción del HUCA desde el año 2014 hasta el año 2019. También se recoge el número total de PI registradas en toda la comunidad autónoma de Asturias, junto con el % de pruebas invasivas efectuadas en la U.R del HUCA respecto al número total de partos registrados en dicha unidad por año (sin separar por técnicas), el % de PI realizadas en la U.R del HUCA respecto al total de PI realizadas en todo el territorio asturiano, y, finalmente, el % de PI realizadas respecto al número total de partos registrados en Asturias en cada año.

	PI FIV/ICSI HUCA	PI IA HUCA	PI TEC HUCA	PI TOTALES ASTURIAS	% PI SOBRE PARTOS U.R HUCA	% PI SOBRE PI TOTALES	% PI SOBRE PARTOS ASTURIAS
<b>2014</b>	4	-	-	386	5,97	1,04	0,07
<b>2015</b>	1	3	-	368	4,49	1,09	0,07
<b>2016</b>	1	-	1	265	2,70	0,75	0,03
<b>2017</b>	2	-	-	243	2,38	0,82	0,03
<b>2018</b>	1	2	-	226	4,62	1,33	0,05
<b>2019</b>	-	-	-	206	0	0	0
<b>TOTAL</b>	9	5	1	1694	20,16	5,03	0,25

**Tabla 5.** Estudios prenatales invasivos realizados en la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019.

De todos los partos procedentes de la Unidad de Reproducción del HUCA (393 partos), se realizaron estudios prenatales invasivos en tan solo 12 pacientes, llevándose a cabo un total de 15 pruebas invasivas, ya que se produjeron 3 partos gemelares. El primer parto gemelar resultó de una IA en 2015; el segundo, se corresponde con una FIV/ICSI realizada en 2017, y el tercero, se produjo en una paciente que se sometió a otra IA en 2018.

El año en el que se registró el mayor número de pruebas invasivas en todo el territorio asturiano, con un total 386 PI, fue en 2014. De estas 386 PI, 4 se realizaron a

pacientes que fueron sometidas, previamente, a un ciclo de FIV/ICSI en la Unidad de Reproducción del HUCA, suponiendo así un 5,97% de todos los partos registrados en dicha unidad. Al analizar la tabla, se puede observar, por tanto, que solo el 1,04% de todas las PI realizadas en Asturias son gestaciones procedentes de la Unidad de Reproducción del HUCA en ese año.

Por el contrario, en el último año del periodo de estudio (2019), no se realizó ninguna técnica invasiva en la Unidad de Reproducción del HUCA, como se puede observar en la tabla. En todo el territorio asturiano, sin embargo, se llegaron a realizar un total de 206.

En 2016 fue el único año, durante todo el periodo de estudio, en el que se llevó a cabo una prueba invasiva en una paciente a la que se le realizó una TEC. En este mismo año, también se realizó otra PI a una paciente sometida a FIV/ICSI, suponiendo, de esta forma, el 2,70% del total de partos de la unidad. Además, se registró, sin tener en cuenta el año 2019, el menor porcentaje (0,75%) de PI ejecutadas en el HUCA respecto del total (265 PI) realizadas en la comunidad de Asturias durante todo el periodo de estudio.

Otro aspecto a destacar es el porcentaje total de estudios prenatales invasivos realizados en las gestantes de la Unidad de Reproducción del HUCA respecto del total de pruebas invasivas registradas en toda la comunidad autónoma de Asturias, que fue de tan solo un 0,88%.

En cuanto al porcentaje de pruebas invasivas realizadas en la Unidad de Reproducción del HUCA sobre el número total de partos registrados en Asturias observado en la última columna de la tabla, se puede apreciar cómo este llega a ser prácticamente nulo en cada año, siendo un 0,07% el mayor porcentaje obtenido durante los años 2014 y 2015.

Finalmente, haciendo referencia a la tendencia seguida en la realización de los estudios prenatales invasivos durante todo el periodo de estudio, se puede observar cómo esta resulta ser, claramente, descendente con el paso de los años.

Haciendo una visión general de los resultados mostrados en esta tabla, se puede observar que el número de pruebas invasivas realizadas a las pacientes de la Unidad de Reproducción del HUCA, desde el año 2014 hasta el año 2019, es muy bajo, teniendo en

cuenta el número total de estudios prenatales invasivos realizados en toda la comunidad de Asturias, y el número total de partos registrados en dicha comunidad.

#### 4.5 Análisis de los resultados de los estudios prenatales invasivos

En la siguiente tabla (Tabla 6), se muestran los resultados obtenidos de los estudios prenatales invasivos realizados a las pacientes de la Unidad de Reproducción del HUCA, diferenciándolos por TRA, durante todo el periodo en el que se desarrolla este trabajo (2014-2019).

TÉCNICA	EDAD	PESO (KG)	INDICACIÓN	RESULTADO PRENATAL
FIV/ICSI	39	2,810	Edad	46,XY
FIV/ICSI	34	2,790	Test combinado alto riesgo	46,XX
FIV/ICSI	39	2,880	Test combinado alto riesgo	46,XX
FIV/ICSI	31	1,915	Marcador ecográfico	46,XY
FIV/ICSI	36	2,900	Cribado positivo	46,XY
FIV/ICSI	32	3,100	Marcadores bioquímicos 2º T	46,XY
FIV/ICSI	35	2,700	Gestación gemelar	46,XX
FIV/ICSI	35	2,075	Gestación gemelar	46,XY
FIV/ICSI	38	2,465	Cariotipo alterado	46,XY
IAC	35	2,545	Gestación gemelar	46,XY
IAC	35	2,545	Gestación gemelar	46,XY
IAC	37	2,475	Gestación gemelar	46,XY
IAC	37	-	Gestación gemelar	47,XY,+18
IAC	39	3,600	Riesgo T21	46,XX
TEC	43	3,410	Riesgo test combinado	46,XY

**Tabla 6.** Resultados de estudios prenatales invasivos realizados a pacientes de la Unidad de Reproducción del HUCA, y clasificados por TRA, desde el año 2014 hasta el año 2019.

En la tabla, se puede apreciar también la edad de las pacientes, el peso de los recién nacidos, y la indicación, a partir de la cual se ha decidido realizar la prueba invasiva. La edad media de las pacientes se estimó en 36,5 años y el peso medio de los recién nacidos fue de 2,547 kg. Un aspecto importante a destacar es el hecho de que en la mayoría de los recién nacidos (10/15 recién nacidos) se registró un peso normal, es decir, un peso

comprendido entre 2,5 y 4 kg. Tan solo en 4 de ellos se registró un peso bajo (< 2,5 kg), 3 procedentes de una FIV/ICSI, y una correspondiente a una IAC.

En el caso del único cariotipo alterado correspondiente a un Síndrome de Edwards o Trisomía 18, se puede observar que en la tabla no aparece el peso del recién nacido. Esto se debe al hecho de que, en este caso, se realizó una interrupción legal del embarazo.

Respecto al porcentaje de las TRA empleadas para conseguir el embarazo en las pacientes, se obtuvieron los siguientes resultados: un 66,7% de los ciclos fueron de FIV/ICSI; en el 25% de los casos, se llevó a cabo la IAC, y, finalmente, en un 8,3% de los ciclos realizados, que equivale a una única paciente, se utilizó la TEC. Otro aspecto a destacar fue el hecho de que en 7 de las 12 pacientes (58,3% de los casos), el parto tuvo lugar mediante cesárea.

Al analizar el tipo de gestación sometida a una prueba invasiva, se puede apreciar que 6 de las 15 pruebas se realizaron en una gestación gemelar, y que la mayoría de estas (4/6 gestaciones gemelares) se dieron en casos de IAC. Las indicaciones para realizar un estudio prenatal invasivo fueron las siguientes: test combinado de alto riesgo, marcador ecográfico, marcadores bioquímicos del 2º trimestre, malformación fetal, test de ADN fetal no invasivo de alto riesgo y edad. La edad, actualmente, no se considera una indicación de riesgo para realizar una prueba invasiva en las unidades de fisiopatología fetal del territorio asturiano, así como en gran parte de los hospitales públicos o privados del resto del país. Sin embargo, sí se consideraba una indicación de riesgo hace unos años. A pesar de esto, puede existir, a día de hoy, algún hospital o alguna clínica que siga considerando la edad como una indicación para estos casos. Es posible, por tanto, que el único caso que aparece en la tabla considerando la edad un factor de riesgo o indicación, se tradujera, en su día, en un caso de ansiedad que presentó la paciente, y que se acompañó de un informe emitido por un psicólogo clínico o un psiquiatra.

Atendiendo a los resultados prenatales, se puede observar cómo en 14 de las 15 pruebas invasivas realizadas (93,3%), se obtuvo un cariotipo normal con 46 cromosomas, obteniéndose, de esta forma, un único resultado de un cariotipo alterado que mostraba una aneuploidía (6,7%). Este caso resultó ser un feto con Síndrome de Edwards o Trisomía 18 (47, XY, +18), procedente de una IAC.



En la tabla que se muestra a continuación (Tabla 7), se observan los resultados prenatales de pacientes que en algún momento acudieron a la Unidad de Reproducción del HUCA debido a algún problema de fertilidad, y que, posteriormente, quedaron embarazadas, pero no como resultado de un ciclo realizado en el HUCA. De esta forma, se barajan dos posibilidades, que son las siguientes:

1ª) Las gestaciones de las pacientes se produjeron de forma espontánea.

2ª) Las gestaciones de las pacientes se produjeron tras acudir a otro centro de reproducción.

Esta tabla se ha realizado como consecuencia del bajo número de pacientes sometidas a estudios prenatales durante el primer rastreo (12 pacientes = 15 estudios prenatales, Tabla 5). En este caso, todos los resultados prenatales procedían de amniocentesis realizadas en muestras de líquido amniótico.

<b>RESULTADO PRENATAL</b>	<b>N</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<b>46,XY</b>	20	TRA en nuestro centro o en otro. Gestaciones espontáneas tras acudir a consulta por problemas de fertilidad, o durante el período de lista de espera.
<b>46,XX</b>	19	TRA en nuestro centro o en otro. Gestaciones espontáneas tras acudir a consulta por problemas de fertilidad, o durante el período de lista de espera.
<b>47,XY,+21</b>	6	3 gestaciones espontáneas durante periodo de lista de espera. 3 gestaciones espontáneas durante periodo de lista de espera o pendiente de estudio.
<b>47,XX,+21</b>	2	1 consulta en el HUCA: No se hace ciclo por edad superior a 40 años. 1 tras recibir el alta en el HUCA sin gestación.
<b>47,XY,+13</b>	1	Gestación espontánea en lista de espera.
<b>47,XX,+18</b>	2	1 Gestación espontánea en lista de espera. 1 Gestación en otro centro.
<b>47,XY,+18</b>	1	Ciclo de IAC en otro centro. Gestación gemelar.
<b>46,XY,DEL(7)(P21.1;P14.1)</b>	1	Ciclo de DGP tras recibir el alta en el HUCA sin gestación.
<b>46,XX,T(9;13)(P13;Q22)DN</b>	1	Ciclo de FIV en otro centro.
<b>TOTAL</b>	53	

**Tabla 7.** Resultados de estudios prenatales invasivos realizados a pacientes que acudieron a la Unidad de Reproducción del HUCA en algún momento desde el año 2014 hasta el año 2019.

Los resultados prenatales de la mayoría de las pruebas invasivas que se realizaron (39/53 amniocentesis, es decir, un 73,6%), mostraron un cariotipo normal (46,XX/46,XY). Estas pacientes se habían sometido, previamente, a una TRA, ya fuese en el HUCA o en otro centro, y quedaron embarazadas de forma espontánea tras acudir a consulta por posibles problemas de fertilidad o durante el periodo de lista de espera. El resto de resultados prenatales dieron lugar un cariotipo alterado (26,4%), predominando las aneuploidías (12/14 amniocentesis), y mostrando, por tanto, solo dos anomalías estructurales.

Por un lado, los cariotipos de las aneuploidías fueron los siguientes: ocho Síndromes de Down o T21 (seis fetos masculinos 47,XY,+21 / dos fetos femeninos 47,XX,+21); un Síndrome de Patau o T13 (47,XY,+13), y tres Síndromes de Edwards o T18 (dos fetos femeninos 47,XX,+18 / un feto masculino 47,XY,+18). Como se observa en la tabla, estas gestaciones se produjeron, en su mayoría, de forma espontánea, a excepción de dos gestaciones que tuvieron lugar gracias a ciclos realizados en otros centros, cuyos cariotipos se corresponden con dos Síndromes de Down.

Por otro lado, las anomalías estructurales mostraron los siguientes cariotipos: una deleción de las bandas o regiones 21.1 a 14.1 del brazo corto del cromosoma 7 (46,XY, del(7)(p21.1;p14.1)), y una translocación recíproca entre la banda 13 del brazo corto del cromosoma 9 y la banda 22 del brazo largo del cromosoma 13 ((46,XX, t(9;13)(p13;q22)dn). Al analizar la tabla, se puede observar cómo en estos dos casos, las gestaciones se produjeron gracias a ciclos realizados en otros centros de reproducción, siendo un ciclo de DGP tras recibir el alta en el HUCA, en el caso de la deleción, y un ciclo de FIV en el caso de la translocación recíproca.

Teniendo en cuenta el número total de pacientes que acudieron en alguna ocasión al HUCA (53 pacientes), se puede calcular el porcentaje de aquellas pacientes que presentaron algún problema de fertilidad. Para ello, se divide el número total de pacientes entre el número total de estudios prenatales invasivos que se realizaron en todo el territorio asturiano (1694 PI). El resultado obtenido es de un 3,13% de pacientes sometidas a técnicas invasivas con algún problema de fertilidad.

#### 4.6 Análisis estadístico de los estudios prenatales invasivos entre las pacientes sometidas a TRA y la población general

Para valorar si existían diferencias significativas en la incidencia de estudios prenatales invasivos entre las pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida y la población general, se revisaron los datos obtenidos del número total de pruebas invasivas y partos registrados en la Unidad de Reproducción de HUCA, y el número total de pruebas invasivas y partos registrados en toda la comunidad. Aunque estos datos se recogen en las diferentes tablas que se han ido mostrando a lo largo del análisis de los resultados, a continuación, quedan recogidos en la siguiente tabla (Tabla 8) de una forma más clara.

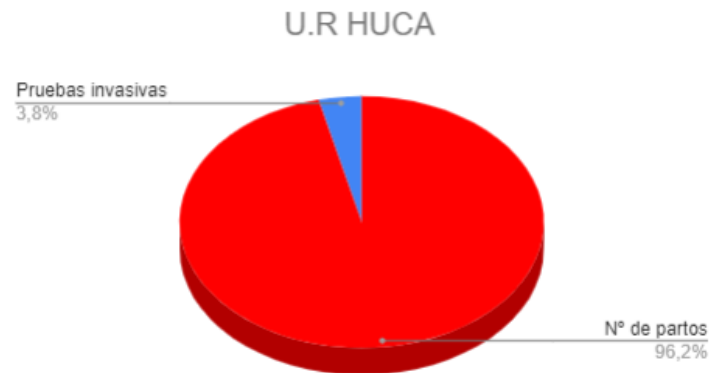
	HUCA	POBLACIÓN GENERAL
<b>PRUEBAS INVASIVAS</b>	15	1694
<b>PARTOS</b>	393	34920
<b>PORCENTAJE (%)</b>	3,8	4,9

**Tabla 8.** Relación entre el número total de pruebas invasivas y número total de partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA y en toda la comunidad autónoma de Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019.

Una vez recogidos estos datos, se procedió a llevar a cabo el análisis estadístico, y se planteó una hipótesis inicial, en la que se esperaban diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de estudios prenatales invasivos entre las pacientes sometidas a TRA y la población general. El resultado esperado tras la hipótesis planteada era encontrar una mayor incidencia en la realización de PI en pacientes sometidas a TRA en comparación con las gestantes de la población general asturiana.

Tras realizar dicho análisis estadístico mediante el programa R, los datos obtenidos mostraron que no había diferencias estadísticamente significativas, pudiéndose incluso llegar a considerar iguales, ya que el resultado de “p-valor” fue muy superior a 0,05 ( $p = 0,427$ ). El IC del 95% para la proporción fue de 2,23-6,36. Por tanto, se rechazó la hipótesis planteada inicialmente.

A continuación, se muestran las gráficas en las que se observa la relación entre el número de pruebas invasivas y número total de partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA y en todo el territorio asturiano.



**Figura 4.** Porcentaje de pruebas invasivas realizadas en pacientes sometidas a TRA en la U.R del HUCA en relación con el número total de partos registrados en la misma unidad desde el año 2014 hasta el año 2019.



**Figura 5.** Porcentaje de pruebas invasivas realizadas en gestantes que concibieron de forma espontánea en relación con el número total de partos registrados en toda la comunidad autónoma de Asturias desde el año 2014 hasta el año 2019.

Al observar ambas gráficas, podemos apreciar, en primer lugar, el número tan bajo de estudios prenatales invasivos que se realizaron en ambos grupos, es decir, tanto en la U.R del HUCA como en la población general de todo el territorio asturiano. En segundo lugar, también es claramente visible que el porcentaje de pruebas realizadas en ambos grupos es muy similar, tal y como se comentó anteriormente, indicando que no había



diferencias significativas entre ambos grupos, y rechazando, por tanto, la hipótesis planteada en un principio.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Edad media de las pacientes sometidas a estudio

En la actualidad, no existe un consenso sobre la edad adecuada para lograr el embarazo, sin embargo, sí se ha demostrado un aumento significativo en el número de mujeres que deciden tener hijos a edades de entre 30 y 40 años, e incluso a una edad superior a los 40 años (Martínez-Galiano, 2016). Es por esto, por lo que, en los últimos años, se ha producido un aumento de embarazos en mujeres de edad avanzada. En el caso de España, se registraron 27.875 nacimientos en 2013 procedentes de mujeres con una edad igual o superior a 35 años, lo que representa el 6,7% de todos los nacimientos en España. Este porcentaje aumentó en 2017 hasta un 7,4% (Molina-García et al., 2019a).

Todo lo mencionado anteriormente se corresponde con los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la edad media de las pacientes sometidas a TRA en la Unidad de Reproducción del HUCA durante todo el periodo de estudio (2014-2019). En estos resultados, y como se puede observar en la tabla 1, la edad media de las pacientes fue superior a 35 años en los ciclos de FIV/ICSI, mientras que dicha edad resultó ser de unos 34 años en el caso de los ciclos de IA, siendo inferior a los 35 años, edad a partir de la cual se entiende como edad avanzada. Es normal que en IA la edad sea inferior, ya que existe un criterio interno que establece que, si la edad de las pacientes es superior a los 38 años, no se realice dicha técnica debido a la baja eficacia que presenta. Al ser el HUCA un hospital público, este debe regirse por la normativa establecida en la “Cartera de Servicios Comunes del Sistema Nacional de Salud, incluidos los tratamientos de Reproducción Humana Asistida”, recogida en el Boletín Oficial del Estado (BOE) Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre. En este documento, se indica la edad mínima y máxima que debe tener una mujer para someterse a una TRA en una institución pública, estableciéndose una edad máxima de 35 años (en el momento de inicio del estudio de esterilidad) para someterse a una IAC, 38 años para una IAD y 40 años para una FIV/ICSI (BOE, 2014). Debido a esto, en nuestro estudio la edad media de las pacientes está condicionada por la legislación actual y por el acceso a las TRA en el Sistema Público de Salud. En el ámbito privado, sin embargo, no ocurre lo mismo debido a que no existe tal

normativa, por lo que aquellas mujeres con una edad superior a 40 años, que desean ser madres, deben acudir a centros privados.

El retraso de la maternidad, por tanto, es un hecho cada vez más frecuente que ocurre en todo el mundo. Entre los motivos de este retraso se encuentran la necesidad y deseo de establecer una mejor preparación profesional, mejores condiciones económicas, y una estabilidad laboral y familiar (Legazpe Moraleja, 2016; Molina-García, 2019b). En una encuesta nacional de fertilidad realizada a 14.446 mujeres en España en 2018, se descubrió que el 26,15% de las mujeres mayores de 35 años que no habían tenido hijos, habían retrasado la maternidad porque no tenían una relación estable; el 3,25% porque decían ser demasiado jóvenes para ser madres; el 13,27% no habían querido ser madres; el 3,08% tenían que seguir estudiando para desarrollar una carrera profesional, y poder conseguir una estabilidad en el mercado laboral y la consolidación de una formación académica; el 17,94% por razones laborales y la conciliación de la vida familiar y laboral; el 10,56% por razones económicas; el 17,57% por razones de salud, y el 8,18% por otras razones (Instituto Nacional de Estadística, 2018). Por tanto, el desempleo juvenil, los contratos temporales y las condiciones inestables del mercado laboral generan un contexto de “inseguridad” económica que da lugar al aplazamiento del primer nacimiento debido a la imposibilidad de tomar decisiones vinculantes a largo plazo (Ní Bhrolcháin y Beaujouan, 2012; Rybińska, 2014).

## 5.2 Análisis de los ciclos de TRA de la Unidad de Reproducción del HUCA

Como consecuencia del retraso de la maternidad, la preservación de la fertilidad y, por tanto, la criopreservación de ovocitos, se han convertido en dos técnicas fundamentales dentro de la reproducción asistida para proporcionar a las mujeres que quieran retrasar su maternidad una gran oportunidad (Tarín et al., 2017). La razón detrás de los embarazos de edad materna avanzada que conlleva la utilización de ovocitos, ya sea a través de un programa de donación de óvulos o usando ovocitos propios criopreservados, es que el embrión que se consigue en último término se obtiene a partir de un ovocito de edad más joven y, por lo tanto, los aspectos perjudiciales de un embarazo relacionados con la edad biológica de los ovocitos no tienen lugar (Simopoulou et al., 2018). En el HUCA, la preservación de la fertilidad se realiza, únicamente, por motivos médicos, es decir, pacientes oncológicas que se van a someter a tratamientos

gonadotóxicos, y a las cuales se les recomienda criopreservar sus ovocitos para que puedan ser utilizados en un futuro, en el caso de que decidan ser madres.

En los últimos años, las mejoras en las técnicas de criopreservación (vitrificación/desvitrificación) y el desarrollo de protocolos de estimulación ovárica más eficientes han facilitado un aumento drástico en la práctica de la transferencia de embriones criopreservados (TEC) (ESHRE et al., 2017; Bosch et al., 2020). Los resultados obtenidos a partir de los registros europeos, recogidos en el decimonoveno informe de la ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) sobre TRA hasta el año 2015, demostraron que el mayor incremento en el número de tratamientos de TRA se observó en la técnica de transferencia de embriones criopreservados (TEC), superando en un 13,6% los datos registrados en el año 2014 (De Geyter et al., 2020). Los datos procedentes de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE.UU. también confirmaron un importante aumento en la realización de transferencias de embriones criopreservados desde 2005 hasta 2014, consiguiendo un aumento de un 20% (2005) a un 50% (2014) (Groenewoud et al., 2018). Pese a esto, la calidad de los datos obtenidos es variable e imprecisa, destacando la necesidad de registros nacionales e internacionales más rigurosos diseñados para recopilar información detallada sobre indicaciones, uso, protocolos, seguridad y eficiencia de la criopreservación reproductiva tanto de ovocitos como de embriones (por ejemplo, rendimientos por ciclo y por indicación) (Bosch et al., 2020). Los datos recogidos en la bibliografía mencionada anteriormente coinciden con los resultados obtenidos en nuestro estudio (Tabla 2), ya que se puede observar una notable tendencia ascendente en la realización de la TEC en pacientes de la Unidad de Reproducción del HUCA desde el año 2014 hasta el año 2019.

Junto con la TEC, otra técnica que ha mostrado una tendencia ascendente en los resultados obtenidos de nuestro estudio es la inseminación artificial con semen de donante (IAD), produciéndose un aumento en el número de ciclos con el paso de los años, exceptuando el año 2018, en el cual hubo un ligero descenso. Para la mayoría de mujeres solteras y parejas de mujeres, junto con algunas parejas heterosexuales, el uso de semen de un hombre fértil, sano y cuidadosamente seleccionado sigue siendo la opción más adecuada para conseguir el embarazo. En particular, para las mujeres sin pareja masculina, la IAD es la opción más segura y efectiva posible, siempre y cuando la mujer

no presente edad avanzada ( $> 35$  años), ya que, en este caso, la tasa de éxito disminuiría notablemente. Es por esto, por lo que las mujeres solteras y las parejas de mujeres son las que generan la mayor demanda de IAD en la actualidad (O'Reilly et al., 2017; Zhang et al., 2019). Según los últimos datos publicados por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia hasta el año 2012, el número total de ciclos de IAD fue de 7.035 ciclos durante 2012, produciéndose así un notable aumento desde el año 2000 (1.957 ciclos de IAD) (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018a). Al revisar, por otro lado, los últimos datos publicados por el Registro Nacional de Actividad de la Sociedad Española de Fertilidad, se observó que el número total de ciclos de IAD en 2017 fue de 12.765 ciclos, consiguiendo realizar, de esta forma, 432 ciclos más que en el año 2016, y 821 ciclos más que en 2015 (Sociedad Española de Fertilidad, 2017). Por tanto, teniendo en cuenta toda esta información, se demuestra cómo desde el inicio del siglo XXI, y más concretamente en los últimos años, la realización de la técnica de IAD ha sufrido un drástico aumento, debido, en gran parte, al aumento de la demanda de esta técnica por parte de mujeres solteras y parejas de mujeres, como se mencionó anteriormente.

Un aspecto fundamental a tratar, que está relacionado con la técnica IAD, es la realización del cribado de donantes, o test de compatibilidad genética (test de portadores), para detectar si dichos donantes son portadores de enfermedades recesivas hereditarias comunes, susceptibles de ser transmitidas a la descendencia. El proceso de selección de donantes brinda a la pareja, o mujer soltera, la oportunidad de minimizar el riesgo de heredar una enfermedad recesiva al evitar donantes que portan mutaciones que son genéticamente incompatibles con la receptora de dicho semen (Silver et al., 2016). Por tanto, este cribado no solo se utiliza como forma de selección de un donante que no sea portador de enfermedades recesivas, sino también para seleccionar aquel donante que sea compatible genéticamente con la mujer receptora, y que, en el caso de ser portador de una enfermedad recesiva, no coincida con una receptora que sea portadora de la misma enfermedad recesiva (Lazarin y Haque, 2016).

Todos los bancos, ya sean bancos de ovocitos o de semen, deben realizar un cribado genético básico a sus donantes, en el cual dicho cribado, por su prevalencia, penetrancia y gravedad, debe incluir el análisis de variantes patogénicas relacionadas con las siguientes enfermedades: la fibrosis quística, la atrofia muscular espinal, la sordera neurosensorial no sindrómica, la alfa y beta talasemia, y la anemia falciforme. Y en

donantes de ovocitos, además, se realiza el estudio molecular del gen FMR1 relacionado con el Síndrome del X frágil. Aquellos donantes que presenten variantes patogénicas para las enfermedades incluidas en el cribado genético básico, solo podrán ser seleccionados cuando se descarte la existencia de variantes patogénicas en la receptora, realizando lo que se conoce como *matching genético*. En el caso del estudio molecular del Síndrome del X-Frágil, los donantes serán descartados según el riesgo de transmitir dicho síndrome (Castilla et al., 2019).

Es importante destacar que, con el test de compatibilidad genética, como se ha mencionado anteriormente, se minimiza el riesgo de transmisión de enfermedades recesivas hereditarias a la descendencia, sin embargo, a día de hoy, es imposible evitar de forma absoluta la transmisión de enfermedades hereditarias graves a la descendencia (Silver et al., 2016). Por tanto, este cribado no garantiza que el feto vaya a ser 100% sano genéticamente. No obstante, gracias al cribado genético básico, *matching genético* y el control del número de nacidos por donante, este riesgo puede llegar a reducirse de manera muy significativa (Henneman et al., 2017; Castilla et al., 2019).

### 5.3 Análisis de los partos registrados en Asturias y en la Unidad de Reproducción del HUCA

El retraso de la maternidad también se ha visto acompañado de una disminución en el número de nacimientos en la última década. Según los datos registrados en el Instituto Nacional de Estadística (INE), tuvieron lugar en España 359.770 nacimientos durante 2019, lo que supuso un descenso del 3,5% respecto a 2018 (13.007 nacimientos menos). Esta tasa de nacimientos ha ido descendiendo durante la última década, a excepción del año 2014, en el cual se produjo un ligero ascenso (1.880 nacimientos más que en 2013). Al observar los datos recogidos por el INE, se puede apreciar un descenso de un 27,3% en la cifra de nacimientos desde 2009 hasta 2019 (Instituto Nacional de Estadística, 2019). Atendiendo a los resultados de nuestro estudio, se puede deducir una coincidencia con respecto a los datos registrados en el INE, ya que al consultar nuestros resultados (Tabla 3) se detecta un descenso en el número de partos en todo el territorio asturiano desde el año 2014 hasta el año 2019, a excepción del año 2016, en el que se produjo un pequeño aumento, sin que este llegue a ser significativo (33 partos más que en 2015). En el caso de los partos registrados en la Unidad de Reproducción del HUCA (Tabla 4), la tendencia

descendente no es tan clara, ya que se observan dos picos máximos (2015 y 2017) durante todo el periodo de estudio. No obstante, como visión general de la tabla, sí se puede apreciar una notable disminución en la cifra de partos, especialmente a partir del año 2017. Este descenso en el número de partos/nacimientos, al igual que ocurre con el retraso de la maternidad, también se debe a las razones sociales y/o médicas mencionadas anteriormente, pero, en este caso, el resultado llega a ser considerablemente más drástico, ya que no solo se produce un retraso en la maternidad, sino que cada vez es más frecuente el pensamiento de no querer ser madres por parte de muchas mujeres, dando lugar, de esta forma, a un descenso de la tasa de natalidad cada vez más notorio.

#### 5.4 Análisis de los resultados de los estudios prenatales invasivos

Como se mencionó al inicio del trabajo, desde hace años una gran cantidad de autores han puesto de manifiesto una cierta preocupación por el aumento de complicaciones obstétricas y perinatales asociadas a las TRA, que podrían provocar que los bebés concebidos a través de dichas técnicas presentasen un mayor riesgo que los concebidos espontáneamente. Brindar respuestas exhaustivas sigue siendo difícil debido a los continuos cambios en la práctica de las TRA, es decir, nuevos medios de cultivo, suplementos, condiciones de incubación. Además, también hay que tener en cuenta los numerosos factores influyentes, como la edad de la pareja, la infertilidad masculina y femenina o el estilo de vida, que pueden estar asociados con una pérdida de embarazo y/u otras complicaciones (Zacchini et al., 2019). Entre los diferentes riesgos asociados a las TRA se encuentran: el bajo peso al nacer, las anomalías congénitas y genéticas, las gestaciones múltiples, el aborto, el parto pretérmino y los riesgos a largo plazo (American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Obstetric Practice, 2016; Hoorsan et al., 2017).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre las pruebas invasivas realizadas a las pacientes sometidas a TRA en la Unidad de Reproducción del HUCA muestran que, en la mayoría de los casos (10/15 PI), los pesos de los recién nacidos entraban dentro del rango de peso normal ( $> 2,500$  kg), mientras que solo 4 de ellos registraron un bajo peso al nacer ( $< 2,500$  kg). Estos resultados, por tanto, no coinciden con la hipótesis planteada en nuestro trabajo sobre obtener unos resultados perinatales negativos, los cuales se atribuyen, en este caso, a recién nacidos con bajo peso. Varios estudios controlados de

resultados perinatales, que comparan gestaciones concebidas mediante TRA y gestaciones espontáneas, afirman que los recién nacidos concebidos mediante TRA no están asociados con un bajo peso (Joy et al., 2008; Morcel et al., 2010; Neumann et al., 2018). En contraposición a esto, varios metaanálisis realizados demuestran un aumento en el riesgo de complicaciones en gestaciones tras TRA, entre las que se encuentran el bajo peso de los recién nacidos (Bergh y Wennerholm, 2012; Wen et al., 2012; Qin et al., 2015; Boulet et al., 2016).

Respecto a las anomalías genéticas, y más concretamente las cromosómicas, nuestros resultados procedentes de la Unidad de Reproducción indicaron en todos los casos un cariotipo normal (46,XX/46,XY), exceptuando un único resultado que mostró un cariotipo alterado correspondiente a una Trisomía 18 o Síndrome de Edwards, resultando, finalmente, en una interrupción legal del embarazo. Los resultados procedentes de las pacientes que en algún momento acudieron al HUCA por problemas de fertilidad, también estaban en la misma dirección, es decir, en un 73,6% de los casos (39/53 PI) se obtuvo un cariotipo normal. Con respecto a los cariotipos alterados encontrados en estas pacientes, en este caso, se obtuvo un mayor porcentaje de cariotipos con anomalías cromosómicas (26,4%), entre las cuales se encontraban algunos Síndromes de Down, Síndromes de Edwards, un Síndrome de Patau, una delección y una translocación recíproca. Todos estos resultados tampoco concuerdan con nuestra hipótesis, ya que, en su mayoría, lo que se obtuvo fueron resultados perinatales positivos que mostraban cariotipos normales. En el caso de las anomalías cromosómicas, al igual que en el riesgo de bajo peso al nacer, también existen controversias entre los autores, sin embargo, en este caso, existen más evidencias que afirman que las anomalías cromosómicas están asociadas con la infertilidad de la pareja y no con la TRA en sí (Bonduelle et al., 2002; Kim et al., 2010; Long et al., 2011; Özdemir et al., 2019; Wang et al., 2020).

Atendiendo a los riesgos de gestaciones múltiples asociadas con las TRA, nuestros resultados indicaron, en 6 de las 15 pruebas invasivas realizadas (40%), una gestación gemelar. Por tanto, los resultados de nuestro estudio no coinciden, de nuevo, con nuestra hipótesis, ya que la mayoría de las gestaciones fueron únicas y no múltiples. En la última década, el aumento significativo de la incidencia de gestaciones múltiples en la mayoría de los países se ha atribuido al uso de gonadotropinas y otros fármacos para inducir la



estimulación ovárica (Crosignani et al., 2007; Diamond et al., 2011). Otros dos estudios realizados en EE.UU. a mujeres gestantes, mostraron un mayor riesgo de gestaciones múltiples asociadas con las TRA en comparación con las gestaciones concebidas de forma espontánea, sin embargo, en este caso, no llegaron a especificar el origen de dicho riesgo (Kissin et al., 2014; Luke, 2017).

Las gestaciones múltiples se asocian, a su vez, con una alta tasa de mortalidad perinatal. Según un informe realizado en 2016 por MBRRACE-UK (Mothers and Babies: Reducing Risk through Audits and Confidential Enquiries across the UK), la tasa de mortalidad perinatal en gestaciones gemelares fue tres veces mayor que en gestaciones únicas (Draper et al., 2018). Los resultados encontrados en otros estudios (Wisborg et al., 2010; Marino et al., 2014) coinciden con dicho informe, ya que en ellos también se muestra una asociación significativa entre las TRA y un mayor riesgo de muerte fetal. Respecto a nuestros resultados, estos vuelven a ser positivos en contraposición con la hipótesis planteada y lo expuesto por los estudios anteriores, ya que después de las 6 PI realizadas solo se produjo una muerte fetal, y esta fue debida a una interrupción legal, como se mencionó anteriormente. Esto concuerda con otros dos estudios retrospectivos en los que no se encontró una asociación significativa de las TRA con un mayor riesgo de muerte fetal (Henningsen et al., 2015; Yang et al., 2018).

Finalmente, respecto a los riesgos a largo plazo de los bebés concebidos mediante TRA, es importante destacar que en nuestro estudio no se han podido mostrar resultados relacionados con dichos riesgos, ya que, para ello, es necesario un seguimiento de los recién nacidos hasta la etapa de adolescencia, e incluso hasta la edad adulta, puesto que muchas de las enfermedades que pueden aparecer como consecuencia de estos tratamientos tienen lugar con el paso de los años. Lo mismo ocurre con el riesgo de errores epigenéticos asociados al uso de TRA, que provocan modificaciones en la impronta genómica, contribuyendo así al inicio de una enfermedad durante la etapa de adolescencia o edad adulta, e incluso en las generaciones posteriores (Zacchini et al., 2019). Varios estudios afirman que las exposiciones adversas en el desarrollo embrionario temprano, que producen marcas epigenéticas alteradas (epimutaciones), aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas, cardiovasculares, psiquiátricas (autismo) y otras enfermedades complejas a lo largo de la vida del bebé, como puede ser el desarrollo de



algún tipo de cáncer (leucemia) (Chen y Zang, 2011; Vrooman y Bartolomei, 2017; Jiang et al., 2017; Meister et al., 2018).

Dichas alteraciones epigenéticas pueden estar asociadas con las condiciones *in vitro* (Cantone y Fisher, 2013) y con la subfertilidad masculina, la cual se ha visto asociada con alteraciones en la metilación del ADN espermático (Kobayashi et al., 2009; El Hajj et al., 2011; Zacchini et al., 2019). Diversos estudios han demostrado una asociación entre los trastornos de impronta genómica, como el Síndrome de Beckwith-Wiedemann y el Síndrome de Angelman, y las TRA (Manipalviratn et al., 2009; Bergh y Wennerholm, 2012). Además, también hay que destacar que, aunque la mayoría de las anomalías cromosómicas autosómicas pueden diagnosticarse al nacer, la mayoría de las anomalías cromosómicas sexuales (excepto el Síndrome de Turner) no se revelan clínicamente hasta la pubertad (Özdemir et al., 2019).

Es por todo esto, por lo que existe una necesidad urgente de realizar un seguimiento a todos los bebés concebidos mediante TRA a lo largo de toda su vida, incluyendo la adolescencia y la edad adulta. Actualmente, no existe ningún registro a nivel nacional que informe de toda la gestión del sistema de pacientes dentro del campo de la Reproducción Humana Asistida, incluyendo los registros tanto del ámbito público como del privado, para así poder tener un mayor número de datos almacenados que nos permitan realizar, entre otras cosas, estudios con un mayor tamaño muestral que proporcionen unos resultados más representativos y significativos. Además del registro nacional, también sería necesario el diseño de un registro internacional en el que se almacene toda la información propia de un registro nacional, es decir, información sobre tratamientos, técnicas, tipos de embarazos, tipos de pruebas invasivas realizadas, incidencia de estas, etc., pero incluyendo a todos los países a nivel mundial, o dentro de un menor rango, a nivel europeo. Actualmente, existe el Comité Internacional de Monitoreo de Tecnologías Reproductivas Asistidas (ICMART), el cual informa de las tendencias de práctica de TRA a lo largo de los años en 50 países (Mansour et al., 2014).

En España, se ha diseñado, recientemente, el Sistema de Información de Reproducción Humana Asistida (SIRHA). Sin embargo, este sistema sólo registra y gestiona la información correspondiente a los donantes de gametos y preembriones con fines reproductivos. Además de las limitaciones que presenta este sistema, al no

proporcionar toda la información correspondiente al resto de tratamientos de TRA de las parejas o mujeres que desean concebir un bebé, se suma el hecho de que muchas clínicas aún no son conocedoras del código que les permite acceder a dicho sistema, ya que aún se encuentra en proceso de implantación.

### 5.5 Análisis estadístico de los estudios prenatales invasivos entre las pacientes sometidas a TRA y la población general

El análisis estadístico que se llevó a cabo utilizando el programa R, se realizó para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de estudios prenatales invasivos entre las pacientes sometidas a TRA y la población general asturiana. Inicialmente, la hipótesis planteada afirmaba una mayor incidencia en la realización de PI en pacientes sometidas a TRA en comparación con las PI realizadas a la población general, es decir, planteaba la existencia de diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, el resultado del análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, llegando incluso a demostrar una igualdad en los resultados debido al alto valor de “p-valor”, siendo este muy superior a 0,05 ( $p = 0,427$ ). Pese a esto, nuestros resultados coinciden con otro estudio en el que se analizaban los resultados de 172 amniocentesis realizadas a gestantes procedentes de TRA y 286 de gestantes que concibieron de forma espontánea (Daskalakis et al., 2009).

### 5.6 Limitaciones y puntos fuertes del estudio

El hecho de que estos resultados, junto con los analizados a lo largo del trabajo, no hayan sido los esperados según las hipótesis planteadas pueden deberse a una serie de limitaciones que hemos podido encontrar a lo largo del estudio. La principal limitación a la que nos hemos enfrentado es el sesgo al que está sometida la muestra y su pequeño tamaño, ya que, únicamente, hemos podido evaluar los datos de las pacientes registradas en el HUCA a la hora de analizar las PI de las pacientes sometidas a TRA, es decir, no se han podido analizar los datos de las gestantes sometidas a TRA de todos los centros públicos y privados asturianos durante los 5 años que ha durado el estudio. Esto lleva a la necesidad, comentada anteriormente, de elaborar un registro nacional que ayude al personal clínico a acceder a los datos de todas las pacientes que decidan someterse a una TRA, para así poder facilitar la elaboración de proyectos con resultados más significativos y representativos, y también para facilitar la información a los profesionales, evitando así

que tengan que indagar en el historial clínico de la paciente o pareja. Otra limitación es la asistencia de las pacientes o parejas a otras clínicas, lo cual hace que la información no siempre sea accesible.

Entre los puntos fuertes del trabajo, podemos destacar la homogeneidad de la muestra analizada, ya que, al tratarse de una institución pública, tanto los protocolos como los criterios de inclusión y exclusión se encuentran bien definidos y, por tanto, ayuda a reducir la variabilidad entre casos, aunque el tamaño muestral sea muy pequeño.

## 6. CONCLUSIONES

- No existe un mayor riesgo de complicaciones perinatales en gestaciones concebidas tras TRA que en gestaciones espontáneas.
- No hay una mayor incidencia de pruebas invasivas para el diagnóstico prenatal en pacientes sometidas a TRA que en la población general asturiana.
- No hay evidencias suficientes que demuestren que el riesgo de complicaciones perinatales se deba a la propia TRA.
- Existe la necesidad urgente de diseñar un registro tanto a nivel nacional como a nivel global que permita almacenar toda la información acerca de las pacientes y parejas que decidan concebir un bebé mediante las TRA.
- Es fundamental la colaboración entre centros públicos y privados para apoyar un sistema informático que trate los datos como un registro común para facilitar su acceso y uso a los profesionales, y no como datos aislados.
- El sesgo de la muestra y su pequeño tamaño, junto con otras limitaciones, han promovido la obtención de resultados poco significativos y representativos.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, S. K., Luharia, A., Gould, C. P., MacDonald, F., Larkins, S., & Davison, E. V. (2006). Rapid prenatal diagnosis of common trisomies: discordant results between QF-PCR analysis and karyotype analysis on long-term culture for a case of trisomy 18 detected in CVS. *Prenatal diagnosis*, 26(12), 1160–1167.

American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Obstetric Practice, Committee on Genetics, & U.S. Food and Drug Administration (2016).

Committee Opinion No 671: Perinatal Risks Associated With Assisted Reproductive Technology. *Obstetrics and gynecology*, 128(3), e61–e68.

Arian, S. E., Erfani, H., Westerfield, L. E., Buffie, A., Nassef, S., Gibbons, W. E., & Van den Veyver, I. B. (2020). Prenatal testing in pregnancies conceived by in vitro fertilization with pre-implantation genetic testing. *Prenatal diagnosis*, 40(7), 846–851

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. (2015). *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*. Madrid, España: Góballo.

Basatemur, E., Shevlin, M., & Sutcliffe, A. (2010). Growth of children conceived by IVF and ICSI up to 12years of age. *Reproductive biomedicine online*, 20(1), 144–149.

Basso, O., & Olsen, J. (2005). Subfecundity and neonatal mortality: longitudinal study within the Danish national birth cohort. *BMJ*, 330(7488), 393–394.

Bergh, C., & Wennerholm, U. B. (2012). Obstetric outcome and long-term follow up of children conceived through assisted reproduction. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*, 26(6), 841–852.

Boletín Oficial del Estado, 6 noviembre de 2014. Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre. Núm. 269, Sec. I. Pág. 91369. Recuperado de: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2014-11444>

Bonduelle, M., Van Assche, E., Joris, H., Keymolen, K., Devroey, P., Van Steirteghem, A., & Liebaers, I. (2002). Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Human reproduction*, 17(10), 2600–2614.

Bosch, E., De Vos, M., & Humaidan, P. (2020). The Future of Cryopreservation in Assisted Reproductive Technologies. *Frontiers in endocrinology*, 11, 67.

Boulet, S. L., Kirby, R. S., Reefhuis, J., Zhang, Y., Sunderam, S., Cohen, B., Bernson, D., Copeland, G., Bailey, M. A., Jamieson, D. J., Kissin, D. M., & States Monitoring Assisted Reproductive Technology (SMART) Collaborative (2016). Assisted Reproductive Technology and Birth Defects Among Liveborn Infants in Florida, Massachusetts, and Michigan, 2000-2010. *JAMA pediatrics*, 170(6), e154934.

- Brassesko, M. (2011). *Manual de Andrología*. Barcelona, España: Edikamed S.L.
- Caliskan, R., Atis, A., Aydin, Y., Acar, D., Kiyak, H., & Topbas, F. (2020). PAPP-A concentrations change in patients with gestational diabetes. *Journal of obstetrics and gynaecology*, 40(2), 190–194.
- Cantone, I., & Fisher, A. G. (2013). Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature structural & molecular biology*, 20(3), 282–289.
- Castilla, J. A., Abellán García, F., Alamá, P., Aura, M., Bassas, L., Clúa, E., de la Fuente, L. A., Guillén, J. J., Manau, D., Rueda, J., Ruiz, M., & Vendrell, X. (2019). *Cribado genético en donación de gametos*. Grupo de trabajo de Donación de Gametos y Embriones de la SEF, en colaboración con ASES, AEBM-ML, ASEBIR y AEGH. Madrid, España: Fase 20 S.L., 64p.
- Catford, S. R., McLachlan, R. I., O'Bryan, M. K., & Halliday, J. L. (2017). Long-term follow-up of intra-cytoplasmic sperm injection-conceived offspring compared with in vitro fertilization-conceived offspring: a systematic review of health outcomes beyond the neonatal period. *Andrology*, 5(4), 610–621.
- Cavoretto, P., Giorgione, V., Cipriani, S., Viganò, P., Candiani, M., Inversetti, A., Ricci, E., & Parazzini, F. (2017). Nuchal translucency measurement, free  $\beta$ -hCG and PAPP-A concentrations in IVF/ICSI pregnancies: systematic review and meta-analysis. *Prenatal diagnosis*, 37(6), 540–555.
- Chen, M., & Zhang, L. (2011). Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. *Drug discovery today*, 16(23-24), 1007–1018.
- Cortessis, V. K., Azadian, M., Buxbaum, J., Sanogo, F., Song, A. Y., Sriprasert, I., Wei, P. C., Yu, J., Chung, K., & Siegmund, K. D. (2018). Comprehensive meta-analysis reveals association between multiple imprinting disorders and conception by assisted reproductive technology. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(6), 943–952.
- Crosignani, P. G., Somigliana, E., & Intrauterine Insemination Study Group (2007). Effect of GnRH antagonists in FSH mildly stimulated intrauterine insemination cycles: a multicentre randomized trial. *Human reproduction*, 22(2), 500–505.

Daskalakis, G., Anastasakis, E., Papantoniou, N., Mesogitis, S., & Antsaklis, A. (2009). Second trimester amniocentesis in assisted conception versus spontaneously conceived twins. *Fertility and sterility*, 91(6), 2572–2577.

Daum, H., Ben David, A., Nadjari, M., Zenvirt, S., Helman, S., Yanai, N., Meiner, V., Yagel, S., Frumkin, A., Shkedi Rafid, S., & collaborating authors (2019). Role of late amniocentesis in the era of modern genomic technologies. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 53(5), 676–685.

De Geyter, C., Calhaz-Jorge, C., Kupka, M. S., Wyns, C., Mocanu, E., Motrenko, T., Scaravelli, G., Smeenk, J., Vidakovic, S., Goossens, V., & European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2020). ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE. *Human reproduction open*, 2020(1).

Diamond, M. P., Mitwally, M., Casper, R., Ager, J., Legro, R. S., Brzyski, R., Casson, P., Eisenberg, E., Zhang, H., & NICHD Cooperative Reproductive Medicine Network (2011). Estimating rates of multiple gestation pregnancies: sample size calculation from the assessment of multiple intrauterine gestations from ovarian stimulation (AMIGOS) trial. *Contemporary clinical trials*, 32(6), 902–908.

Draper, E. S., Gallimore, I. D., Kurinczuk, J. J., Smith, P. W., Boby, T., Smith, L. K., & Manktelow, B. N. (2018). MBRRACE-UK perinatal mortality surveillance report, UK perinatal deaths for births from January to December 2016. *The infant mortality and morbidity studies, department of health sciences, University of Leicester*.

El Hajj, N., Zechner, U., Schneider, E., Tresch, A., Gromoll, J., Hahn, T., Schorsch, M., & Haaf, T. (2011). Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sexual development*, 5(2), 60–69.

El-Chaar, D., Yang, Q., Gao, J., Bottomley, J., Leader, A., Wen, S. W., & Walker, M. (2009). Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction. *Fertility and sterility*, 92(5), 1557–1561.

ESHRE Working Group on Oocyte Cryopreservation in Europe, Shenfield, F., de Mouzon, J., Scaravelli, G., Kupka, M., Ferraretti, A. P., Prados, F. J., & Goossens, V.

(2017). Oocyte and ovarian tissue cryopreservation in European countries: statutory background, practice, storage and use. *Human reproduction open*, 2017(1).

Galeva, S., Konstantinidou, L., Gil, M. M., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2019). Routine first-trimester screening for fetal trisomies in twin pregnancy: cell-free DNA test contingent on results from combined test. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 53(2), 208–213.

Giorgione, V., Parazzini, F., Fesslova, V., Cipriani, S., Candiani, M., Inversetti, A., Sigismondi, C., Tiberio, F., & Cavoretto, P. (2018). Congenital heart defects in IVF/ICSI pregnancy: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 51(1), 33–42.

Gray, K. J., & Wilkins-Haug, L. E. (2018). Have we done our last amniocentesis? Updates on cell-free DNA for Down syndrome screening. *Pediatric radiology*, 48(4), 461–470.

Groenewoud, E. R., Cohlen, B. J., & Macklon, N. S. (2018). Programming the endometrium for deferred transfer of cryopreserved embryos: hormone replacement versus modified natural cycles. *Fertility and sterility*, 109(5), 768–774.

Grupo de interés de ética y buena práctica de la Sociedad Española de Fertilidad (2016). *Manual de buena práctica clínica en Reproducción Asistida*. Madrid, España: SEF.

Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. (2013). Guía de práctica clínica: Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. *Diagnóstico Prenatal*, 24(2), 57–72.

Guo, X. Y., Liu, X. M., Jin, L., Wang, T. T., Ullah, K., Sheng, J. Z., & Huang, H. F. (2017). Cardiovascular and metabolic profiles of offspring conceived by assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*, 107(3), 622–631.

Health Quality Ontario (2019). Noninvasive Prenatal Testing for Trisomies 21, 18, and 13, Sex Chromosome Aneuploidies, and Microdeletions: A Health Technology Assessment. *Ontario health technology assessment series*, 19(4), 1–166.



Helmerhorst, F. M., Perquin, D. A., Donker, D., & Keirse, M. J. (2004). Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ*, 328(7434), 261.

Henneman, L., Borry, P., Chokoshvili, D., Cornel, M. C., van El, C. G., Forzano, F., Hall, A., Howard, H. C., Janssens, S., Kayserili, H., Lakeman, P., Lucassen, A., Metcalfe, S. A., Vidmar, L., de Wert, G., Dondorp, W. J., & Peterlin, B. (2017). Responsible implementation of expanded carrier screening. *European journal of human genetics*, 25(11), 1291.

Henningsen, A. A., Gissler, M., Skjaerven, R., Bergh, C., Tiitinen, A., Romundstad, L. B., Wennerholm, U. B., Lidegaard, O., Nyboe Andersen, A., Forman, J. L., & Pinborg, A. (2015). Trends in perinatal health after assisted reproduction: a Nordic study from the CoNARTaS group. *Human reproduction*, 30(3), 710–716.

Hoorsan, H., Mirmiran, P., Chaichian, S., Moradi, Y., Hoorsan, R., & Jesmi, F. (2017). Congenital Malformations in Infants of Mothers Undergoing Assisted Reproductive Technologies: A Systematic Review and Meta-analysis Study. *Journal of preventive medicine and public health*, 50(6), 347–360.

Instituto Nacional de Estadística. (2018). *Encuesta de Fecundidad. Año 2018*. Recuperado de: [https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C&cid=1254736177006&menu=ultiDatos&idp=1254735573002](https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736177006&menu=ultiDatos&idp=1254735573002)

Instituto Nacional de Estadística. (2019). *Estadística de nacimientos. Movimiento Natural de la Población / Indicadores Demográficos Básicos. Datos provisionales año 2019*. Recuperado de: [https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica\\_C&cid=1254736177007&menu=ultiDatos&idp=1254735573002](https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736177007&menu=ultiDatos&idp=1254735573002)

Jaques, A. M., Amor, D. J., Baker, H. W., Healy, D. L., Ukoumunne, O. C., Breheny, S., Garrett, C., & Halliday, J. L. (2010). Adverse obstetric and perinatal outcomes in subfertile women conceiving without assisted reproductive technologies. *Fertility and sterility*, 94(7), 2674–2679.



Jiang, Z., Wang, Y., Lin, J., Xu, J., Ding, G., & Huang, H. (2017). Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*, 44, 90–104.

Joy, J., McClure, N., & Cooke, I. E. (2008). A comparison of spontaneously conceived twins and twins conceived by artificial reproductive technologies. *Journal of obstetrics and gynaecology*, 28(6), 580–585.

Jummaat, F., Ahmad, S., & Mohamed Ismail, N. A. (2019). 5-Year review on amniocentesis and its maternal fetal complications. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 40(2).

Kim, J. W., Lee, W. S., Yoon, T. K., Seok, H. H., Cho, J. H., Kim, Y. S., Lyu, S. W., & Shim, S. H. (2010). Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC medical genetics*, 11, 153.

Kissin, D. M., Jamieson, D. J., & Barfield, W. D. (2014). Monitoring health outcomes of assisted reproductive technology. *The New England journal of medicine*, 371(1), 91.

Kobayashi, H., Hiura, H., John, R. M., Sato, A., Otsu, E., Kobayashi, N., Suzuki, R., Suzuki, F., Hayashi, C., Utsunomiya, T., Yaegashi, N., & Arima, T. (2009). DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *European journal of human genetics*, 17(12), 1582–1591.

Lazarin, G. A., & Haque, I. S. (2016). Expanded carrier screening: A review of early implementation and literature. *Seminars in perinatology*, 40(1), 29–34.

Legazpe Moraleja, N. (2016). Decisiones de formación de la pareja y maternidad en las mujeres españolas. *Revista de Economía Aplicada*, 24(72), 23–45.

Lei, L. L., Lan, Y. L., Wang, S. Y., Feng, W., & Zhai, Z. J. (2019). Perinatal complications and live-birth outcomes following assisted reproductive technology: a retrospective cohort study. *Chinese medical journal*, 132(20), 2408–2416.

Liu, J., Wang, W., Sun, X., Liu, L., Jin, H., Li, M., Witz, C., Williams, D., Griffith, J., Skorupski, J., Haddad, G., & Gill, J. (2012). DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic. *Biology of reproduction*, 87(6), 148.

Long, X., Zhang, W., Zhang, W., Du, H., & Wu, Y. (2011). The risk of birth defects and low birth weight of the children conceived by assisted reproductive technologies. *Guangdong Med J*, 32, 871-2.

Luke B. (2017). Pregnancy and birth outcomes in couples with infertility with and without assisted reproductive technology: with an emphasis on US population-based studies. *American journal of obstetrics and gynecology*, 217(3), 270–281.

Manipalviratn, S., DeCherney, A., & Segars, J. (2009). Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertility and sterility*, 91(2), 305–315.

Mann, K., & Ogilvie, C. M. (2012). QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenatal diagnosis*, 32(4), 309–314.

Mansour, R., Ishihara, O., Adamson, G. D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K. G., Sullivan, E., & Zegers-Hochschild, F. (2014). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2006. *Human reproduction*, 29(7), 1536–1551.

Marino, J. L., Moore, V. M., Willson, K. J., Rumbold, A., Whitrow, M. J., Giles, L. C., & Davies, M. J. (2014). Perinatal outcomes by mode of assisted conception and sub-fertility in an Australian data linkage cohort. *PloS one*, 9(1), e80398.

Martínez-Galiano, J. M. (2016). La maternidad en madres de 40 años. *Revista Cubana de Salud Pública*, 42(3), 451–458.

Meister, T. A., Rimoldi, S. F., Soria, R., von Arx, R., Messerli, F. H., Sartori, C., Scherrer, U., & Rexhaj, E. (2018). Association of Assisted Reproductive Technologies With Arterial Hypertension During Adolescence. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(11), 1267–1274.

Molina-García, L., Hidalgo-Ruiz, M., Arredondo-López, B., Colomino-Ceprián, S., Delgado-Rodríguez, M., & Martínez-Galiano, J. M. (2019a). Maternal Age and Pregnancy, Childbirth and the Puerperium: Obstetric Results. *Journal of clinical medicine*, 8(5), 672.

Molina-García, L., Hidalgo-Ruiz, M., Cocera-Ruíz, E. M., Conde-Puertas, E., Delgado-Rodríguez, M., & Martínez-Galiano, J. M. (2019b). The delay of motherhood:

Reasons, determinants, time used to achieve pregnancy, and maternal anxiety level. *PloS one*, 14(12), e0227063.

Morcel, K., Lavoué, V., Beuchée, A., Le Lannou, D., Poulain, P., & Pladys, P. (2010). Perinatal morbidity and mortality in twin pregnancies with dichorionic placentas following assisted reproductive techniques or ovarian induction alone: a comparative study. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 153(2), 138–142.

Moreno-Sepulveda, J., & Checa, M. A. (2019). Risk of adverse perinatal outcomes after oocyte donation: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(10), 2017–2037.

Muñoz, M. (2012). *Unidad 10: Reducción embrionaria tras técnicas de reproducción asistida. Bloque I: Esterilidad Femenina*. Máster en Reproducción Humana (pp. 1–12). Madrid, España.

Neumann, C., Thompson, D. A., Thorson, H., Sidman, J. D., & Roby, B. B. (2018). Assisted Reproduction is Not Associated with Increased Risk of Congenital Head and Neck Defects. *Cureus*, 10(3), e2287.

Ní Bhrolcháin, M., & Beaujouan, E. (2012). Fertility postponement is largely due to rising educational enrolment. *Population studies*, 66(3), 311–327.

O'Reilly, D., Bowen, J. M., Perampaladas, K., Qureshi, R., Xie, F., & Hughes, E. (2017). Feasibility of an altruistic sperm donation program in Canada: results from a population-based model. *Reproductive health*, 14(1), 8.

Özdemir, T. R., Özyılmaz, B., Çakmak, Ö., Kaya, Ö. Ö., Köse, C., Kırbıyık, Ö., Keskin, M. Z., Koç, A., Zeyrek, T., Kutbay, Y. B., Erdoğan, K. M., & Güvenç, M. S. (2019). Evaluation of chromosomal abnormalities and Y-chromosome microdeletions in 1696 Turkish cases with primary male infertility: A single-center study. *Turkish journal of urology*, 46(2), 95–100.

Qin, J., Sheng, X., Wang, H., Liang, D., Tan, H., & Xia, J. (2015). Assisted reproductive technology and risk of congenital malformations: a meta-analysis based on cohort studies. *Archives of gynecology and obstetrics*, 292(4), 777–798.

Ricciarelli, E., & Fernández-Shaw, S. (s.f.). *Guía 25 Sociedad Española de Fertilidad. Aspectos perinatales de los TRA*. Madrid, España: SEF.

Rumbold, A. R., Moore, V. M., Whitrow, M. J., Oswald, T. K., Moran, L. J., Fernandez, R. C., Barnhart, K. T., & Davies, M. J. (2017). The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: a systematic review. *Human reproduction*, 32(7), 1489–1507.

Rybińska A. (2014). Motherhood after the age of 35 in Poland. *Studia demograficzne*, 1(165), 7–28.

Sánchez-Durán, M. Á., Bernabeu García, A., Calero, I., Ramis Fossas, J., Illescas, T., Avilés, M. T., Maiz, N., & Carreras, E. (2019). Clinical application of a contingent screening strategy for trisomies with cell-free DNA: a pilot study. *BMC pregnancy and childbirth*, 19(1), 274.

Shin, Y. J., Chung, J. H., Kim, D. J., Ryu, H. M., Kim, M. Y., Han, J. Y., & Choi, J. S. (2016). Quantitative fluorescent polymerase chain reaction for rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidies in chorionic villus sampling in a single institution. *Obstetrics & gynecology science*, 59(6), 444–453.

Silver, A. J., Larson, J. L., Silver, M. J., Lim, R. M., Borroto, C., Spurrier, B., Morriss, A., & Silver, L. M. (2016). Carrier Screening is a Deficient Strategy for Determining Sperm Donor Eligibility and Reducing Risk of Disease in Recipient Children. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 20(6), 276–284.

Simopoulou, M., Sfakianoudis, K., Bakas, P., Giannelou, P., Papapetrou, C., Kalampokas, T., Rapani, A., Chatzaki, E., Lambropoulou, M., Lourida, C., Deligeoroglou, E., Pantos, K., & Koutsilieris, M. (2018). Postponing Pregnancy Through Oocyte Cryopreservation for Social Reasons: Considerations Regarding Clinical Practice and the Socio-Psychological and Bioethical Issues Involved. *Medicina*, 54(5), 76.

Sociedad Española de Fertilidad. (2011). *Saber más sobre fertilidad y reproducción asistida*. Madrid, España: SEF.

Sociedad Española de Fertilidad. (2017). *Registro Nacional de Actividad 2017 – Registro SEF. Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2017*. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.

Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. (2018a). Ciclos de inseminación artificial con semen de donante. *Prog Obstet Ginecol*, 61(2), 200–208.

Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. (2018b). Cribado y diagnóstico precoz de anomalías genéticas. *Prog Obstet Ginecol*, 61(6), 605–629.

Suela, J., López-Expósito, I., Querejeta, M. E., Martorell, R., Cuatrecasas, E., Armengol, L., Antolín, E., Domínguez Garrido, E., Trujillo-Tiebas, M. J., Rosell, J., Planells, J. G., & Cigudosa, J. C. (2017). Recomendaciones para el uso de microarrays en el diagnóstico prenatal. *Medicina Clínica*, 148(7), 328.e1–328.e8.

Takyi, A., & Santolaya-Forgas, J. (2017). Prenatal screening for chromosomal abnormalities in IVF patients that opted for preimplantation genetic screening/diagnosis (PGS/D): a need for revised algorithms in the era of personalized medicine. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(6), 723–724.

Tarín, J. J., García-Pérez, M. A., & Cano, A. (2017). Potential risks to offspring of intrauterine exposure to maternal age-related obstetric complications. *Reproduction, fertility and development*, 29(8), 1468–1476.

von Wolff, M., & Haaf, T. (2020). In Vitro Fertilization Technology and Child Health. *Deutsches Arzteblatt international*, 117(3), 23–30.

Vrooman, L. A., & Bartolomei, M. S. (2017). Can assisted reproductive technologies cause adult-onset disease? Evidence from human and mouse. *Reproductive toxicology*, 68, 72–84.

Vulliemoz, N. R., McVeigh, E., & Kurinczuk, J. (2012). In vitro fertilisation: perinatal risks and early childhood outcomes. *Human fertility*, 15(2), 62–68.

Wang, Z., Liu, X., Xu, J., Yang, Q., Niu, W., Dai, S., Hu, L., & Guo, Y. (2020). Paternal age, body mass index, and semen volume are associated with chromosomal aberrations-related miscarriages in couples that underwent treatment by assisted reproductive technology. *Aging*, 12(9), 8459–8472.

Wen, J., Jiang, J., Ding, C., Dai, J., Liu, Y., Xia, Y., Liu, J., & Hu, Z. (2012). Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertility and sterility*, 97(6), 1331–7.

Wisborg, K., Ingerslev, H. J., & Henriksen, T. B. (2010). IVF and stillbirth: a prospective follow-up study. *Human reproduction*, 25(5), 1312–1316.

Würfel, W., Haas-Andela, H., Krüsmann, G., Rothenaicher, M., Hirsch, P., Kwapisz, H. K., Haas, J., Högemann, I., & Fiedler, K. (1992). Prenatal diagnosis by amniocentesis in 82 pregnancies after in vitro fertilization. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 44(1), 47–52.

Yang, M., Fan, X. B., Wu, J. N., & Wang, J. M. (2018). Association of assisted reproductive technology and multiple pregnancies with the risks of birth defects and stillbirth: A retrospective cohort study. *Scientific reports*, 8(1), 8296.

Zacchini, F., Sampino, S., Stankiewicz, A. M., Haaf, T., & Ptak, G. E. (2019). Assessing the epigenetic risks of assisted reproductive technologies: a way forward. *The International journal of developmental biology*, 63(3-4-5), 217–222.

Zhang, A., Ma, X., Zhang, L., Zhang, X., & Wang, W. (2019). Pregnancy and offspring outcomes after artificial insemination with donor sperm: A retrospective analysis of 1805 treatment cycles performed in Northwest China. *Medicine*, 98(16), e14975.