

Reproducción Asistida

Revisión sobre el efecto de la estimulación ovárica controlada sobre la incidencia de aneuploidías

Review of the effect of controlled ovarian stimulation on the incidence of aneuploidy

María Mundi, Juan Manuel Moreno, Rocío Quiroga, María Vera, Nicolás Garrido, Elena Labarta.

Instituto Universitario IVI Valencia. Unidad de Reproducción. Valencia. España

Resumen

Introducción: *Diversos estudios han sugerido que la estimulación ovárica en los tratamientos de fecundación in vitro puede afectar negativamente a la calidad embrionaria y a la constitución cromosómica del embrión.*

Objetivo: *Realizar una revisión sistemática de los estudios publicados hasta la fecha sobre el efecto de la estimulación ovárica sobre los embriones resultantes.*

Diseño del estudio: *Hemos realizado una búsqueda y análisis exhaustivo a través de la base de datos Pubmed de los artículos publicados hasta el momento que tratan el efecto de la estimulación ovárica sobre el índice de aneuploidías en los embriones resultantes de las técnicas de reproducción asistida.*

Ámbito: *Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) Valencia.*

Resultados: *Los estudios retrospectivos que evalúan el efecto de la estimulación frente a su ausencia para un mismo grupo de pacientes, no muestran diferencias entre ellos en cuanto a la tasa de división y morfología de los embriones. Existen estudios que afirman que el protocolo de estimulación suave disminuye el porcentaje de aneuploidías y de embriones mosaicos. Sin embargo, no existen datos concluyentes sobre el efecto de las gonadotropinas en la tasa de anomalías cromosómicas, por lo que serán necesarios más estudios orientados en este sentido. La próxima implementación de arrays de hibridación genómica comparada en clínica se presenta como una herramienta diagnóstica de determinación de aneuploidías cromosómicas mucho más completa que las actuales.*

Palabras clave: Aneuploidía. Calidad Embrionaria. Fecundación In Vitro. Estimulación Ovárica. Diagnóstico Genético Preimplantacional.

Correspondencia: Dra. Elena Labarta
Instituto Universitario IVI
Plaza de la Policía Local, 3
46015, Valencia
elabarta@ivi.es

Summary

Introduction: *Several studies have suggested that ovarian stimulation in in vitro fertilization treatments may affect embryo quality and embryo chromosomal constitution.*

Objective: *To carry out a systematic review of studies published to date about the effect of ovarian stimulation on the resulting embryos.*

Study design: *We conducted a search and an analysis of articles published to date linking the effect of ovarian stimulation with the rate of aneuploidy in embryos resulting from assisted reproduction techniques.*

Scope: *Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) Valencia.*

Results: *Retrospective studies evaluating the effect of stimulation compared with its absence for the same group of patients found no difference between them in the division rate and embryo morphology. There are studies that suggest that mild stimulation protocols decrease the incidence of aneuploid and mosaic embryos. However, there are no conclusive data about the effect of gonadotrophins on the chromosomal abnormalities rate, so studies aimed in this line of work will be necessary. The upcoming implementation of comparative genomic hybridization arrays in clinical practice is presented as a diagnostic tool to determine aneuploidy rates for all 24 chromosomes.*

Key words: Aneuploidy. Embryo Quality. IVF. Ovarian Stimulation. Preimplantation Genetic Diagnosis.

INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas de reproducción asistida (TRA) es cada vez más común. Actualmente más de tres millones de niños han nacido a través de tratamientos de fertilidad desde que llegó al mundo la primera niña concebida por fecundación in vitro (FIV) hace ya tres décadas.

Para optimizar los tratamientos de reproducción asistida es importante llevar a cabo una estimulación ovárica controlada (EOC), que conlleva un elevado reclutamiento folicular y la obtención de un mayor número de ovocitos que en un ciclo natural, aumentando así el número de embriones disponibles para transferir y las posibilidades de éxito.

Diversos estudios han demostrado cómo la EOC parece afectar no sólo a la calidad ovocitaria-embriónica y a la receptividad endometrial sino también a la constitución cromosómica del embrión (1, 2). Esto puede explicar el porqué las tasas de éxito no son superiores en las TRA a pesar de los grandes avances tecnológicos disponibles hoy en día en los laboratorios de reproducción asistida.

La EOC parece incrementar la tasa de aneuploidías de un modo dosis dependiente, de manera que estimulaciones convencionales generan un mayor porcentaje de embriones aneuploides que estimulaciones suaves (8-11). En la génesis de las aneuploidías no sólo influyen las gonadotropinas exógenas, sino también la administración de hCG para inducir la ovula-

ción, que podría provocar alteraciones del huso meiótico induciendo una mala segregación cromosómica (6).

Estudios recientes van encaminados a determinar si el tipo y la dosis de gonadotropinas influyen en la constitución cromosómica del embrión (4, 14, 15).

Varios trabajos han intentado determinar el efecto acumulativo del número de ciclos de EOC. Van Blerkom y colaboradores realizaron un estudio en ratones en el cual demostraron que el número de ciclos estimulados también tiene influencia sobre la existencia de malformaciones en el huso meiótico del ovocito en metafase II, las cuales aumentan progresivamente con cada ciclo independientemente de la edad. Sin embargo, el ADN aparecía cada vez más intacto con cada ronda de EOC, no observándose ninguna relación con la separación prematura de los cromosomas en los ovocitos, que es causa de aneuploidía (12). Un estudio retrospectivo orientado en el mismo sentido intentó evaluar el efecto de los ciclos repetidos de estimulación en mujeres jóvenes y sanas. Dicho trabajo concluye que ni los ciclos sucesivos de EOC ni el intervalo entre los mismos afectan a la cantidad y a la calidad de los ovocitos de estas mujeres (13), aunque no se evaluó el efecto a nivel cromosómico.

Si tenemos en cuenta que un 60% de los abortos espontáneos son debidos a anomalías cromosómicas, la preselección de los embriones a transferir resulta ser de suma importancia. Se sabe que la evaluación morfológica, a pesar de haber demostrado ser bastante eficaz, no es del todo apropiada principalmente en

casos de edad materna avanzada, abortos de repetición y pacientes con bajo resultado tras FIV, ya que no asegura obtener una dotación cromosómica normal.

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) permite la evaluación de la constitución cromosómica de embriones en desarrollo a través del uso de la técnica de hibridación fluorescente in-situ (FISH) para un determinado número de cromosomas (16). Teóricamente, la selección de embriones euploides para transferir se traduciría en una mayor tasa de implantación y de embarazo, y una menor tasa de aborto. Además, la transferencia de un menor número de embriones reduciría la posibilidad de embarazos múltiples. No obstante, existe una cierta controversia en torno a la exactitud diagnóstica y a la eficacia clínica de esta técnica ya que los métodos de diagnóstico de aneuploidías actuales se centran en el estudio de una o dos blastómeras. El mosaicismo es un hecho, incluso en embriones morfológicamente normales y de buena calidad, por lo que ninguna célula puede ser representativa del embrión completo (17). Sin embargo, estudios recientes en los que se han analizado los embriones en su quinto día de desarrollo han confirmado el diagnóstico obtenido en una única célula en día 3 en un 95% de los casos (18). Técnicas alternativas al FISH, como la hibridación genómica comparada (CGH), han conseguido detectar pérdidas o ganancias completas o parciales en el ADN genómico pero requieren protocolos de criopreservación que limitan la utilización de la técnica (19-21). El desarrollo de nuevas tecnologías más resolutivas como los arrays de CGH han permitido el análisis de la totalidad de la dotación cromosómica en un corto periodo de tiempo, así como detectar de forma combinada aneuploidías y enfermedades monogénicas (22). Conseguir solventar los principales inconvenientes de esta técnica, como la determinación de los errores de toda la ploidía, supondría un mayor gasto económico y aunque la limitación del mosaicismo al analizar una única célula seguiría existiendo, nos llevaría a superar las limitaciones que supone el FISH en lo referente al número de cromosomas analizados.

INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS EN CICLO NATURAL Y ESTIMULADO

Actualmente no existen estudios de tipo prospectivo aleatorizado que comparen la tasa de anomalías cromosómicas en embriones procedentes de ciclo estimulado frente a ciclo natural o no estimulado.

El grupo de Ziebe y colaboradores en 2004 realizó

un análisis retrospectivo en 177 pacientes con una edad media de 33,6 años. Éstas fueron sometidas a un primer ciclo de EOC mediante la utilización de FSH recombinante (FSHr) en protocolo largo con agonistas de la GnRH. La transferencia embrionaria se llevó a cabo en fresco y los embriones sobrantes fueron criopreservados. Posteriormente fueron sometidas a un ciclo natural, y en 85 pacientes se obtuvo un embrión el cual fue transferido junto con uno criopreservado del primer ciclo (3). La evaluación de la calidad embrionaria no se realizó a nivel cromosómico, tan sólo a nivel morfológico y de velocidad de división. De hecho, la única medida directa de calidad ovocitaria que estiman es la madurez nuclear, aunque tampoco la incluye ron entre sus resultados.

Entre las conclusiones de este estudio se determinó que no existían diferencias significativas para las tasas de división ni para la morfología entre embriones provenientes de ciclo estimulado frente a natural, aunque hay que mencionar que existían enormes diferencias en el tamaño muestral de embriones entre grupos, lo que reducía el poder estadístico. Apoyan que posiblemente las alteraciones que induce la EOC se producen a un nivel embrionario más evolutivo, como podría ser blastocisto. Sin embargo, sólo presentan datos de día 2 de desarrollo embrionario. A estos inconvenientes se le suma la imposibilidad de demostrar diferencias en la tasa de implantación y embarazo debido a que las transferencias eran combinadas de embriones procedentes de ciclo estimulado y natural.

Si bien la tendencia actual busca reducir la intensidad de la estimulación ovárica para excluir los posibles efectos deletéreos que ésta pueda tener sobre los ovocitos y embriones a nivel cromosómico, la probabilidad de encontrar embriones con alteraciones cromosómicas puede ocurrir también en ciclos naturales, incluso en pacientes jóvenes. A esta conclusión llegaron Verpoest y colaboradores en un estudio prospectivo realizado en 2008, donde un grupo de mujeres de edad media de 31,4 años fueron sometidas a ciclos naturales y a evaluación embrionaria mediante DGP a una blastómera en estadio de 6 células (5). Los resultados mostraron que hasta un 36,4% de los embriones analizados contenían aneuploidías.

Hay que tener en cuenta que la evaluación de una única blastómera no permite descartar la presencia de mosaicismo embrionario que está presente desde las primeras etapas de desarrollo embrionario. De hecho, Baart y colaboradores en 2006 demuestran que en pacientes de FIV de menos de 38 años de edad se producen en torno a un 64% de anomalías tras análisis de dos blastómeras en día 3 (4). Estos valores han

de ser comparados con los de Verpoest, pues un 36,4% de aneuploidías en ciclo natural difiere bastante del 64% de anomalías cromosómicas en pacientes jóvenes estimuladas. Estas diferencias en los datos obtenidos podrían esconder entre sus causas, además de los criterios de selección, un factor debido a la estimulación. Este grupo de investigadores cita el estudio de Hodges y colaboradores de 2002, donde mencionan el posible efecto deletéreo de la administración de hCG administrado para inducir la ovulación, ya que se trata de un factor potencial inductor de malos alineamientos y segregaciones cromosómicas que afectaría tanto a los ovocitos resultantes de ciclos naturales como de ciclos estimulados (6).

INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS Y DOSIS DE GONADOTROFINAS

Aunque quedan patentes las limitaciones técnicas para contar con un grupo de pacientes control carentes de estimulación, sí que se ha podido determinar las diferencias entre distintos protocolos de estimulación en cuanto a la evaluación del impacto cromosómico de éstos. En 2007 el grupo de investigadores encabezados por Baart evaluaron de manera prospectiva y aleatorizada el efecto de la estimulación convencional con agonistas y altas dosis de gonadotropinas (225 UI s.c. de FSHr) frente a un protocolo suave con antagonistas y menores dosis de gonadotropinas (150 UI s.c. de FSHr), que permitía aprovechar las primeras fases naturales de selección folicular (11). Es importante remarcar que la edad de las pacientes (34,1 en el grupo de estimulación convencional y 33,2 en el grupo de estimulación suave), los niveles de FSH (8,1 UI /l grupo convencional y 7,6 UI /l grupo suave) y los de inhibina basal (86 ng/l grupo convencional y 88 ng/l grupo suave) fueron similares entre los dos grupos. Los resultados mostraron una menor tasa de aneuploidías en embriones tras estimulación suave (55% frente a un 73% en el grupo convencional), además de menor número de ovocitos y embriones, aunque ambos regímenes obtuvieron una media de 1,8 embriones cromosómicamente normales por ciclo. Por otro lado, el grupo de estimulación convencional presentó mayores tasas de mosaicismos evaluados en día 3 (mediante DGP a dos blastómeras en embriones de más de 6 células) frente al grupo de estimulación suave (65% frente a 37% respectivamente), lo que sugiere un efecto del tipo de EOC a nivel de segregación mitótica. Es lógico pensar que las diferencias se deben a la mejor aproximación a un ciclo natural con el protocolo suave, aunque no se pueden excluir dife-

rencias debido a un efecto directo aún desconocido del tipo de análogo de la GnRH utilizado. Este estudio defiende la necesidad de reducir la intensidad de la EOC y la selección del embrión óptimo a transferir.

Estos hallazgos resultaron bastante interesantes, por lo que otro grupo de investigadores liderados por Verbergen 2009 hacen una extensa revisión sobre las posibilidades de la estimulación suave. Estos estudios propusieron diferentes maneras de conseguir dicha estimulación, como por ejemplo, limitando el uso de gonadotropinas o utilizando compuestos alternativos como anti-estrógenos, inhibidores de la aromatas, incluso suplementando LH o hCG durante la fase folicular tardía (8). También mencionan los beneficios del protocolo suave frente al convencional, entre ellos: la flexibilidad en la administración de los antagonistas, menor riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica y cáncer de ovario, mejor receptividad endometrial, menos días de tratamiento, menos costes y menor molestia. Aunque apoyan sus argumentos en sus propios resultados obtenidos en 2009 y los de Baart de 2007, no olvidan mencionar otros estudios prospectivos donde no se hallan diferencias significativas en tasas de embarazo, probablemente debido a la selección embrionaria previa a la transferencia (9-11, 23). Concluyen con la necesidad de individualización de los protocolos de estimulación que reduzcan la medicación necesaria.

INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS Y TIPO DE GONADOTROFINAS

Existe un gran número de artículos que intentan relacionar la EOC con las aneuploidías con muy distintos resultados. Puede que, en ocasiones, la gran diversidad de protocolos haya provocado que, persiguiendo un mismo objetivo, se haya llegado a conclusiones distintas. Por ello sería interesante saber la influencia directa de los protocolos y las hormonas empleadas sobre las anomalías cromosómicas de los embriones.

En 2008, Weghofer y colaboradores llevaron a cabo un estudio retrospectivo de cohortes para analizar el efecto que tenía el empleo de gonadotropinas que contenían actividad LH (hMG) sobre la tasa de ploidía de los embriones resultantes (14). Para ello compararon estimulaciones que empleaban FSH frente a hMG, ambas utilizando protocolos largos con agonistas de la GnRH. El estudio incluía un grupo de 104 mujeres con edades comprendidas entre 27 y 43 años.

Para evaluar la ploidía de los embriones emplearon como técnica de diagnóstico el FISH de una blas-

tómera en día 3. Observaron pequeñas variaciones no significativas entre los dos grupos, por ejemplo, el número de ovocitos obtenidos era mayor con FSH (23,7) que con hMG (20,3), al igual que el número de cigotos fecundados (13,8 y 11,9 respectivamente). Sin embargo, la media de embriones cromosómicamente normales por paciente fue muy parecida en ambos grupos: 3,1 para el grupo de FSH y 3,3 para el grupo de hMG, por lo que el porcentaje de embriones euploides sí fue significativamente ($p < 0,01$) mayor en el grupo de hMG (69,8%) frente al de FSH (45,3%). Por último, también compararon las tasas de embarazo por ciclo iniciado y observaron que eran significativamente mayores empleando hMG frente a FSH (63% y 44% respectivamente, $p = 0,05$).

De todos estos resultados concluyeron que los protocolos que contienen actividad LH tienen un efecto beneficioso sobre las tasas de ploidía en los embriones y, posiblemente, también en las tasas de embarazo. Además, sustentan estos resultados en estudios que afirman que probablemente la LH tenga un papel muy importante sobre la reanudación de la meiosis (24).

En el año 2009, este mismo grupo, llevo a cabo otro estudio retrospectivo de características similares (15), en el que se comparaban ciclos de EOC con FSH sola frente a FSH junto con hMG, a diferencia del anterior, en el que usaban únicamente hMG. La supresión hipofisaria se llevó a cabo con el uso de antagonistas de la GnRH. Este estudio incluía 104 ciclos en mujeres de entre 30 y 45 años, es decir, de edad algo más avanzada que las del estudio previo, y emplearon la misma metodología: DGP mediante FISH.

En sus resultados destacan pequeñas diferencias a favor del grupo que empleaba sólo FSH en el número de embriones euploides (FSH 2,1 frente a FSH/hMG 1,9) y en el porcentaje de éstos (FSH 29,4% frente a FSH/hMG 25,7%), aunque éstas no fueron significativas en ningún caso. Sin embargo, sí lo fueron las diferencias para las tasas de embarazo clínico por ciclo iniciado (FSH 34,6% frente a FSH/hMG 11,5%, $p < 0,05$) y por embrión transferido (FSH 40% frente a FSH/hMG 15%, $p < 0,05$). Como vemos, obtenían el mismo número de embriones normales en ambos grupos, pero existían grandes diferencias, aunque no significativas, en la tasa de embarazos, por lo tanto el factor clave debía ser la tasa de implantación de dichos embriones, que era mayor en el grupo con sólo FSH (FSH 23% frente a FSH/hMG 11,7%).

De todos estos resultados concluyeron que la LH no tenía ningún tipo de efecto sobre la ploidía en ciclos con antagonistas, pero que sí afectaba a la tasa

de embarazo, la cual era tres veces mayor en ausencia de LH. Consideran que este hecho se puede deber a la existencia de diferencias en la receptividad endometrial entre ambos grupos. Aunque también afirman que al haber usado un grupo de mujeres de edad avanzada, de aproximadamente 40 años, éstas tienen unos niveles endógenos de LH altos que hacen que al suministrar LH exógena se alcancen niveles muy elevados y puedan tener efectos negativos. Además, haciendo referencia a su estudio anterior, en el que incluyen mujeres más jóvenes, deducen también que el déficit total de LH tampoco es beneficioso. Los autores sostienen que las diferentes conclusiones de ambos estudios no se deben a que en el primero se utilizaron agonistas y en el segundo antagonistas de la GnRH, pues estudios previos realizados en donantes estimuladas con FSH han demostrado que las tasas de implantación y embarazo de las receptoras son similares independientemente del tipo de análogo utilizado (25, 26).

Finalmente concluyen a partir de sus dos estudios que es necesario que exista un equilibrio entre los niveles de FSH y LH para que no se vean afectadas las tasas de ploidía por un lado, ni las de implantación embrionaria por otro. Todo esto apoya de nuevo la necesidad de realizar estimulaciones lo más individualizadas posibles ya propuestas anteriormente en otros estudios (27, 28).

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y SUS LIMITACIONES

La morfología es el método diagnóstico más utilizado en los laboratorios para la selección de los mejores embriones, pero existen embriones aneuploides que presentan una morfología normal (20). Por esto, el FISH ha sido utilizado hasta ahora para la evaluación de las aneuploidías en embriones mediante el uso de hasta 15 sondas para 15 cromosomas (16). En este estudio se concluye que hasta que no se conozcan los mecanismos que llevan a la aparición de los mosaicismos, una de las grandes limitaciones, no se podrá llevar a la práctica este tipo de técnicas. Otras limitaciones son la imposibilidad de detectar las anomalías que afectan a los cromosomas restantes y la reducción en la precisión al aumentar las rondas de hibridación (29, 30). Además se fija una sola célula sobre el portaobjetos, lo que puede dar lugar a un marcaje complicado y superposición de señales, por lo que se requiere habilidad y experiencia (22). Por otro lado no existe un acuerdo claro de los beneficios del empleo de esta técnica, debido a la incapacidad de

identificar el origen multifactorial de los fallos de implantación (20-22).

Como alternativa, aparece la técnica de CGH, que detecta ganancias o pérdidas completas o parciales en el ADN genómico completo (19, 20). La mayor limitación de este enfoque es el largo tiempo requerido para obtener un resultado, lo que reduce la supervivencia de los embriones al congelarlos para ser transferidos en ciclos posteriores (21).

Para evitar la congelación, algunos estudios se han centrado en la reducción del tiempo empleado en el análisis (31), mientras que otros implican la biopsia de los dos corpúsculos polares (CP) y una blastómera (21, 32), suponiendo una ventaja para los países en los que no está aceptada la biopsia de embriones (33). Pero el examen de los CP presenta la incapacidad de detección de errores paternos y/o de origen postzigótico (19). Para ello se realiza también CGH a 3-6 células del trofoectodermo, lo que permite detectar las aneuploidías causadas tanto en divisiones meióticas como mitóticas (21).

Recientemente han aparecido los arrays de CGH, que se presentan como un método con mayor resolución y con la posibilidad de ser automatizado, con lo cual ofrece mayor reproducibilidad. Además, el diagnóstico es más rápido que en el CGH y evita la criopreservación de embriones. A pesar de todo esto, la técnica presenta varias limitaciones. En primer lugar resulta imposible detectar los errores de toda la ploidía, aunque se cree que en la mayoría de los casos pueden ser detectados por los embriólogos al observar los pronúcleos (19). Por otro lado, es necesario amplificar el contenido genómico, lo que conlleva mayor coste que FISH y si el análisis se realiza en día 3 de desarrollo no se pueden descartar tampoco los mosaicismos.

Hasta el momento, únicamente hay una publicación de aplicación clínica en DGP en 8 pacientes, de los cuales 6 tuvieron embriones euploides para transferir, obteniéndose 5 gestaciones evolutivas (19). Además la mayoría de los estudios están realizados con embriones de parejas con riesgos de presentar anomalías y pocos con embriones de mujeres fértiles normales (34).

Algunas plataformas de microarrays también ofrecen la ventaja de realizar el fingerprinting a los embriones y la posibilidad de detectar de forma combinada aneuploidías y enfermedades monogénicas. Sin embargo, para que llegue a ser aplicada de forma generalizada se requiere conseguir mayor precisión de los datos y reducciones en el precio (22).

En los últimos años, varios grupos han iniciado las investigaciones destinadas a identificar marcadores de

desequilibrio cromosómico de forma no invasiva, como genes de expresión aberrante, moléculas secretadas o transcritas diferencialmente tanto en ovocitos como en embriones cromosómicamente anormales. Con todo esto se concluye que para la aplicación de estas técnicas es necesaria mayor validación y pruebas clínicas (22).

CONCLUSIONES

Aunque diversos estudios han postulado que la estimulación ovárica incrementa la incidencia de anomalías cromosómicas, recientemente se ha observado que la ausencia de la misma no excluye la posibilidad de aneuploidías en los embriones procedentes de mujeres jóvenes. Esto podría deberse a que en la génesis de las aneuploidías en un proceso de FIV no sólo está implicada la estimulación ovárica, sino también las condiciones ambientales del laboratorio de FIV.

De todos modos, estudios presentados en este trabajo sugieren que la dosis de gonadotrofinas utilizada durante la estimulación ovárica sí que influye en la incidencia de anomalías cromosómicas, de forma que a mayores dosis, mayor riesgo de las mismas.

Estos resultados, sumados a la necesidad de reducir los riesgos derivados de la EOC a las pacientes, han promovido la tendencia actual de llevar a cabo estimulaciones más suaves con antagonistas de la GnRH. Con este tipo de estimulación se obtiene una menor tasa de aneuploidías y mosaicismos en los embriones resultantes.

El efecto del tipo de gonadotrofinas utilizadas (con o sin actividad LH) sobre la tasa de aneuploidías no está muy claro ya que existen muy pocos estudios al respecto y los que se han llevado a cabo han sido de forma retrospectiva. No es posible llegar a conclusiones categóricas, debido a que entre estos trabajos existen múltiples diferencias metodológicas como son la edad de las pacientes, el tipo de protocolo y la combinación de gonadotrofinas empleada, que llevan a resultados no comparables entre ellos.

El estudio ideal que demostrase el verdadero impacto de la EOC sobre la tasa de aneuploidías debería ser de tipo prospectivo para analizar si existen diferencias entre estimulación frente a no estimulación dentro de un mismo grupo de mujeres jóvenes que no tengan un riesgo intrínseco elevado de aneuploidías.

Por último, los arrays de CGH se presentan en la actualidad como el mejor método diagnóstico futuro, que conseguirá detectar un amplio abanico de aneuploidías, optimizando así la selección de los mejores embriones para la transferencia y consiguiendo, por tanto, mejores tasas de implantación y embarazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Reme T, Hedon B, De Vos J, Hamamah S.:** Gene expression profile of human endometrial receptivity: Comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod.* 2009 Jun;24(6):1436-45.
2. **Pellicer A, Ruiz A, Castellvi RM, Calatayud C, Ruiz M, Tarin JJ, Miro F, Bonilla-Musoles F.:** Is the retrieval of high numbers of oocytes desirable in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues (GnRH α) and gonadotrophins? *Hum Reprod.* 1989 Jul;4(5):536-40.
3. **Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KL, Loft A, Lindhard A, Nyboe Andersen A.:** Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1457-60.
4. **Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D.:** Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2006 Jan;21(1):223-33.
5. **Verpoest W, Fauser BC, Papanikolaou E, Staessen C, Van Landuyt L, Donoso P, Tournaye H, Liebaers I, Devroey P.:** Chromosomal aneuploidy in embryos conceived with unstimulated cycle IVF. *Hum Reprod.* 2008 Oct;23(10):2369-71.
6. **Hodges CA, Ilagan A, Jennings D, Keri R, Nilson J, Hunt PA.:** Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod.* 2002 May;17(5):1171-80.
7. **van der Gaast MH, Eijkemans MJ, van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, Fauser BC, Macklon NS.:** Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online.* 2006 Oct;13(4):476-80.
8. **Verberg MF, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P, Broekmans FJ, Fauser BC.:** Mild ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update.* 2009 Jan-Feb;15(1):13-29.
9. **Hohmann FP, Macklon NS, Fauser BC.:** A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jan;88(1):166-73.
10. **Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C, Polinder S, Beckers NG, Klinkert ER, Broekmans FJ, Passchier J, Te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC.:** A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: A randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 2007 Mar 3;369(9563):743-9.
11. **Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, Macklon NS, Fauser BC.:** Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: A randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2007 Apr;22(4):980-8.
12. **Van Blerkom J, Davis P.:** Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod.* 2001 Apr;16(4):757-64.
13. **Caligara C, Navarro J, Vargas G, Simon C, Pellicer A, Remohi J.:** The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors. *Hum Reprod.* 2001 Nov;16(11):2320-3.
14. **Weghofer A, Munne S, Brannath W, Chen S, Tomkin G, Cekleniak N, Garrisi M, Barad D, Cohen J, Gleicher N.:** The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: Long protocol stimulation. *Hum Reprod.* 2008 Mar;23(3):499-503.
15. **Weghofer A, Munne S, Brannath W, Chen S, Barad D, Cohen J, Gleicher N.:** The impact of LH-containing gonadotropin stimulation on euploidy rates in preimplantation embryos: Antagonist cycles. *Fertil Steril.* 2009 Sep;92(3):937-42.
16. **Baart EB, van den Berg I, Martini E, Eussen HJ, Fauser BC, Van Opstal D.:** FISH analysis of 15 chromosomes in human day 4 and 5 preimplantation embryos: The added value of extended aneuploidy detection. *Prenat Diagn.* 2007 Jan;27(1):55-63.
17. **Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J.:** Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril.* 2003 Oct;80(4):860-8.
18. **Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Pellicer A, Remohí J, Rubio C.:** Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod.* In press.
19. **Hellani A, Abu-Amro K, Azouri J, El-Akoum S.:** Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in DGP-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online.* 2008 Dec;17(6):841-7.
20. **Johnson DS, Gemelos G, Baner J, Ryan A, Cinnioglu C, Banjevic M, Ross R, Alper M, Barrett B, Frederick J, Potter D, Behr B, Rabinowitz M.:** Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. *Hum Reprod.* 2010 Apr;25(4):1066-75.
21. **Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, Tormasi S, Gutierrez-Mateo C, Prates R, Schoolcraft WB, Munne S, Wells D.:**

- Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2009 Jun 21
22. **Wells D, Alfarawati S, Fragouli E.:** Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: Microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod*. 2008 Dec;14(12):703-10.
 23. **Verberg MF, Eijkemans MJ, Macklon NS, Heijnen EM, Baart EB, Hohmann FP, Fauser BC, Broekmans FJ.:** The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: A meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009 Jan-Feb;15(1):5-12.
 24. **Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A, Lee DC, Threadgill DW, Conti M.:** Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol*. 2007 Mar;27(5):1914-24.
 25. **Prapas N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Prapa S, Vanderzwalmen P, Schoysman R, Makedos G.:** GnRH agonist versus GnRH antagonist in oocyte donation cycles: A prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2005 Jun;20(6):1516-20.
 26. **Lindheim SR, Morales AJ.:** GnRH antagonists followed by a decline in serum estradiol results in adverse outcomes in donor oocyte cycles. *Hum Reprod*. 2003 Oct;18(10):2048-51.
 27. **Manna C, Rahman A, Sbracia M, Pappalardo S, Mohamed EI, Linder R, Nardo LG.:** Serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and oestradiol pattern in women undergoing pituitary suppression with different gonadotrophin-releasing hormone analogue protocols for assisted reproduction. *Gynecol Endocrinol*. 2005 Apr;20(4):188-94.
 28. **Durnerin CI, Erb K, Fleming R, Hillier H, Hillier SG, Howles CM, Hugues JN, Lass A, Lyall H, Rasmussen P, Thong J, Traynor I, Westergaard L, Yates R, Luveris Pretreatment Group.:** Effects of recombinant LH treatment on folliculogenesis and responsiveness to FSH stimulation. *Hum Reprod*. 2008 Feb;23(2):421-6.
 29. **Colls P, Goodall N, Zheng X, Munne S.:** Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy by testing 12 chromosomes. *Reprod Biomed Online*. 2009 Oct;19(4):532-8.
 30. **Holzer H, Casper R, Tulandi T.:** A new era in ovulation induction. *Fertil Steril*. 2006 Feb;85(2):277-84.
 31. **Landwehr C, Montag M, van der Ven K, Weber RG.:** Rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnosis and its application to aneuploidy screening of human polar bodies. *Fertil Steril*. 2008 Sep;90(3):488-96.
 32. **Van Blerkom J, Henry G.:** Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 1992 Mar;7(3):379-90.
 33. **Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A, Garcia-Bernardo J.:** Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):1006.e7,1006.e10.
 34. **Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, Fryns JP, Verbeke G, D'Hooghe T, Moreau Y, Vermeesch JR.:** Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med*. 2009 May;15(5):577-83.