

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO  
CAZORLA TALLERI”**



**“EFECTO DE LA EDAD PATERNA SOBRE EL  
DESARROLLO EMBRIONARIO Y DIAGNÓSTICO  
GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA  
ANEUPLOIDIAS EN PAREJAS SOMETIDAS A  
TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA CON  
OVODONACIÓN”**

**ZENaida NAOMI INOUE SAKAMOTO**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA**

**Lima – Perú**

**2017**



**ASESOR INTERNO**

Dr. Gustavo Gonzales Rengifo

**ASESOR EXTERNO**

Dr. Luis Guzmán Masías

*A mi familia*

*A mi novio*

*A mis amigos*

*Este trabajo refleja todo lo aprendido en esos cinco años de estudios, cinco años que me sirvieron para ampliar mis conocimientos y perspectivas; conocí gente maravillosa en el camino que ahora es parte importante en mi vida.*

*Aquí culmina mi etapa universitaria, fue un camino largo y abrumador, pero necesario y de buenos recuerdos. No creo haber podido lograrlo sola, siempre estuvieron esas personas, las más indicadas, cerca de mí, escuchándome, aconsejándome y acompañándome.*

*Gran parte de mi corazón le pertenece a mi familia, esas personas desinteresadas y llenas de sabiduría que te enseñan a dar los pasos correctos en la vida, gracias por todo su amor incondicional.*

*A mi novio, mi mejor amigo y mi todo, que me ha apoyado en todo este recorrido, te debo todo en este mundo, te agradezco con todo mí ser por esa paciencia y cariño incomparable.*

*A mis grandes amigos, esos tres individuos que me sacan una sonrisa con ese sentido de humor negro que los caracteriza, gracias por su linda y cálida amistad que a pesar de la distancia nada nos separa.*

*A mis amigas, hermanas y confidentes, esas mujeres que te enseñan a aprender de tus errores y no tienen miedo de decírtelo de frente. Por todo el apoyo y sinceridad, gracias por estar ahí en los momentos más difíciles y hermosos.*

*A mis colegas, esas maravillosas personas que conocí hace 2 años que me brindaron toda su amistad desde el primer día y ahora son parte importante en este trayecto.*

*Todo mi agradecimiento y cariño a mis asesores, sin ustedes esto no hubiera sido posible, muchas gracias por ofrecerme parte de su tiempo y apoyo.*

*Agradezco al laboratorio de Endocrinología y Reproducción por el cariño y completo apoyo a lo largo de mi carrera universitaria.*

*Finalmente, agradezco a mi centro de labores, el laboratorio PRANOR, que me abrió las puertas al mundo profesional.*

# INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. GAMETOGÉNESIS.....	4
1.1.1. OVOGÉNESIS.....	4
1.1.2. ESPERMATOGÉNESIS.....	5
1.2. ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA.....	8
1.2.1. ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA FEMENINA.....	9
1.2.2. ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA MASCULINA.....	12
1.3. INFERTILIDAD.....	13
1.4. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	14
1.4.1. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE BAJA COMPLEJIDAD.....	16
1.4.2. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE ALTA COMPLEJIDAD.....	16
1.5. EDAD Y REPRODUCCIÓN.....	19
1.5.1. EFECTO DE LA EDAD MATERNA.....	19
1.5.2. EFECTO DE LA EDAD PATERNA.....	20
1.6. MODELOS DE ESTUDIO CON CICLOS DE OVODONACIÓN.....	23
1.7. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDIAS.....	24
1.7.1. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE.....	25
1.7.2. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA POR MICROARREGLOS.....	26

1.7.3. SECUENCIAMIENTO GENÉTICO DE SIGUIENTE	
GENERACIÓN.....	26
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS.....	27
4.1.OBJETIVO GENERAL.....	27
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5. METODOLOGÍA.....	28
5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	28
5.2. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN DE ALTA	
COMPLEJIDAD.....	29
5.3. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	34
5.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	37
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
6. RESULTADOS.....	38
6.1.COMPARACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL ENTRE LOS	
GRUPOS ETARIOS.....	38
6.2.EVALUCIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO ENTRE	
LOS GRUPOS ETARIOS.....	41
6.2.1. EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN.....	42
6.2.2. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN DÍA	
3.....	43
6.2.3. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN DÍA	
5.....	45
6.3.CORRELACIÓN DE LAS TASAS DE EMBARAZO ENTRE LOS	
GRUPOS ETARIOS.....	49

6.4.EVALUACIÓN DE LOS CICLOS CON DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDÍAS ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS.....	51
6.4.1. EVALUACIÓN DE LOS CICLOS CON PGD-A POR FISH ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS.....	51
6.4.2. EVALUACIÓN DE LOS CICLOS CON PGD-A POR aCGH o NGS ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS.....	53
6.4.3. EVALUACIÓN DE LA TASA DE ANEUPLOIDÍAS Y EDAD PATERNA.....	54
7. DISCUSIÓN.....	57
7.1. COMPARACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS.....	57
7.2. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS.....	59
7.3. CORRELACIÓN DE LAS TASAS DE EMBARAZO ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS.....	63
7.4. EVALUACIÓN DE LOS CICLOS CON DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDÍAS ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS.....	65
8. CONCLUSIONES.....	67
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## RESUMEN

La postergación de la paternidad ha llevado a muchas parejas a acudir a centros de medicina reproductiva debido a los problemas de infertilidad que padecen. Diversos estudios han demostrado que los problemas de infertilidad aumentan a causa de la avanzada edad materna. Sin embargo, los efectos de la avanzada edad del varón sobre los resultados de los tratamientos de reproducción asistida (TRA) son controversiales. El objetivo principal del estudio fue demostrar el efecto de la edad paterna sobre el desarrollo embrionario, desde la etapa de fecundación hasta el estadio de blastocisto; además, evaluar la relación entre los resultados del diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías (PGD-A, por sus siglas en inglés) y el incremento de la edad paterna en parejas sometidas a tratamientos de reproducción asistida en ciclos con ovodonación. Este estudio retrospectivo de cohortes incluyó 2169 procedimientos con ovodonación realizados en un laboratorio privado de reproducción asistida, a partir de enero del 2011 hasta agosto del 2016, distribuidos en tres grupos según la edad paterna: Grupo 1: <40 años; Grupo 2: 40-49 años y Grupo 3:  $\geq 50$  años. Los parámetros seminales, desarrollo embrionario, las tasas de embarazo y embriones euploides fueron evaluados en el análisis. Se encontraron diferencias en los parámetros seminales (volumen y motilidad progresiva) entre los grupos. Sin embargo, la tasa de fecundación, embriones de excelente calidad en día 3 y día 5, y tasa de utilización no tuvo diferencias en el grupo de  $\geq 50$  años. Además, las tasas de embarazo, abortos espontáneos y tasa de embriones euploides fueron similares entre grupos. En conclusión, la avanzada edad paterna ( $\geq 50$  años) tiene un impacto negativo sobre los parámetros seminales de volumen y motilidad progresiva. Sin embargo, no disminuye la tasa de éxito de las TRA en ciclos de ovodonación.

**Palabras Claves:** edad paterna, parámetros seminales, desarrollo embrionario, tasas de embarazo, PGD-A.

## ABSTRACT

Parenthood delay has led couples to attend medicine reproductive centers due to infertility problems. Several studies have demonstrate the adverse effects of advance maternal age on fertility. Although, the influence of advance paternal age on assisted reproductive technology (ART) outcomes is still controversial. The purpose of this study was to demonstrate the influence of paternal age on embryo development, since fertilization to blastocyst stage. Moreover, to evaluate the relationship between euploid embryo rates, testing by preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies (PGD-A), and the increase of paternal age on oocyte donation cycles. This retrospective cohort study included 2169 oocyte donation cycles performed in a private assisted reproduction center between January 2011 and august 2016. Cycles were classified by male age: Group 1: <40 years; Group 2: 40-49 years and Group 3:  $\geq 50$  years. Seminal parameters, embryo development, pregnancy rates and euploid embryo rates were analyzed. Sperm volume and progressive motility were decreased in the advance paternal age group. Although, male age was not associated with fertilization rates, good quality embryos on day 3 and 5, and utilization rates. Additionally, not significant correlation was found between male age and pregnancy, miscarriage and euploid embryo rates. In conclusion, advance paternal age ( $\geq 50$  years old) is adversely associated with semen volume and progressive motility. However, no unfavorable effects of paternal age were found on ART outcomes.

**Key words: paternal age, seminal parameters, embryo development, pregnancy rates, PGD-A**

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la paternidad se encuentra en un cambio constante debido a diversos factores sociales que obligan a redefinir los roles de género que la sociedad ha impuesto durante las últimas décadas. Un ejemplo claro de ello es la evolución del papel de la mujer en la sociedad, donde ya no ocupa un rol pasivo en los temas económicos del hogar, asumiendo una posición decisiva y más determinante.

Hoy en día se observan relaciones de pareja con mayor igualdad de responsabilidades; estas parejas, en muchas oportunidades, escogen postergar la paternidad. Sin embargo, aumentan los problemas de infertilidad por aumento de la edad.

Los efectos de la edad materna en la reproducción ya han sido ampliamente estudiados. Muchos de ellos han demostrado que la reserva ovárica disminuye estrechamente a partir de los 35 años, además la tasa de aneuploidías aumenta debido a errores en la meiosis, provocando posteriormente, bajas tasas de fecundación, implantación y embarazo (1-4). Por otro lado, se conoce que en el varón la espermatogénesis continúa a lo largo de los años permitiendo mantener su capacidad reproductiva, por lo que los efectos de la edad paterna sobre la reproducción se han estudiado en menor medida que la materna.

El deseo de concebir ha llevado a las parejas a acudir a centros de medicina reproductiva para tratar sus problemas de infertilidad. Donde los especialistas examinan las posibles causas y con ello proponer los diferentes tratamientos. En la práctica clínica, los ciclos con ovocitos donados provienen de una población homogénea de mujeres jóvenes, permitiendo eliminar la influencia de la edad materna sobre el desarrollo embrionario. Por lo tanto, los estudios con ovodonación representan un modelo óptimo para el análisis del efecto de la edad paterna.

Varios autores han reportado el efecto negativo de la avanzada edad del varón en los resultados de los procedimientos de reproducción asistida (5-9). Sin embargo, estos son controversiales y difieren entre estudios.

El presente estudio evalúa el desarrollo embrionario *in vitro* desde la fecundación, en el primer día de desarrollo, hasta el estadio de blastocisto, visto en el día 5 o 6 del desarrollo, en función a la edad paterna. Asimismo, evalúa los ciclos con análisis genético con ovodonación y el efecto de la edad del varón, con el fin de demostrar la influencia negativa de la edad paterna en los ciclos de reproducción asistida, así como la importancia de realizar estudios genéticos por el factor edad, posibilitando optimizar los resultados con dicho conocimiento.

## 1.1. GAMETOGENESIS

La gametogénesis comprende una serie de eventos por el cual se desarrollan los gametos (femeninos o masculinos). Durante la gametogénesis se produce una reducción del número de cromosomas por medio de la meiosis.

La gametogénesis femenina u ovogénesis da lugar al ovocito, célula germinal de gran tamaño. Mientras que la gametogénesis masculina o espermatogénesis forma los espermatozoides, células germinales haploides con flagelo (Fig. 1.1.1).

### 1.1.1. OVOGÉNESIS

La ovogénesis es el proceso de desarrollo y diferenciación del ovocito, el proceso inicia en la etapa prenatal con el desarrollo del ovario (Fig. 1.1.1, lado derecho). La célula diploide (ovogonia) se divide mediante mitosis en una fase de multiplicación. Las ovogonias comienzan la primera división meiótica, llegando hasta el diploteno. Los ovocitos primarios son detenidos en profase I hasta la etapa de pubertad.

El inicio de la pubertad, tras la liberación de hormonas sexuales estimula al ovocito primario para continuar con la meiosis. La primera división meiótica da origen a dos células con proporción desigual de citoplasma, la célula con menor tamaño es llamada cuerpo polar, mientras que la célula haploide más grande es el ovocito secundario. A continuación, la célula entra en la segunda división

meiótica y se detiene en metafase II, el folículo retiene al ovocito secundario hasta que la maduración folicular esté completa, el ovocito secundario es expulsado del folículo maduro dando lugar a la ovulación. El movimiento ciliar en las trompas de Falopio permite el desplazamiento del ovocito, aún retenido en metafase II, hasta el útero.

La meiosis se completa si el ovocito es fecundado. La segunda división meiótica da origen a la expulsión del segundo cuerpo polar. Solamente un ovocito secundario es producido por cada ovocito primario que inicia la ovogénesis, dado que los cuerpos polares son reabsorbidos (10, 11) .

### 1.1.2. ESPERMATOGÉNESIS

Los testículos son dos glándulas ovoides que producen las células germinales masculinas (espermatozoides) y las hormonas sexuales masculinas (andrógenos). Dentro de cada testículo se forman los túbulos seminíferos, conductos donde se almacenan las células germinales y donde se produce la espermatogénesis; dentro de esos conductos también se encuentran las células de Sertoli, estas se encargan de formar la barrera hemato-testicular, y de dar soporte estructural y metabólico durante la espermatogénesis. Por otro lado, las células de Leydig, ubicados en el tejido conjuntivo entre los túbulos seminíferos, se encargan de la síntesis y liberación de testosterona.

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación y desarrollo de las espermatogonias para la formación de los espermatozoides por acción de la testosterona, es un proceso continuo que inicia en la pubertad y que acompaña al varón durante toda su vida (Fig. 1.1.1, lado izquierdo). Asimismo, la espermatogénesis en el humano dura aproximadamente 65 días.

En el compartimiento basal de los túbulos seminíferos se almacenan las espermatogonias (células diploides), estas entran en una etapa de proliferación o espermatocitogénesis. La condensación de la cromatina dentro de cada espermatogonia permite su diferenciación, siendo clasificadas como: tipo A

oscura, A clara y B. De tal manera que asegura una producción continua y constante de espermatogonias.

- La espermatogonia tipo A oscura, es de reserva, se dividen por mitosis para remplazar a las que iniciaron diferenciación.
- La espermatogonia tipo A clara, al dividirse forma 2 espermatogonias tipo A claras o 2 de tipo B.
- La espermatogonia tipo B, son las precursoras de los espermatozoides primarios.

Las espermatogonias tipo B entran a una fase de crecimiento dando lugar a los espermatozoides primarios. La fase de maduración o meiosis inicia en la pubertad, la primera división meiótica da como resultado 2 células haploides o espermatozoides secundarios. Estos entran a la segunda división meiótica resultando en 4 espermátides redondas haploides. A diferencia de la ovogénesis, un espermatozoides da lugar a cuatro espermátides.

La fase de diferenciación o espermiogénesis convierte las espermátides redondas en células alargadas o espermatozoides. Es en esta etapa donde se forma el acrosoma, el flagelo y el exceso de citoplasma es separado (10, 11).

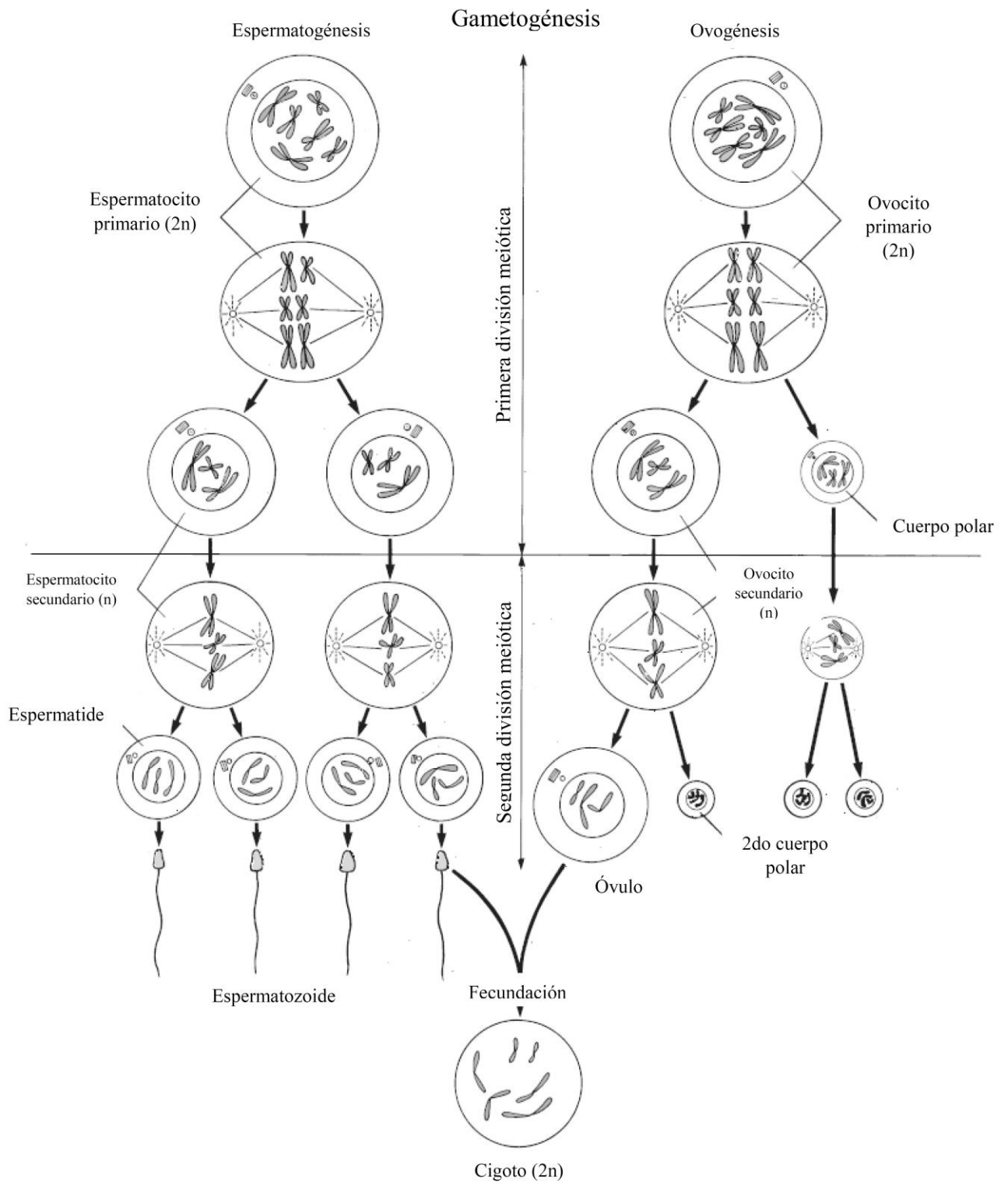


Figura 1.1.1 Proceso de gametogénesis en mujeres y varones. A la izquierda se observa la espermatogénesis, mientras que a la derecha, la ovogénesis. Adaptado del libro "Concepts in biology".

## 1.2.ENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA

La pubertad se inicia tras la liberación de distintas hormonas desde el hipotálamo, la hipófisis, glándulas adrenales y ovarios o testículos. El sistema endocrino se rige bajo el control del hipotálamo, región del cerebro que forma parte del diencéfalo y se encuentra ubicado debajo del tálamo. Además, regula la liberación de hormonas de la hipófisis, glándula endocrina encargada de regular la homeostasis y ubicada en la silla turca del hueso esfenoides.

El eje hipotálamo hipofiso gonadal permite la diferenciación y maduración del sistema reproductor. La liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) desde las neuronas hipotalámicas hacia el sistema porta, comunica con la red vascular de la adenohipófisis estimulando la secreción de la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) con el fin de actuar sobre las gónadas y realizar la esteroidogénesis y gametogénesis.

Las hormonas secretadas desde las gónadas ejercen un control de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la adenohipófisis para inhibir la secreción de GnRH, y FSH y LH, respectivamente. De tal manera que se regula la secreción de las hormonas sexuales. Asimismo, la hormona inhibina suprime la liberación de FSH desde las gónadas (12) (Fig. 1.2.1).

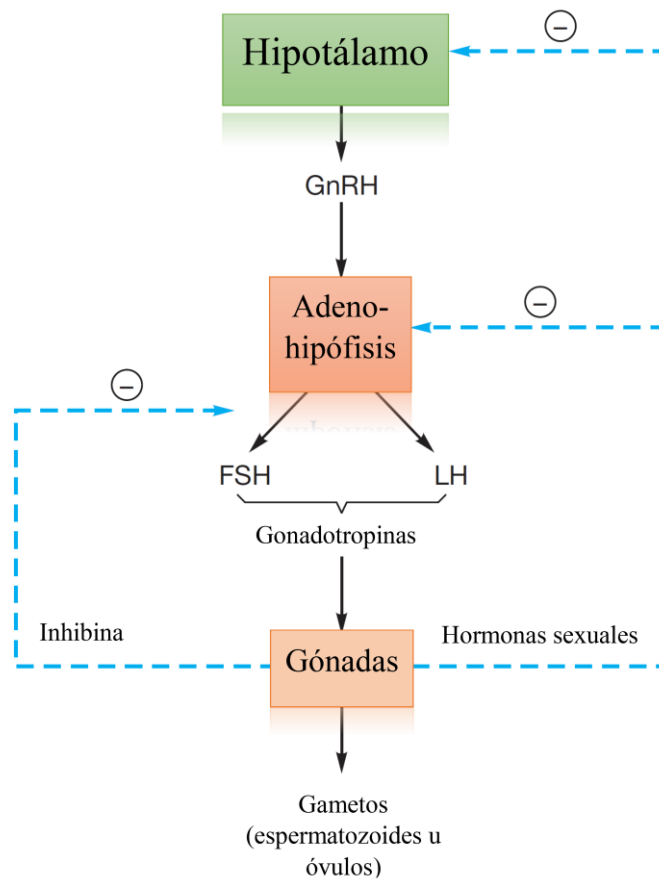


Figura 1.2.1. Diagrama de regulación del eje hipotálamo hipofiso gonadal. Adaptado del libro “Human Physiology”

### 1.2.1. ENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA FEMENINA

Una de las funciones más importantes del eje hipotálamo hipofiso ovárico (HHO) es la regulación del sistema reproductor femenino. El inicio de la maduración sexual femenina se produce en un ciclo de 28 días de duración en el cual la GnRH controla la liberación pulsátil de LH y FSH estimulando la producción y secreción de estrógenos y progesterona.

La hormona folículo estimulante (FSH) es la hormona que controla el desarrollo folicular y ovocitaria interactuando con receptores específicos localizados en las células de la granulosa. Su actividad biológica involucra el

reclutamiento cíclico de folículos, la comunicación intercelular y la regulación de la esteroidogénesis, mediante la activación de la aromatasa. Mientras que la estimulación por LH, permite la maduración nuclear del ovocito, dando lugar a la meiosis. Además, el folículo en desarrollo expresa receptores de LH que permite secretar progesterona y testosterona.

Dichas hormonas gonadotrópicas llevan a cabo el control de la función ovárica y endometrial en un ciclo continuo (ciclo menstrual) que se divide en fase folicular (duración: 7 a 21 días) y fase lútea (duración 14 días), donde la ovulación se da entre ambas fases.

La fase folicular inicia el primer día del ciclo menstrual y dura hasta la ovulación. En esta fase, las paredes del endometrio se preparan para la implantación. Mientras que en el ovario, una cohorte de folículos son reclutados bajo el efecto de la FSH. En la fase folicular tardía, aumenta la liberación de LH y FSH progresivamente, una vez que el folículo dominante madura completamente, este producirá grandes cantidades de estrógeno que desencadenará la retroalimentación positiva en el eje HHO, estimulando en paralelo los gonadotropos y elevando las concentraciones de LH y FSH. La ruptura del folículo con la liberación del ovocito se dará por el pico de LH.

Luego de la ovulación, las células del folículo experimentan una serie de cambios morfológicos, dando lugar al cuerpo lúteo, encargado de la secreción de las hormonas sexuales en la etapa post ovulatoria (fase lútea). De ocurrir la implantación embrionaria, las células del trofoblasto (precursoras de los tejidos extraembrionarios) secretarán grandes cantidades de la hormona gonadotrópica coriónica (hCG), estimulando al cuerpo lúteo para producir y mantener la liberación de progesterona necesaria para el mantenimiento del embarazo.

De no ocurrir la implantación, los estrógenos y progesterona inhibirán la secreción de FSH y LH por retroalimentación negativa, haciendo que al final de la fase lútea las concentraciones de estrógenos y progesterona disminuyan. Por último, el cuerpo lúteo regresa e inicia un nuevo ciclo menstrual (Fig. 1.2.2) (10-12).

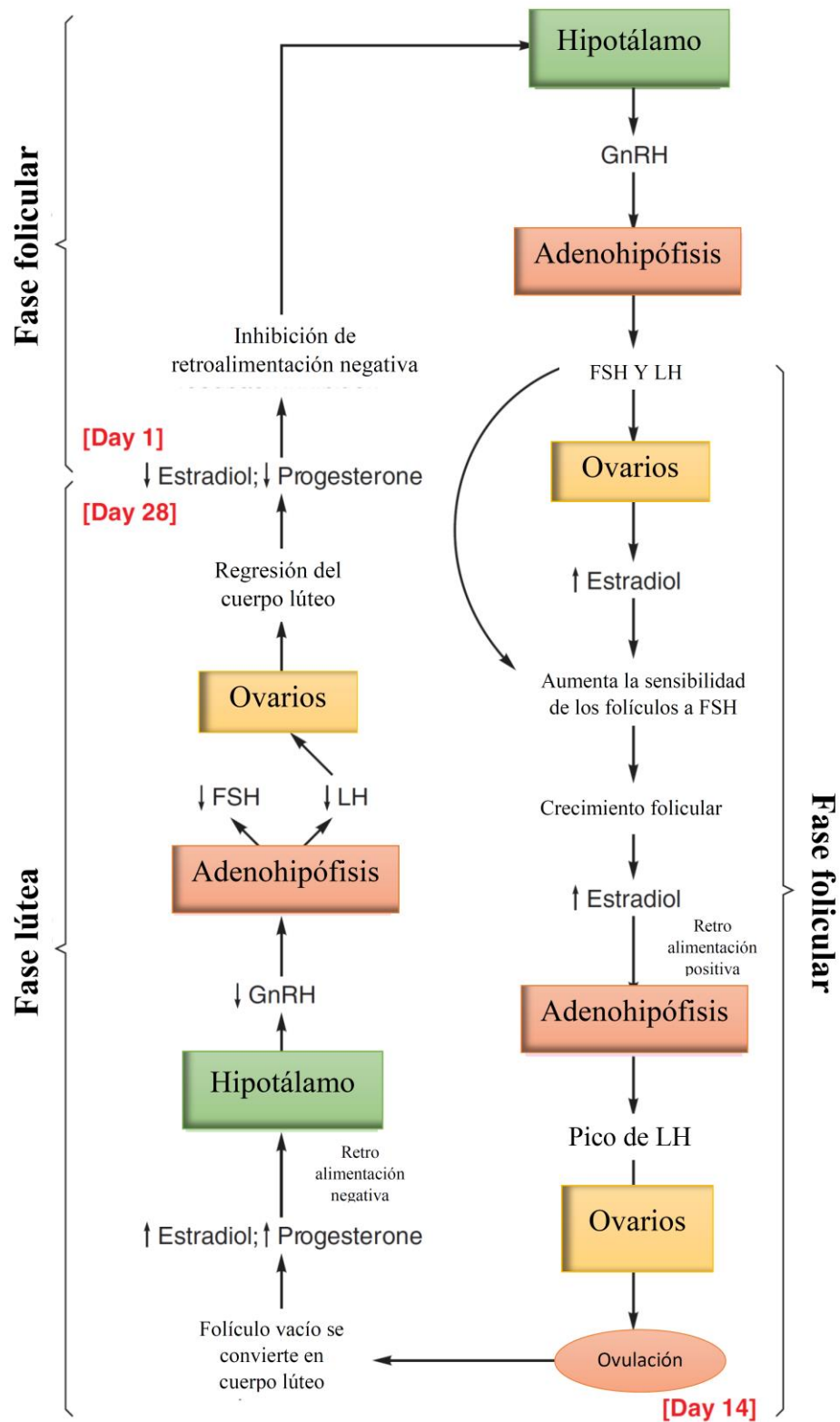


Figura 1.2.2. Control endocrino del ciclo ovárico. Adaptado del libro “Human physiology”.

### 1.2.2. ENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA MASCULINA

La función testicular está regulada por el eje hipotálamo hipofiso testicular (HHT). La liberación pulsátil de GnRH desde las neuronas hipotalámicas estimulan la secreción de LH y FSH en la adenohipófisis y estas actúan sobre los testículos para realizar la gametogénesis y esteroidogénesis.

La FSH actúa sobre los receptores ubicados en las células de Sertoli para iniciar la espermatogénesis. Esta función permite la producción continua de espermatozoides a lo largo de la vida del varón. Asimismo, la FSH aumenta la producción de la proteína ligadora de andrógenos (ABP) en las células de Sertoli. La ABP se une con la testosterona (T) para mantener una concentración adecuada en el epitelio seminífero indispensable en la espermatogénesis. Por otro lado, las células de Sertoli producen inhibina para frenar la secreción de FSH en la hipófisis, además tanto estradiol como T hacen retroalimentación negativa sobre el eje HHT.

Mientras que la estimulación de LH sobre los receptores ubicados en las células de Leydig induce la síntesis de T. En este caso, la producción de T estará determinada por los niveles disponibles de LH, y a la vez T inhibe la secreción de LH por retroalimentación negativa sobre la producción de GnRH y LH. Esta regulación permite que en bajas concentraciones de T, los niveles de GnRH y LH aumenten para incrementar la síntesis de T (Fig. 1.2.3).

La producción de testosterona es indispensable para la diferenciación y desarrollo como parte del fenotipo masculino, el correcto funcionamiento de las glándulas sexuales accesorias y el aparato genital, y la continua producción de gametos. Asimismo, ejerce un papel importante sobre el sistema nervioso sexual, estimulando y manteniendo el deseo sexual e influyendo sobre la erección. Por otro lado, su función no es netamente sexual, se han descubierto otras acciones biológicas importantes en el organismo indispensable para la salud del varón (10-12).

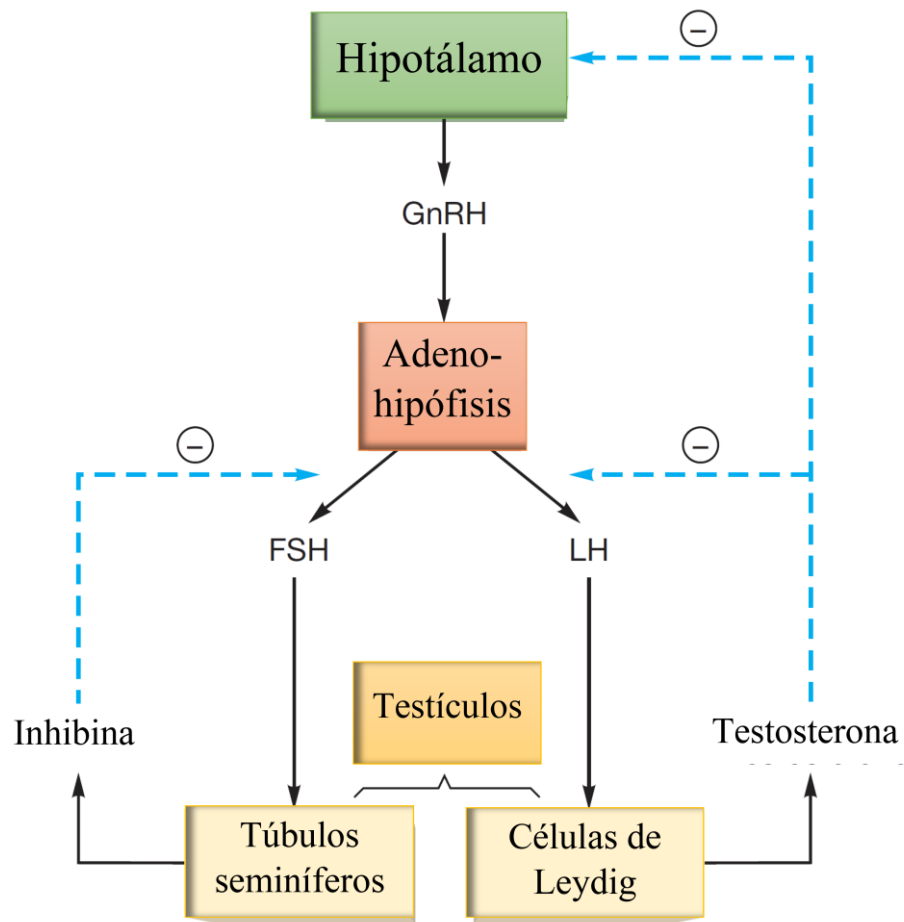


Figura 1.2.3. Control endocrino del eje HHT. Adaptado del libro “Human physiology”.

### 1.3. INFERTILIDAD

La infertilidad es una enfermedad definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de un año o más de relaciones sexuales sin alguna técnica de anticoncepción (13).

Las causas de infertilidad son diversas y afecta a ambos sexos. Siendo su origen a nivel anatómico, fisiológico y/o factores genéticos, así como también factores epigenéticos que podrían influir en dichos cambios. Esta enfermedad afecta tanto a varones como mujeres en edad reproductiva, siendo el factor

femenino entre 30% al 55% de los casos reportados, del 20% al 40% de los casos del factor masculino, el 35% involucra ambos factores, mientras que del 5% al 10% de los casos, la causa de la infertilidad no puede ser explicada (14).

La infertilidad al ser reconocida como una enfermedad se debe identificar y tratar sus causas probables. En el 2010, se estimó que 48.5 millones de parejas a nivel mundial tenían algún problema de infertilidad (15). En la mujer, los trastornos menstruales y de ovulación, las alteraciones anatómicas, y desordenes del sistema endocrino son las causas más comunes de infertilidad. Mientras que en el varón, la calidad seminal alterada es una de las más frecuentes (14).

El deseo de concebir ha llevado a las parejas a acudir a centros de medicina reproductiva para tratar sus problemas de infertilidad. Donde los especialistas examinarán las causas probables y con ello proponer los diferentes tratamientos. El avance de la tecnología y nuevas estrategias ha permitido desarrollar técnicas de reproducción asistida con el único fin de lograr un embarazo y llevar un bebe a casa.

#### 1.4. TÉCNICAS DE REPRODUCCION ASISTIDA

Las primeras investigaciones sobre reproducción asistida se realizaron en modelos animales en la segunda mitad del siglo XX, recuperando óvulos del oviducto y exponiéndolos junto con espermatozoides de eyaculado, logrando fecundación (16). En 1951, se descubrió el fenómeno de la capacitación espermática en mamíferos, cambios por los que pasa el espermatozoide para adquirir capacidad fecundante (17). Hasta ese momento, se dieron a conocer varios criterios para diferenciar la fecundación de la activación partenogénica del óvulo (18).

En la década de los 60, ya se tenían conocimientos de algunas técnicas en reproducción asistida en animales: recolección de óvulos, capacitación espermática, fecundación *in vitro* (FIV), cultivo embrionario y transferencia embrionaria (19). Sin embargo, aún no se realizaban estos procedimientos en humanos.

Hasta casi finales del siglo XX, las parejas infértiles debían resignarse a concebir o aceptar la adopción de un bebe. Es así como en 1978, especialistas en reproducción plantearon la posibilidad de fecundar los gametos de manera *in vitro*. La extracción de un único ovulo existente y el acercamiento de los espermatozoides en una placa Petri permitió el desarrollo de un embrión humano *in vitro*. Este fue transferido al útero materno dando lugar a un embarazo normal (20). El 25 de julio del mismo año, nació la llamada “bebe probeta”, Louise Brown, el cual impulsó al desarrollo de nuevas estrategias de reproducción asistida en humanos. Sin embargo, un considerable número de parejas aún no podían resolver sus problemas de infertilidad, esto debido a problemas de fecundación que se presentaban en el laboratorio. Esto permitió el desarrollo de diversas técnicas de micromanipulación de gametos en modelos animales que permitirían aumentar las tasas de fecundación. Más adelante, en 1988, Lanzendorf realizó la primera inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con ovocitos humanos, demostrando que el ovocito humano es capaz de sobrevivir a la microinyección y a la vez lograr fecundación (21). Desde el primer embarazo reportado por Palermo y col en 1992 (22), el ICSI se ha utilizado para tratar casos de factor masculino severa y fallas previas de fecundación.

Asimismo, no todos los embriones obtenidos tras la fecundación son transferidos al útero materno. Por lo que se desarrollaron técnicas de congelación embrionaria con el objetivo evitar la multigestación, transfiriendo un número reducido de embriones. Además, en el caso de embarazos fallidos tras FIV, los embriones almacenados de ciclos anteriores pueden ser descongelados y transferidos (23).

En la actualidad, las técnicas de reproducción asistida (TRA) han ayudado a miles de parejas a resolver sus problemas de infertilidad a nivel mundial. Los métodos para llevar acabo las TRA son complejos y se adecuan según los diferentes casos que se presentan, cada ciclo de reproducción asistida consiste en varios pasos con el único fin de tener un embarazo, reduciendo los efectos adversos, con el menor número posible de intentos (24).

Las TRA se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Las técnicas de baja complejidad, que facilitan la unión de los gametos de manera *in vivo* con el fin de favorecer el embarazo. P.ej. inseminación artificial (intravaginal, intracervical intrauterina, entre otros)
- Las técnicas de alta complejidad, que consisten en llevar a cabo la fecundación *in vitro*, el cultivo embrionario, seguido de la transferencia de embriones.

#### 1.4.1. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE BAJA COMPLEJIDAD

La inseminación intrauterina (IIU) es una técnica de baja complejidad mínimamente invasiva. Actualmente, la IIU es el método de inseminación más utilizado, mientras que los otros tipos están en desuso. Esta consiste en el depósito de la muestra capacitada dentro de la cavidad uterina a través del canal cervical mediante un catéter. Asimismo, la inseminación puede ser homologa (semen de la pareja) o heteróloga (semen de donante). En comparación con las TRA de alta complejidad, la IIU necesita menor cantidad de medicamentos reduciendo sus costos. Sin embargo, las tasas de embarazo son menores, las cuales varían entre 13-20% por ciclo de IIU (25), comparado con 25-32% por ciclo en alta complejidad (ovocitos propios) (26).

#### 1.4.2. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA ALTA COMPLEJIDAD

Las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad se realizan en un laboratorio especializado en el cual los ovocitos recolectados mediante una aspiración folicular son manipulados junto con los espermatozoides *in vitro*.

La maduración folicular para FIV se logra tras la estimulación ovárica controlada por medio de la administración de hormonas exógenas, como gonadotropinas o GnRH, que promueven el crecimiento y maduración de múltiples folículos ováricos facilitando la recolección de más ovocitos que incrementen la posibilidad de obtener un número mayor de embriones sanos (27).

Asimismo, según la técnica de inseminación de los espermatozoides de los pacientes en las TRA de alta complejidad se dividen en FIV convencional o ICSI.

La FIV se emplea en aquellos casos en los cuales existe algún tipo de dificultad para el encuentro de los gametos de manera *in vivo*. Se realiza acercando los ovocitos obtenidos y los espermatozoides capacitados en un medio de cultivo, la fecundación se dará mediante la fusión de membranas de los gametos (28). Por otro lado, en casos extremos de infertilidad masculina se recomienda el uso de ICSI para tratar el factor masculino severo y en casos de fallas previas de fecundación tras FIV, este último se realiza en un micromanipulador introduciendo un espermatozoide seleccionado al interior del óvulo mediante una aguja de inyección (22).

Los ovocitos fecundados o cigotos son cultivados en un medio enriquecido para continuar con su desarrollo. Luego en la etapa de clivaje, cada cigoto experimenta una serie de divisiones mitóticas aumentando considerablemente el número de células en su interior, dichas células reciben el nombre de blastómeras. 96 horas tras la fecundación, las blastómeras se compactan, dando lugar a la mórula. Por último, aproximadamente 120 horas (día 5) luego de la fecundación, se evidencia un aumento de líquido dentro de los espacios intercelulares de las células internas de la mórula, formando la cavidad blastocélica, hasta esta etapa el embrión es llamado blastocisto (29) (Fig. 1.4.1). Propiamente dicho, el blastocisto presenta una masa celular interna situado dentro de la cavidad blastocélica que da origen al disco embrionario bilaminar (epiblasto e hipoblasto) durante la etapa de gastrulación. Asimismo, las células del epiblasto dan lugar a las tres capas de tejido embrionario: ectodermo, mesodermo y endodermo; mientras que el hipoblasto da lugar al endodermo extraembrionario (30, 31). Además, presenta una capa externa de células llamadas en conjunto trofoectodermo, este último da lugar a los tejidos extraembrionarios.




---

Figura 1.4.1. Evaluación del desarrollo embrionario

Uno de los procedimientos de rutina en el laboratorio es la evaluación de la calidad embrionaria. Diversos estudios han demostrado correlación positiva entre la calidad embrionaria y las tasas de implantación y embarazo. Esto debido a que la calidad está relacionada con el buen desarrollo del embrión y la capacidad de interactuar con el endometrio (32, 33). Hasta hace algunos años, los embriones han sido evaluados en la etapa de clivaje, en el día 3 del desarrollo, para transferencia y/o criopreservación, ya que los sistemas de cultivo no permitían cultivar a los embriones por más tiempo. Más adelante con el desarrollo de nuevas estrategias, diversos sistemas de cultivo fueron empleados pudiendo llevar a cabo el desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, en el día 5 del desarrollo (34). Esto ha permitido un mejor proceso de selección que aumentó las tasas de embarazo. Asimismo, permite una sincronización entre el embrión y el endometrio, siendo el estadio de blastocisto la fase previa a la implantación (32).

## 1.5.EDAD Y REPRODUCCIÓN

En la actualidad, la búsqueda de la paternidad se encuentra en un cambio constante, esto debido a diversos factores sociales que obligan a redefinir los roles de género que la sociedad ha impuesto durante las últimas décadas. Un ejemplo claro de ello es la evolución del papel de la mujer en la sociedad, donde ya no ocupa un rol pasivo en los temas económicos del hogar, asumiendo una posición más determinante y decisiva. Hoy en día se observan relaciones de pareja con mayor igualdad de responsabilidades; estas parejas, en muchas oportunidades, escogen postergar su paternidad. Sin embargo, aumentan los problemas de infertilidad por aumento de la edad.

La infertilidad está influenciada por diversos factores, de los cuales algunos aún no se conocen las causas exactas. Sin embargo, la avanzada edad de la mujer es uno de los factores más importantes en determinar la probabilidad de embarazo (35).

#### 1.5.1. EFECTO DE LA EDAD MATERNA

El envejecimiento de la mujer está caracterizado por un declive de la capacidad reproductiva a partir de los 35 años y se acentúa pasando los 40 años. Diversos estudios han demostrado que la reserva y calidad ovocitaria disminuyen estrechamente (36, 37). Asimismo, se evidencian cambios fisiológicos en el eje HHO, donde las concentraciones de la hormona folículo FSH y la LH aumentan en respuesta a la pérdida de maduración folicular, mientras que los niveles de estradiol decaen (38). En la práctica clínica es de suma importancia evaluar la reserva folicular, ya que es una variable predictiva de la respuesta a la estimulación ovárica para las TRA (39). Más aun, la tasa de aneuploidías aumenta debido a errores en la meiosis, provocando posteriormente, bajas tasas de fecundación, implantación y embarazos (1-4).

Durante la maduración ovocitaria, el ovocito experimenta un sustancial cambio a nivel citoplasmático. La maduración citoplasmática del ovocito permite el correcto desarrollo embrionario para lograr un embarazo viable, esto depende de los ácido ribonucleico mensajeros (mRNAs) maternos preexistentes, proteínas y otros (p.ej. mitocondrias) que se acumulan durante el crecimiento y maduración ovocitaria (40).

Sin embargo, la edad afecta negativamente la maduración citoplasmática teniendo una repercusión sobre la competencia ovocitaria. Estudios sugieren que las pacientes infértiles con edad avanzada tienen una actividad mitocondrial anormal y una producción menor de ATP (adenosín trifosfato, por sus siglas en inglés) interfiriendo con el desarrollo embrionario normal. Esto puede ser explicado debido a que en mujeres de edad avanzada los ovocitos han sido expuestos por décadas a niveles bajos de especies reactivas de oxígeno producidas por la respiración mitocondrial, resultando en un daño acumulativo a las mismas mitocondrias y ADN mitocondrial (mtDNA, por sus siglas en inglés) (40, 41).

Asimismo, mujeres de edad reproductiva avanzada (>40 años de edad) que se someten a ciclos de reproducción asistida tienen mayor riesgo de complicaciones gineco-obstétricas (p. ej. Hipertensión gestacional, preeclampsia y partos prematuros) en comparación con mujeres de la misma edad con embarazos espontáneos (42).

Por otro lado, se conoce que en el varón su capacidad reproductiva continúa a lo largo de los años, por lo que los efectos de la edad paterna sobre su fertilidad se han estudiado en menor medida que la materna.

### 1.5.2. EFECTO DE LA EDAD PATERNA

En el varón se han observado cambios a todo nivel del eje HHT. Alteraciones en el generador de pulsos de GnRH, secreción de gonadotropinas y esteroidogénesis testicular pueden influir en la disminución de la concentración de testosterona total (43). La disminución de testosterona decae progresivamente a partir de los 30 años siendo significativamente menor a los 60 años en adelante (44, 45). Se ha reportado una disminución del volumen testicular en varones mayores de 60 años, reduciendo hasta un 31% del volumen en mayores de 75 años en comparación con varones entre 18 y 40 años. Esta diferencia está asociada con el aumento de los niveles de gonadotropinas y la disminución de testosterona libre (46, 47). Asimismo, cada vez hay más estudios que demuestran las diferentes funciones de los andrógenos y sus metabolitos a parte de los reproductivos, se pueden evidenciar cambios en la composición muscular y lipídica, enfermedades cardiovasculares, función cognitiva y osteoporosis (48). Sin embargo, la

disminución en las concentraciones de testosterona no llega a ser imperceptibles pudiendo continuar con su capacidad reproductiva (49). Cabe recalcar que la deficiencia de andrógenos no es solo dependiente de la edad, si no también está influenciada por otros factores, p ej. Diabetes, obesidad, insuficiencia cardiaca, enfermedades renales, uso de glucocorticoides, entre otros (50-54).

La prueba inicial incluso para varones con fertilidad comprobada es el estudio básico del semen o espermatograma, el cual evalúa características macroscópicas y microscópicas mediante el análisis del líquido seminal. Los valores de referencia utilizados para el análisis son los de la Organización Mundial de la Salud (OMS) tomado en cuenta el 5to percentil como valor mínimo de referencia (Tabla 1.5.1) (55).

<b>Parámetro</b>	<b>Límite de referencia inferior (LRI)</b>
<b>Licuefacción</b>	Total a los 60 minutos
<b>pH</b>	≥7.2
<b>Volumen (mL)</b>	1.5 (1.4 – 1.7)
<b>Concentración espermática (10<sup>6</sup>/mL)</b>	15 (12 – 16)
<b>Concentración total (10<sup>6</sup>/mL)</b>	39 (33 – 46)
<b>Motilidad total (PR + NP, %)</b>	40 (38 - 42)
<b>Motilidad Progresiva (PR, %)</b>	32 (31 - 34)
<b>Viabilidad</b>	58 (55 - 63)
<b>Morfología</b>	4 (3.0 - 4.0)

Tabla 1.5.1. Límite de referencia inferior (intervalo de confianza del 95%) del espermatograma. Fuente: OMS 5ta edición, 2010.

PR: motilidad progresiva (grado a + b)

NP: motilidad no progresiva (grado c)

Existe gran controversia sobre el efecto de la edad paterna sobre cambios en los parámetros seminales. Algunos autores han reportado la disminución de al menos 30% en la producción diaria de espermatozoides en varones por encima de los 50 años esto podría deberse a cambios en la distribución celular en testículos

y variaciones en las concentraciones hormonales (56, 57). Por otro lado, una comparación entre varones jóvenes (21-25 años) con varones mayores de 50 años demostró que los parámetros de volumen seminal, motilidad y morfología espermática eran menores en el grupo de varones de mayor edad, este estudio fue ajustado a los días de abstinencia sexual (58). En concordancia con este grupo, un metaanálisis concluyó que a partir de los 50 años el volumen seminal, la motilidad y morfología espermática disminuyen en comparación con varones de 30 años, mas no encontraron correlación con la concentración espermática (59).

Continuando con los parámetros seminales, se ha demostrado que la motilidad espermática depende de diversos factores, uno de ellos es el mecanismo post testicular. La espermatogénesis inicia en la red de túbulos seminíferos dentro del testículo, continua su maduración en el epidídimo dando lugar a la fase de espermiogénesis, es en esta fase donde adquieren la capacidad de movimiento. Por otro lado, la interacción de los componentes secretados por la vesícula seminal y la próstata permiten la licuefacción del semen, que posteriormente libera a los espermatozoides móviles. Estudios anteriores no han mostrado correlación entre edad y las secreciones del epidídimo y próstata (evaluados por sus marcadores alfa glucosidasa y zinc, respectivamente). Sin embargo, la función de la vesícula seminal medida a través del marcador de fructuosa se vio disminuida significativamente con relación al incremento de la edad. Asimismo, otro estudio demostró que los marcadores seminales del epidídimo y glándulas sexuales accesorias (próstata y vesícula seminal) disminuyen significativamente en varones mayores de 50 años afectando negativamente el porcentaje de espermatozoides motiles y a la vez el volumen seminal (60). Más aun, se ha demostrado que problemas en el epidídimo podría influenciar el bajo porcentaje de espermatozoides normales morfológicamente a causa de la edad avanzada del varón (58).

Por otro lado, la calidad seminal no determina, por si sola, el éxito de las TRA. Por lo que antes de realizar un procedimiento de reproducción asistida es recomendable realizar un análisis exhaustivo de los posibles problemas que podrían presentarse, tanto a nivel endocrino, como anatómico. Así como también, los defectos que podrían tener los gametos. Dada la problemática acerca de la baja

reserva ovárica en mujeres de edad avanzada, a este grupo de pacientes se les sugiere realizar ciclos de FIV/ICSI con óvulos donados.

## 1.6. MODELOS DE ESTUDIO CON CICLOS DE OVODONACIÓN

El primer embarazo logrado tras la donación de ovocitos fue reportado en 1984 por Lutjen y col (61), este avance permitió tratar el problema de infertilidad femenina dado por insuficiencia ovárica prematura. Desde entonces, los programas de ovodonación han ayudado a aumentar considerablemente las tasas de embarazo. Se ha registrado que aproximadamente 50 000 ciclos con ovodonación se realizan anualmente en Europa y EEUU (62).

El registro de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (RedLara) del 2014 muestra que las tasas de embarazo clínico con ovocitos propios fue de 30.89% y 33.24% (ICSI y FIV, respectivamente). Mientras que la tasa de embarazo clínico con ovocitos donados fue de 50.87% (independientemente de la técnica de inseminación) (63).

Estudiar el efecto de la edad paterna en ciclos de FIV es complicado debido a las numerosas variables confusoras en el análisis. Esto debido a que usualmente los varones tienen parejas de su misma edad. Por otro lado, los ciclos con ovocitos donados provienen de una población homogénea de mujeres jóvenes, permitiendo eliminar la influencia de la avanzada edad materna sobre el desarrollo embrionario. Por lo tanto, los estudios con ovodonación representan un modelo óptimo para el análisis del efecto de la edad paterna. Varios autores han reportado el efecto negativo de la edad del varón en los resultados de los procedimientos de reproducción asistida.

El efecto de la edad del varón sobre su función reproductiva se observa en menor grado en comparación con el de la mujer. Asimismo, se han utilizado diferentes grupos etarios para evidenciar dicho efecto. Luna y col. (2009) Mostraron que el desarrollo embrionario, a partir de la fecundación, etapa de clivaje y blastulación, se ve comprometido a partir de 60 años (5). Sin embargo,

muchos otros no encontraron diferencias en el desarrollo embrionario temprano, hasta la etapa de clivaje; pero evidenciaron baja tasa de formación de blastocistos, menor tasa de embriones de buena calidad morfológica, fallas de implantación y bajas tasas de embarazo (64-66).

De La Rochebrochard y col. (2003) encontraron que a partir de los 40 años las tasas de éxito de las TRA se ven comprometidas. Estableciendo un punto de corte de 40 años en la vida reproductiva de los varones en el cual las tasas de éxito van disminuyendo (67). Algunos estudios concuerdan con lo encontrado por De La Rochebrochard y col., en los cuales mencionan que varones entre 40 y 45 años tienen mayores problemas para concebir. Sin embargo, los mecanismos involucrados en este deterioro no han sido establecidos(68).

## 1.7. DIAGNOSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDIAS

El aporte masculino en la fecundación no es solo del set haploide de cromosomas, sino también proveer de un centrosoma funcional y un genoma competente capaz de sintetizar factores, tales como mRNAs o micro RNAs que podrían estar regulando la transcripción en el desarrollo embrionario temprano (69). Fernández-González y colaboradores en el 2008 demostraron que el ovocito es capaz de reparar alteraciones en el ADN espermático, pero si este sistema de reparación falla o es incompleto puede generar patologías a largo plazo (70). Por otro lado, defectos del centrómero espermático o deficiencias del factor activador del ovocito han sido sugeridos como causas tempranas de un efecto paterno, manifestándose como una falla de fecundación o como alteraciones en el desarrollo embrionario (71).

La selección embrionaria se ha basado por muchos años en el criterio morfológico. Sin embargo, se ha demostrado que una buena calidad morfológica no correlaciona con euploidia embrionaria (72). Numerosos estudios señalan que la mayor causa de ciclos de FIV fallidos se debe principalmente a las aneuploidías cromosómicas. Los embriones aneuploides usualmente no implantan o son abortados espontáneamente durante el primer trimestre del embarazo (73). Para

ello, se hace necesario estudiar y evaluar marcadores nucleares que nos permitan predecir el éxito de un tratamiento de reproducción asistida.

### 1.7.1. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE

El diagnóstico genético preimplantacional (PGD, por sus siglas en inglés) por medio de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se usó por primera vez en 1987 (74). Inicialmente dicha técnica detectaba únicamente los cromosomas sexuales tras la biopsia de blastómeras en embriones en etapa de clivaje, esto con el fin de evitar seleccionar embriones portadores de desórdenes genéticos ligados a los cromosomas X e Y. Asimismo, en 1990 se reportaron embarazos exitosos tras la transferencia de embriones seleccionados por PGD (75). Más adelante, FISH se empleó para la detección de aneuploidías utilizando diversas combinaciones de cromosomas, siendo limitado por la incapacidad de amplificar en simultáneo los 24 cromosomas, por lo que se optó por detectar los cromosomas más frecuentes relacionados a abortos espontáneos y enfermedades (13; 14; 15; 16; 18; 21; 22; X e Y) (76). El uso del diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías (PGD-A) por FISH aumentó la tasa de embarazos y nacidos vivos reduciendo significativamente la de abortos espontáneos (77).

Los resultados del análisis mediante PGD-A por FISH se obtienen a los dos días de realizada la biopsia, permitiendo la transferencia embrionaria en el día 5 del desarrollo

La biopsia de blastómeras, en la etapa de clivaje, por medio de FISH fue reemplazado por la biopsia de células del trofoectodermo (78) usando las técnicas de hibridación genómica comparada por microarreglos (aCGH) o el secuenciamiento genético de siguiente generación (NGS), los cuales son capaces de amplificar el genoma completo y analizar los 23 pares de cromosomas (22 pares autosómicos y un par sexual) de los embriones.

### 1.7.2. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA POR MICROARREGLOS

En comparación con el análisis mediante PGD-A por FISH, la técnica de aCGH se realiza en blastocistos tras la biopsia del trofoectodermo, es capaz de producir un análisis cromosómico completo de los 23 pares de cromosomas en las células individuales, incrementando además, la cantidad de ADN disponible para análisis. Esta técnica se basa en la hibridación de todo el ADN del genoma de cada muestra de ensayo contra un ADN normal de referencia (79).

Asimismo, es compatible con el esquema de transferencia en fresco. Sin embargo, la transferencia debe programarse en el día 6 debido a la obtención de los resultados, por lo que se recomienda la criopreservación de todos los embriones para realizar la transferencia en un ciclo diferido.

Por otro lado, existen algunas limitaciones en el uso de PGD-A por aCGH debido a que no detecta mosaicismo cromosomal ni aneuploidía segmental en las biopsias de trofoectodermo (80).

### 1.7.3. SECUENCIAMIENTO GENÉTICO DE SIGUIENTE GENERACIÓN

PGD-A usando aCGH fue reemplazado por el secuenciamiento genético de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) que es capaz de identificar mosaísmo (81). El mosaicismo embrionario es un evento frecuente en el desarrollo preimplantacional del embrión en el cual se encuentran dos o más líneas celulares (82).

La técnica de NGS permite detectar las aneuploidías parciales o segmentales siendo más sensible que el aCGH aumentando la resolución del análisis (81, 83). Algunos estudios comparando los resultados clínicos entre las dos plataformas indican que PGD-A por NGS supera significativamente las tasas de embarazo por aCGH, esto debido a que los embriones mosaico tienen menor potencial implantatorio (80, 84).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El estudio se justifica en la necesidad de definir la influencia de la edad paterna avanzada en los resultados de los procedimientos de reproducción asistida con ovodonación; más aún si tiene efectos negativos sobre el desarrollo embrionario y la tasa de aneuploidías embrionarias.

### 3. HIPÓTESIS

El incremento de la edad paterna tiene un impacto negativo sobre el desarrollo embrionario y reduce la tasa de embriones cromosómicamente normales mediante diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías (PGD-A) en parejas sometidas a tratamientos de reproducción asistida con ovodonación.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la edad paterna sobre el desarrollo embrionario y la tasa de embriones cromosómicamente normales mediante diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías (PGD-A) por hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación genómica comparada por microarreglos (aCGH) o secuenciamiento genético de siguiente generación (NGS) en parejas sometidas a tratamientos de reproducción asistida con ovodonación.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Comparar la calidad seminal entre grupos etarios mediante las mediciones de volumen, concentración espermática y motilidad progresiva.
- b. Determinar si el incremento de la edad paterna influye negativamente sobre el desarrollo embrionario mediante la comparación de la tasa de fecundación, tasa de embriones de excelente calidad morfológica en etapa de clivaje, tasa de utilización de embriones y tasa de blastocistos de buena calidad morfológica en ciclos de reproducción asistida con ovodonación entre los diferentes grupos etarios.

- c. Comparar las tasas de embarazo en ciclos de reproducción asistida con ovodonación entre los diferentes grupos etarios.
- d. Evaluar si la tasa de embriones cromosómicamente normales mediante PGD-A por FISH, aCGH o NGS varía con el aumento de la edad paterna en ciclos de reproducción asistida con ovodonación.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyó en el estudio la información de 2169 ciclos de parejas que hayan realizado algún tratamiento de reproducción asistida mediante el programa de ovodonación anónima, a partir de enero del 2011 a agosto del 2016 en los laboratorios PRANOR, Grupo de Reproducción Asistida. La edad de los varones oscilaba entre 20 y 75 años.

El programa de ovodonación incluyó mujeres jóvenes entre 18 y 31 años de edad, sin antecedentes conocidos de patologías y que cumplieron con los criterios de la Sociedad Americana de Reproducción Asistida.

### 5.2. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE ALTA COMPLEJIDAD

#### Estimulación ovárica controlada

Las donantes recibieron estimulación ovárica controlada con el objetivo de recuperar una cohorte de ovocitos maduros con mayor potencial de desarrollo, reduciendo al mínimo el riesgo de hiperestimulación ovárica. La estimulación ovárica fue similar en cada una de las donantes, recibiendo de manera exógena la Hormona Folículo Estimulante recombinante (rFSH, Gonal-F®, Merck Serono,

Alemania; Elonva®, Schering-Plough, Alemania) o urinaria (uFSH, Bravelle®, Ferring, Suiza), la Hormona Luteinizante recombinante (rLH), y/o la Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG, Menopur®, Ferring, Suiza), en combinación con un antagonista de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (antGnRH, Cetrotide®, Merck Serono, Alemania; Orgalutran®, Schering-Plough, Alemania). La ovulación fue inducida mediante la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG, Gonapeptyl®, Ferring, Suiza; Ovidrel®, Merck Serono, Alemania) al observar vía ecografía transvaginal folículos igual o mayores a 18 mm de diámetro.

#### Aspiración folicular

La aspiración folicular se realizó 36 horas posteriores a la administración de hCG vía ecografía transvaginal con una aguja de aspiración.

El fluido folicular obtenido fue observado bajo una lupa estereoscópica para recuperar los complejos cúmulo ovocitos (CCO) y lavados en medio Global Total Hepes® (LifeGlobal, US). Posterior a la aspiración folicular, los CCO fueron cultivados en gotas de Global Total for Fertilization® (LifeGlobal, US) bajo aceite mineral (Global®, LifeGlobal, US) a 37°C, 7% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>.

#### Preparación y selección espermática

Se excluyeron del estudio los procedimientos que utilizaron muestras obtenidas por biopsia testicular, aspiración de epidídimo, eyaculación retrograda y muestras de donante. Asimismo, procedimientos que utilizaron muestras criopreservadas fueron excluidos del análisis seminal puesto que los parámetros seminales no son semejantes.

Todas las muestras seminales frescas de las parejas fueron obtenidas por eyaculación y procesadas dentro de la primera hora de emisión. Cada una de ellas fue evaluada para obtener los datos de volumen, concentración espermática y motilidad, se utilizó la cámara de Makler para el análisis de motilidad y concentración antes y después de la preparación mediante capacitación espermática. Los espermatozoides motiles fueron aislados por centrifugación a través de gradientes de densidad (95%/45%) (Isolate®, Irvine Scientific, US),

para luego ser lavados en medio de cultivo (Global Total for Fertilization®, LifeGlobal, US) y resuspendidos en volúmenes mínimos de 0.1 – 0.3 mL del medio utilizado.

#### Inseminación e inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Para FIV convencional, los CCO fueron inseminados con las muestras capacitadas aproximadamente cuatro horas posteriores a la aspiración. El número de espermatozoides que se usan aproximadamente varía entre 50 000 y 100 000/mL.

Para ICSI, los ovocitos se dejaron madurar en la incubadora por cuatro horas aproximadamente para luego proceder con la denudación, eliminación de las células del cúmulo y corona mediante un método enzimático con hialuronidasa (LifeGlobal, US). Los ovocitos fueron expuestos a la hialuronidasa en un tiempo no mayor a 10 segundos, siendo liberados de las células del cumulo mediante trabajo mecánico aspirando repetidas veces con pipetas de diámetro entre 135 – 140 µm, obteniendo ovocitos rodeados únicamente por la zona pelúcida. La madurez nuclear del ovocito se caracteriza por la liberación del cuerpo polar al espacio perivitelino en el estadio de metafase II, siendo estos los seleccionados para proceder con la inyección en un micromanipulador (22).

#### Evaluación de la fecundación

La fecundación se evaluó entre 16 a 20 horas después de la inseminación por FIV o ICSI, la presencia de dos pronúcleos (2PN) en el citoplasma del ovocito reflejó una fecundación normal, mientras que la falla de fecundación se reportó tras observar uno, tres o más pronúcleos, y/u ovocitos citolizados.

Los ovocitos fecundados (2PN) fueron transferidos a gotas individuales de medio de cultivo de crecimiento (Global Total®, LifeGlobal, US) y dejados en la incubadora a 37°C a 7% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub> hasta el día 5 o 6 del desarrollo.

#### Evaluación del desarrollo embrionario

Hasta el 2013, los embriones fueron vistos al tercer día del desarrollo para evaluación morfológica. El criterio de evaluación en etapa de clivaje más usado es el descrito por L. Veeck. en 1999 (85) tomando en cuenta el número de

blastómeras y su simetría, y el grado de fragmentos citoplasmáticos anucleados (Tabla 5.2.1 y Figura 5.2.2), siendo los embriones de excelente calidad en día 3 los que presenten  $\geq 6$  blastómeras, sin multinucleación y con  $<10\%$  de fragmentación, mientras que los de mala calidad embriones que presenten  $< 6$  blastómeras grado 4 o 5 y/o multinucleación.

Grado	Descripción
<b>1</b>	Blastómeras simétricas
<b>2</b>	Blastómeras simétricas, $<10\%$ de fragmentación
<b>2b</b>	10-30% de fragmentación
<b>3</b>	Blastómeras asimétricas
<b>4</b>	30-50% de fragmentación
<b>5</b>	$\geq 50\%$ de fragmentación

Tabla 5.2.1. Clasificación de embriones en etapa de clivaje.

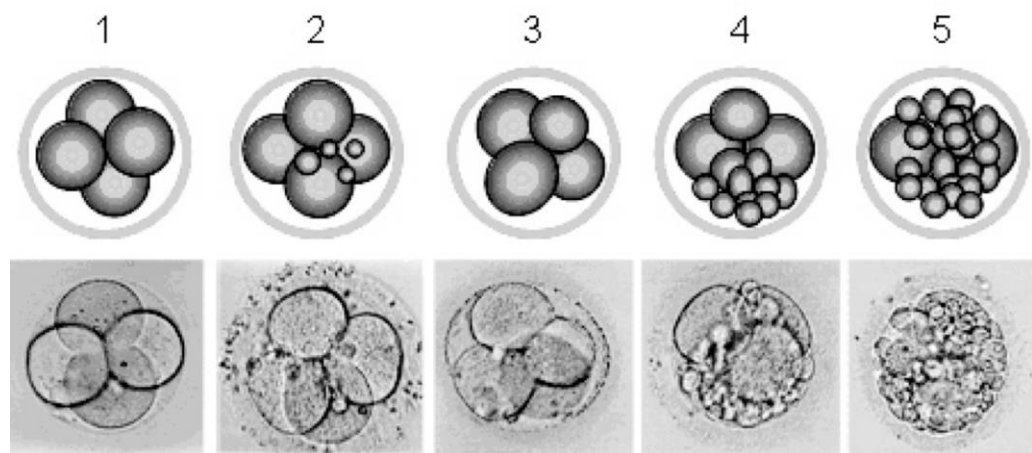


Figura 5.2.2 Evaluación morfológica en etapa de clivaje. Adaptado del Manual de Procedimientos del Laboratorio de Reproducción Asistida de la RedLara 2006.

1) Grado I; 2) Grado II; 3) Grado III; 4) Grado IV; 5) Grado V

En el caso sea haya solicitado PGD-A mediante FISH, se procedió con el retiro de una blastómera del embrión en clivaje y analizado en el laboratorio de genética según su protocolo interno, los resultados se obtuvieron 2 días después de realizada la biopsia. Luego de la biopsia, se mantuvo el cultivo embrionario hasta la blastulación.

Asimismo, Los blastocistos son clasificados desde el punto de vista morfológico de acuerdo al criterio de Gardner y col (86) según el grado de expansión de la cavidad blastocélica, el cual tiene una valoración numérica (Tabla 5.2.3)

<b>Valoración numérica</b>	<b>Grado de expansión</b>
<b>1</b>	Inicial
<b>2</b>	Medio
<b>3</b>	Completo
<b>4</b>	Expandido
<b>5</b>	Eclosionando
<b>6</b>	Eclosionado

Tabla 5.2.3 Evaluación morfológica según el grado de expansión de los blastocistos.

La masa celular interna y el trofoectodermo tienen una valoración según la clasificación de SART (Tabla 5.2.4)

<b>Valoración</b>	<b>Interpretación</b>
<b>A</b>	Bueno

<b>B</b>	Regular
<b>C</b>	Malo

Tabla 5.2.4. Evaluación morfológica de los blastocistos según la clasificación de SART.

Los embriones de buena calidad morfológica fueron blastocistos expandidos, en vías de eclosión y eclosionados, de masa celular interna A y trofoectodermo A o B.

Únicamente para los pacientes que solicitaban PGD-A por aCGH o NGS, los embriones fueron evaluados en el día 4 del desarrollo para la eclosión asistida por medio del láser (Lykos; Hamilton Thorne, Beverly, ME, US) bajo multipulsación (pulso/segundo=9; duración del pulso=150  $\mu$ s). Asimismo, la biopsia de trofoectodermo se realizó al observar blastocistos en vías de eclosión en el día 5 o 6 del desarrollo embrionario por medio del láser (potencia 100%; pulso = 350 – 400  $\mu$ s) con el fin de extraer alrededor de 5 células para su posterior análisis en el laboratorio de genética, siguiendo el protocolo para el análisis por aCGH (BlueGnome Cyto-Chip; Illumina, US) (87) o NGS (Veriseq PGD-A; Illumina, US), según corresponda. Los blastocistos fueron vitrificados luego de una hora tras realizada la biopsia hasta la obtención de los resultados, usando el kit de vitrificación Cryotech (Cryotech, Japón) siguiendo los protocolos de fabricación.

Por otro lado, las pacientes programadas para la transferencia embrionaria recibieron de manera oral suplementos de estradiol (E2, Novo-Nordisk, Dinamarca) empezando el tratamiento el día de la aspiración folicular. El soporte del cuerpo lúteo fue proporcionado por el suplemento de progesterona intravaginal (Progesterona, Rottapharm, Italia) 600mg/día al día siguiente de iniciado el tratamiento con estradiol. La transferencia embrionaria se realizó en el día 5 del desarrollo embrionario mediante un catéter de transferencia bajo ecografía abdominal. Asimismo, por protocolo interno del laboratorio, solo se permite la transferencia de 1 o 2 embriones como máximo.

Los embriones restantes fueron vitrificados usando el kit de vitrificación Cryotech (Cryotech, Japón) siguiendo los protocolos del fabricante y transferidos en un ciclo posterior.

Se excluyeron del estudio los ciclos con transferencias embrionarias o los cuales incluían embriones criopreservados antes del quinto día del desarrollo.

### 5.3.DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio retrospectivo de cohortes en el cual se analizaron 2169 procedimientos de reproducción asistida con ovodonación realizados desde enero del 2011 hasta agosto del 2016 en los laboratorios PRANOR, Grupo de Reproducción Asistida. Además, el programa de ovodonación anónima incluyó mujeres jóvenes cuyas edades oscilaba entre 18 y 31 años.

La edad de los varones incluidos en el estudio estuvo en un rango de 20 a 75 años. Estos fueron divididos en tres grupos según su edad:

- Grupo 1: varones menores de 39 años
- Grupo 2: varones entre de 40 a 49 años
- Grupo 3: varones mayor e igual a 50 años.

Además, Luna y col (2009) distribuyeron su población (n= 672) entre los mismos grupos etarios (5).

En la Figura 5.3.1 se muestra el diagrama de flujo de la distribución de ciclos según el análisis realizado.

Para el análisis de la calidad seminal se evaluaron 1069 ciclos, considerando la muestra de semen realizada para cada paciente en el laboratorio el día del procedimiento para FIV/ICSI, tomando en cuenta los parámetros de volumen seminal, concentración espermática y motilidad progresiva; divididos entre los grupos etarios.

La influencia de la edad paterna sobre el desarrollo embrionario abarcó 1326 ciclos de los cuales fueron evaluados comparando la tasa de fecundación de los ovocitos, la tasa de embriones en etapa de clivaje de excelente calidad, la tasa de blastocistos de buena calidad morfológica y la tasa de utilización de embriones, calculado mediante la suma de los embriones criopreservados o transferidos al quinto día de desarrollo entre el total de cigotos y entre los diferentes grupos etarios. Luego, se analizó un total de 851 ciclos con transferencias embrionarias en día 5 dividido entre la edad de la receptora y los grupos de edad paterna, evaluando la tasa de embarazo bioquímico, clínico y abortos espontáneos.

Por último, en el análisis de PGD-A se incluyeron 656 ciclos, los cuales fueron divididos según el método utilizado (FISH, aCGH o NGS); se calculó el tasa de embriones euploides mediante el número de embriones cromosomicamente normales por PGD-A entre el total de embriones, dividido entre los diferentes grupo de edad del varón.

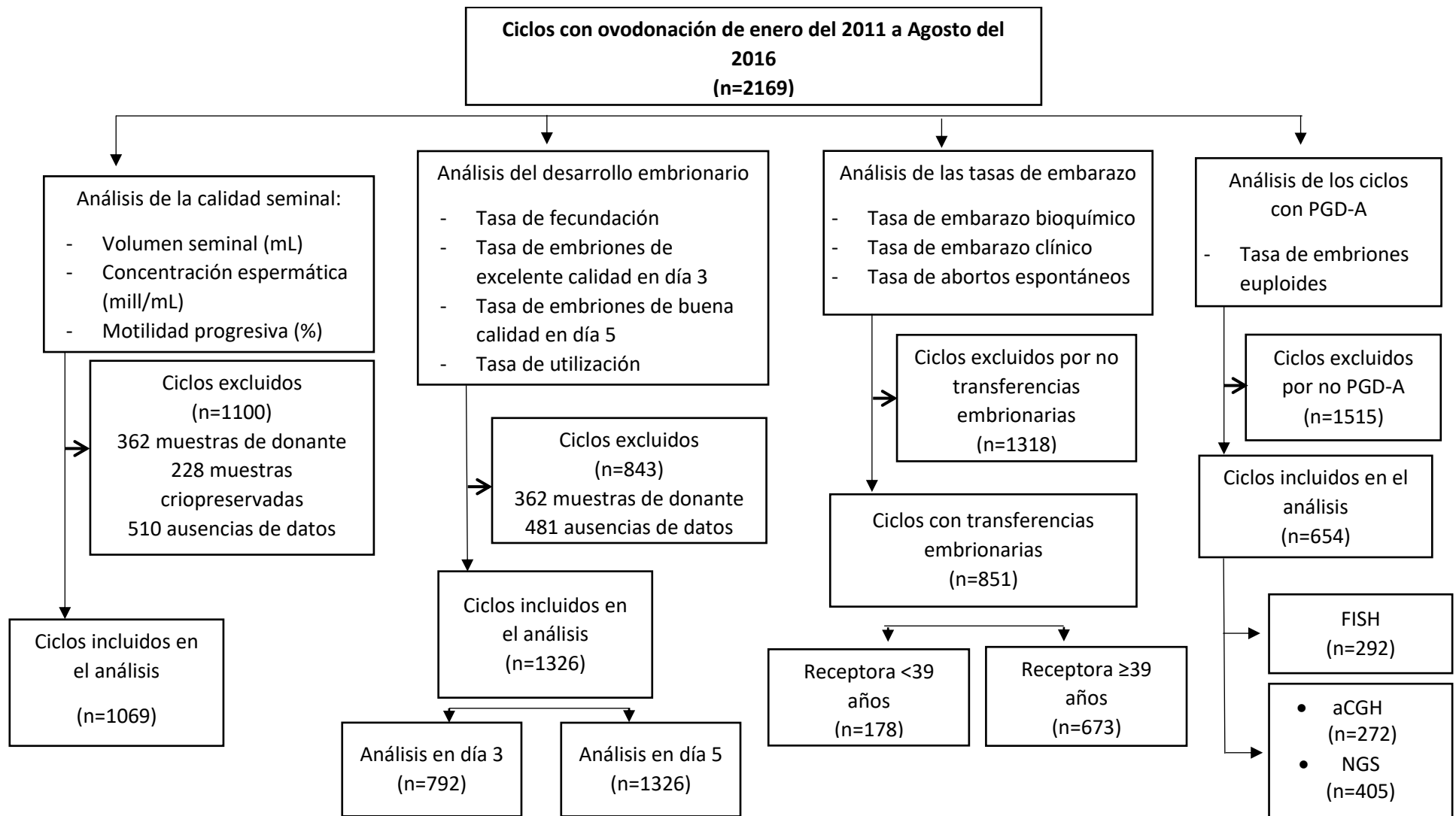


Figura 5.3.1. Diagrama de flujo de la distribución de los ciclos entre los diferentes análisis realizados.

## 5.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio fue presentado al Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para la evaluación correspondiente. Una vez contada con la aprobación del CIE, se procedió con la ejecución del mismo.

El estudio evaluó una base de datos que incluye 2169 casos de parejas que hayan realizado tratamientos de reproducción asistida mediante el programa de ovodonación anónima a partir de enero del 2011 a agosto del 2016 en los laboratorios PRANOR, Grupo de Reproducción Asistida. Se mantendrá en anonimato la identidad de los pacientes incluidos en el estudio, por lo cual evitará alguna repercusión en los pacientes.

El presente estudio permitirá brindar mayor información sobre la influencia de la edad paterna en los ciclos de reproducción asistida, así como la importancia de realizar estudios genéticos por el factor edad, posibilitando optimizar los resultados con dicho conocimiento.

Los resultados del presente estudio serán accesibles únicamente dentro de los alcances éticos que suponen la sustentación y publicación de la presente tesis de licenciatura para la obtención del título profesional.

## 5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó la base de datos computarizada de los laboratorios PRANOR, Grupo de Reproducción Asistida, exportando los datos al programa Excel que posteriormente fueron evaluados por el programa SPSS 20. Los datos fueron presentados como media  $\pm$  ES. La homogeneidad de varianzas se determinó mediante la prueba de Bartlett. Al ser varianzas homogéneas, fueron evaluadas por un análisis de varianzas. Por otro lado, si no mostraron homogeneidad, la prueba Kruskal - Wallis fue empleada para determinar la diferencia entre grupos; además, se utilizó la prueba de Mann- Whitney- U para

la diferencia de medianas. Para todo análisis estadístico, fue considerado significativo si el valor de  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1.COMPARACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

Se seleccionaron 1069 ciclos con ovodonación que contaban con el registro de concentración espermática, motilidad progresiva y volumen seminal en un periodo de 5 años.

La descripción de la población estudiada y la evaluación de los parámetros espermáticos se observa en la Tabla 6.1.1. Se evaluaron 378 ciclos en el grupo de varones menores de 40 años, 553 ciclos en el grupo entre 40 a 49 años y 138 ciclos en el grupo  $\geq 50$  años. El volumen de semen nativo fue de  $2.54 \pm 1.27$  mL en el grupo de varones menor de 40 años,  $2.44 \pm 1.31$  mL en el grupo de 40-49 años y de  $1.93 \pm 1.19$  mL en el grupo  $\geq 50$  años. En este último grupo se observó menor volumen seminal respecto a los otros grupos de estudio ( $p < 0.05$ ). En el caso de la variable de concentración espermática, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos. Sin embargo, en el grupo de varones  $\geq 50$  años la motilidad progresiva, dada por la suma de la motilidad de grado II y III, fue menor en comparación con los demás grupos etarios ( $33.96\% \pm 16.24$  vs  $40.10\% \pm 17.81$  y  $38.93\% \pm 17.10$ , respectivamente). Al evaluar por separado el porcentaje de motilidad progresiva se obtuvo que en el grupo de  $\geq 50$  años los porcentajes de motilidad de grado III fueron los más bajos ( $21.73\% \pm 9.91$ ), además la motilidad de grado II fue menor en comparación con el grupo  $< 40$  años ( $23.11\% \pm 8.57$  vs  $26.05\% \pm 7.78$ , respectivamente).

Asimismo, se obtuvo que en el grupo  $< 40$  años, el 31% de ciclos registró bajo volumen seminal (LRI: 1.5 mL), el 8% baja concentración espermática (LRI: 15 mill) y el 38% baja motilidad progresiva (LRI: 32%). Luego, en el grupo de 40-49 años se encontró que el 33% de ciclos registró bajo volumen seminal, el 8% baja concentración espermática y el 41% baja motilidad progresiva. Por ultimo en

el grupo de  $\geq 50$  años se encontró que el 56% de ciclos registró bajo volumen seminal, 4% baja concentración espermática y 54% baja motilidad progresiva (datos no mostrados).

	<b>Edad paterna (años)</b>		
	<40	40-49	$\geq 50$
<b>N° de ciclos</b>	378	553	138
<b>Edad del varón al tratamiento</b>	35.16 $\pm$ 3.30 a,b,c	43.64 $\pm$ 2.69 a,b,c	53.56 $\pm$ 3.79 a,b,c
<b>Volumen del semen (mL)</b>	2.54 $\pm$ 1.27c	2.44 $\pm$ 1.31b	1.93 $\pm$ 1.19b,c
<b>Concentración espermática (millones/ml)</b>	82.30 $\pm$ 55.84	89.52 $\pm$ 60.28	87.13 $\pm$ 56.04
<b>Motilidad progresiva (II+III) (%)</b>	40.10 $\pm$ 17.81c	38.93 $\pm$ 17.10b	33.96 $\pm$ 16.24b,c
<b>Motilidad grado II (%)</b>	26.05 $\pm$ 7.78a,c	24.08 $\pm$ 8.49a	23.11 $\pm$ 8.57c
<b>Motilidad grado III (%)</b>	24.55 $\pm$ 10.48c	24.33 $\pm$ 10.59b	21.73 $\pm$ 9.91b,c

Tabla 6.1.1 Numero de ciclos, edad promedio del varón y evaluación de los parámetros espermáticos (volumen, concentración y motilidad progresiva) el día del procedimiento entre los diferentes grupos etarios. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y  $\geq 50$ .
- c diferencias significativas entre grupo <40 y  $\geq 50$ .
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

Por último, la figura 6.1.2 presenta los gráficos de barras de las variables de volumen seminal (mL), concentración espermática (mill/ml) y motilidad progresiva (%) entre los tres grupos de estudio. Como ya antes mencionado, se obtuvieron diferencias entre grupos en el volumen seminal y en la motilidad progresiva, mas no en la concentración espermática.

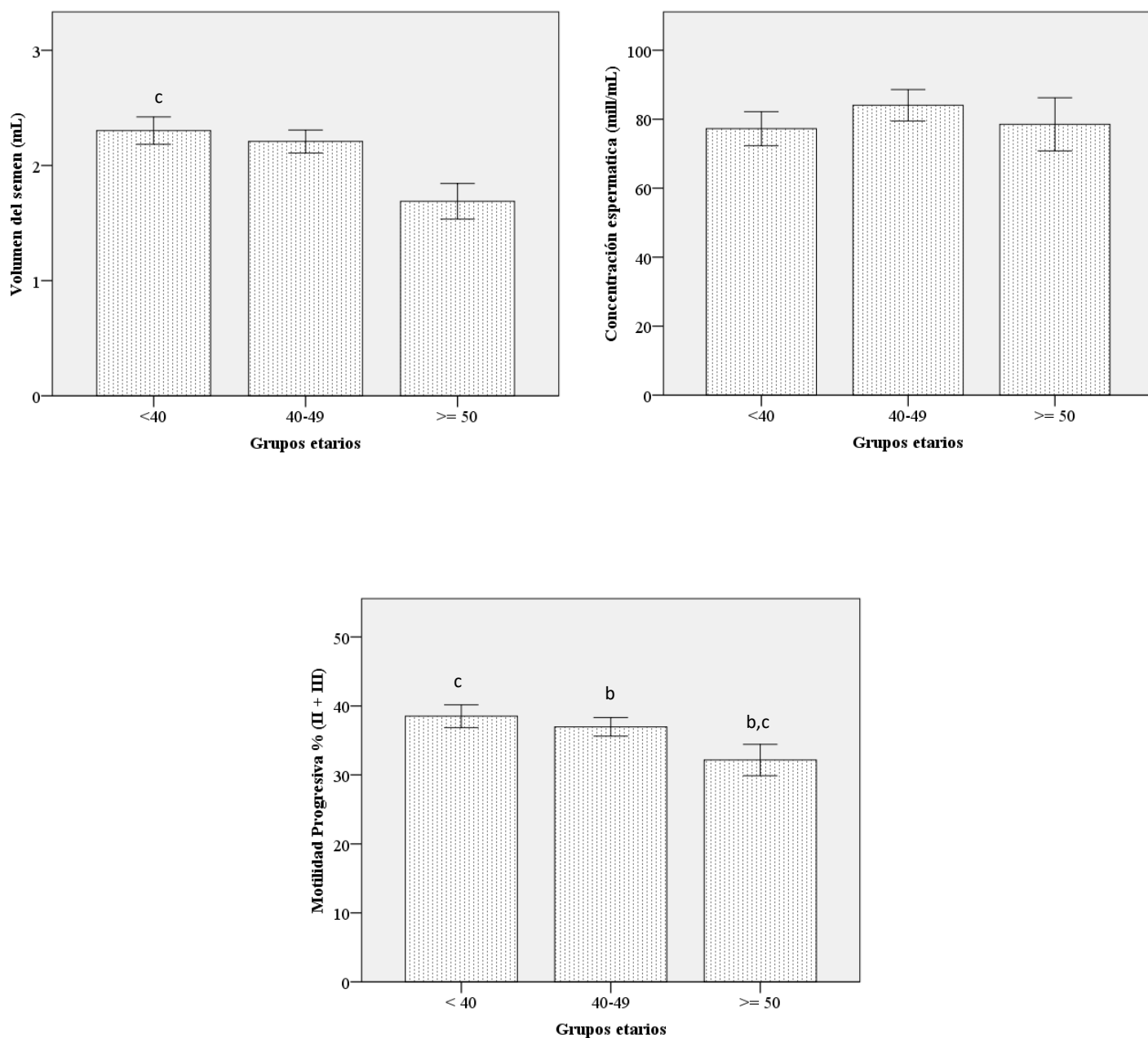


Figura 6.1.2. Gráficos de barras para la evaluación de los parámetros espermáticos (volumen, concentración y motilidad progresiva) el día del procedimiento entre los diferentes grupos etarios. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y  $\geq 50$ .
- c diferencias significativas entre grupo <40 y  $\geq 50$ .
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

## 6.2. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

Un total de 1326 ciclos fueron analizados y distribuidos de la siguiente manera: grupo de varones <40 años (n=460), grupo entre 40 y 49 años (n=673), y grupo  $\geq 50$  años (n=193). El promedio de ovocitos obtenidos fue similar entre grupos,  $11.80 \pm 20.60$  en el grupo de varones <40 años,  $11.03 \pm 4.82$  en el grupo de 40 – 49 años y  $11.16 \pm 4.36$  en el grupo de  $\geq 50$  años (Tabla 6.2.1). Además, se distribuyeron los ciclos según la técnica de inseminación, observando que el grupo  $\geq 50$  años tuvo menor número de ciclos por FIV en comparación con el grupo de 40 – 49 años.

	<b>Edad paterna (años)</b>		
	<40	40-49	$\geq 50$
<b>N° de ciclos</b>	460	673	193
<b>Edad de la paciente al tratamiento</b>	$39.52 \pm 4.70$ a,b,c	$42.34 \pm 3.47$ a,b,c	$44.44 \pm 4.59$ a,b,c
<b>Edad del varón al tratamiento</b>	$35.11 \pm 3.32$ a,b,c	$43.66 \pm 2.69$ a,b,c	$53.77 \pm 3.94$ a,b,c
<b>Promedio de ovocitos obtenidos</b>	$11.80 \pm 20.60$	$11.03 \pm 4.82$	$11.16 \pm 4.36$
<b>Técnica de inseminación</b>			
<b>FIV</b>	46% (213/460)	47% (315/673)b	38% (74/193)b
<b>ICSI</b>	54% (247/460)	53% (358/673)b	62% (119/193)b

Tabla 6.2.1. Número de ciclos, edad promedio de la paciente y pareja al tratamiento, promedio del número de ovocitos obtenidos y porcentaje de ciclos según la técnica de inseminación. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y  $\geq 50$ .
- c diferencias significativas entre grupo <40 y  $\geq 50$ .
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

### 6.2.1. EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN

Como se explicó anteriormente, el desarrollo embrionario abarca desde la evaluación de la fecundación, clivaje (evaluación en día 3) y blastulación (desarrollo en día 5) por lo que fue dividido en subtemas para mejor análisis.

La Tabla 6.2.2 detalla el total de ovocitos obtenidos, el promedio de ovocitos fecundados, la tasa de fecundación normal y la tasa de ciclos con falla de fecundación. Los cuales fueron distribuidos según su técnica de inseminación (FIV o ICSI) entre los tres grupos etarios. El número de ovocitos obtenidos fue distribuido de la siguiente manera: 4974 ovocitos en el grupo de varones <40 años, 7344 en el grupo de 40-49 años y 2157 en el grupo de  $\geq 50$  años.

En el caso de los ciclos con FIV, el número de ovocitos inseminados fue de 2286; 3371 y 778, respectivamente. Asimismo, el promedio de ovocitos fecundados fue similar entre los tres grupos ( $p > 0.05$ ). La tasa de ovocitos fecundados también mostró un patrón similar. Por último, la tasa de ciclos con falla de fecundación tampoco tuvo diferencias significativas.

En el caso de los ciclos con ICSI, el número de ovocitos inyectados fue de 2364; 3526 y 1224, respectivamente. Además, en el grupo de varones  $\geq 50$  años se obtuvo el mayor número de ovocitos fecundados ( $7.86 \pm 3.18$  vs  $7.02 \pm 2.77$  y  $7.16 \pm 2.92$ ). De la misma manera, la tasa de fecundación fue mayor en el tercer grupo, así como también se observó la menor tasa de fallas de fecundación.

	<b>Edad paterna (años)</b>		
	<40	40-49	≥50
<b>N de ovocitos obtenidos</b>	4974	7344	2157
<b>FIV</b>			
<b>N de ovocitos inseminados</b>	2286	3371	778
<b>Promedio de ovocitos fecundados</b>	7.46 ± 3.28	7.51 ± 3.21	6.99 ± 3.10
<b>N de ovocitos fecundados (%)</b>	1567 (69%)	2353 (70%)	523 (67%)
<b>N de ovocitos con falla de fecundación (%)</b>	719 (31%)	1018 (30%)	255 (33%)
<b>ICSI</b>			
<b>N de ovocitos inyectados</b>	2364	3526	1224
<b>Promedio de ovocitos fecundados</b>	7.02 ± 2.77 c	7.16 ± 2.92 b	7.86 ± 3.18 b,c
<b>N de ovocitos fecundados (%)</b>	1724 (73%)c	2550 (72%)b	930 (76%)b,c
<b>N de ovocitos con falla de fecundación (%)</b>	640 (27%)c	976 (28%)b	294 (24%)b,c

Tabla 6.2.2. Evaluación de la fecundación entre los diferentes grupos etarios. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar, según corresponda. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y ≥50.
- c diferencias significativas entre grupo <40 y ≥50.
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

## 6.2.2. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN DÍA 3

En el análisis se incluyeron 5758 embriones en estadio de clivaje, los cuales fueron distribuidos según su técnica de inseminación (FIV o ICSI) y subclasificado entre los tres grupos de estudio (Tabla 6.2.3).

En el caso de los ciclos con FIV, 1160 embriones fueron analizados en el grupo de varones <40 años, 1807 en el grupo de 40 – 49 años y 299 en el grupo ≥50 años. Asimismo, el promedio y el porcentaje de embriones de excelente calidad se mantuvieron constantes entre grupos. No se obtuvo diferencias en el promedio de embriones de mala calidad. Sin embargo, en el grupo de varones

entre 40 – 49 años se observó más embriones de mala calidad en comparación con el grupo  $\geq 50$  años.

En el caso de los ciclos con ICSI, 784 embriones fueron analizados en el grupo de varones <40 años, 1274 en el grupo de 40 – 49 años y 434 en el grupo  $\geq 50$  años. El promedio y la tasa de embriones de excelente calidad fueron similares entre los grupos. Así como también, el promedio y la tasa de embriones de mala calidad morfológica.

	<b>Edad paterna (años)</b>		
	<40	40-49	$\geq 50$
<b>FIV</b>			
<b>N de embriones evaluados</b>	1160	1807	299
<b>Promedio de emb de excelente calidad</b>	1.69 $\pm$ 1.81	1.59 $\pm$ 1.67	1.60 $\pm$ 1.37
<b>N de embriones de excelente calidad (%)</b>	243 (21%)	379 (21%)	69 (23%)
<b>Promedio de emb de mala calidad</b>	2.58 $\pm$ 2.15	2.64 $\pm$ 2.55	1.88 $\pm$ 1.29
<b>N de embriones de mala calidad (%)</b>	372 (32%)	628 (35%) <sup>b</sup>	81 (27%) <sup>b</sup>
<b>ICSI</b>			
<b>N de embriones evaluados</b>	784	1274	434
<b>Promedio de emb de excelente calidad</b>	1.45 $\pm$ 1.40	1.44 $\pm$ 1.44	1.56 $\pm$ 1.60
<b>N de embriones de excelente calidad (%)</b>	171 (22%)	280 (22%)	86 (20%)
<b>Promedio de emb de mala calidad</b>	2.38 $\pm$ 2.64	2.29 $\pm$ 2.09	2.78 $\pm$ 2.39
<b>N de embriones de mala calidad (%)</b>	281 (36%)	445 (35%)	153 (35%)

Tabla 6.2.3. Evaluación del desarrollo embrionario en día 3. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar, según corresponda. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y  $\geq 50$ .
- c diferencias significativas entre grupo <40 y  $\geq 50$ .
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

### 6.2.3. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN DÍA 5

La evaluación del desarrollo embrionario en día 5 incluyó 9915 embriones. A continuación la Tabla 6.2.4 muestra, según la técnica de inseminación (FIV o ICSI), el número de embriones evaluados, la tasa y el promedio de embriones de buena y mala calidad, el promedio de embriones transferidos y criopreservados y la tasa de utilización entre los tres grupos de estudio.

En el caso de los ciclos con FIV, 1599 embriones fueron analizados en el grupo de varones <40 años, 2226 en el grupo de 40 – 49 años y 511 en el grupo  $\geq 50$  años. El promedio de embriones de buena calidad no tuvo diferencias significativas entre grupos, empero se observaron diferencias entre los grupos 40 – 49 años y  $\geq 50$  años, evidenciando una mayor tasa de embriones de buena calidad en este último grupo (31% vs 26%). No se obtuvieron diferencias en cuanto a la tasa de embriones de mala calidad ( $p > 0.05$ ).

En el caso de los ciclos con ICSI, 1630 embriones fueron analizados en el grupo de varones <40 años, 2424 en el grupo de 40 – 49 años y 872 en el grupo  $\geq 50$  años. No se observaron diferencias en el promedio y la tasa de embriones de buena calidad, tampoco en el promedio y la tasa de embriones de mala calidad ( $p > 0.05$ ).

De la misma manera, no se observaron diferencias en el promedio de embriones transferidos y criopreservados entre los grupos etarios. Sin embargo, la tasa de utilización que es la suma de todos los embriones que fueron transferidos y criopreservados entre el total de embriones, mostró diferencias a favor del grupo <40 con respecto al grupo 40 – 49 años (49% y 46%, respectivamente).

	<b>Edad paterna (años)</b>		
	<40	40-49	≥50
<b>FIV</b>			
<b>N de embriones evaluados</b>	1599	2226	511
<b>Promedio de emb de buena calidad</b>	2.11 ± 1.80	1.85 ± 1.67	2.21 ± 1.69
<b>N de embriones de buena calidad (%)</b>	448 (28%)	583 (26%) <sup>b</sup>	159 (31%) <sup>b</sup>
<b>Promedio de emb de mala calidad</b>	0.49 ± 0.93	0.47 ± 0.76	0.43 ± 0.85
<b>N de embriones de mala calidad (%)</b>	104 (7%)	148 (7%)	31 (6%)
<b>ICSI</b>			
<b>N de embriones evaluados</b>	1630	2424	872
<b>Promedio de emb de buena calidad</b>	1.44 ± 1.38	1.33 ± 1.49	1.50 ± 1.59
<b>N de embriones de buena calidad (%)</b>	354 (22%)	472 (19%)	179 (21%)
<b>Promedio de emb de mala calidad</b>	0.50 ± 0.86	0.52 ± 0.84	0.56 ± 0.74
<b>N de embriones de mala calidad (%)</b>	122 (7%)	185 (8%)	67 (8%)
<b>Promedio de embriones transferidos</b>	1.36 ± 0.90	1.30 ± 0.90	1.29 ± 0.88
<b>Promedio de embriones criopreservados</b>	2.30 ± 2.16	2.14 ± 2.22	2.38 ± 2.29
<b>Tasa de utilización</b>	49% (1680/3438) <sup>a</sup>	46% (2314/5005) <sup>a</sup>	48% (709/1472)

Tabla 6.2.4. Evaluación del desarrollo embrionario en día 5. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar, según corresponda. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.

b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y ≥50.

c diferencias significativas entre grupo <40 y ≥50.

a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

Finalmente, la figura 6.2.5 presenta los gráficos de barras de las variables de tasa de fecundación (%), tasa de embriones de excelente calidad en día 3 (%), tasa de embriones de buena calidad en día 5 (%) y tasa de utilización (%) entre los tres grupos de estudio. Anteriormente se observaron las diferencias de dichas variables según su técnica de inseminación, mas al evaluar los ciclos sin

diferenciarlo por la técnica de inseminación, observamos un patrón distinto, datos no mostrados.

En primer lugar, se obtuvo que la tasa de fecundación fue similar entre grupos (72%, 72% y 73%, respectivamente). Luego, la tasa de embriones de excelente calidad en día 3 fue de 21% para todos los grupos etarios. Sin embargo, se observó un mayor número de embriones de buena calidad en día 5 en el grupo de varones de <40 años en comparación con el grupo de 40 – 49 años (23% vs 21%). De igual manera, en el grupo <40 años la tasa de utilización fue mayor en comparación con el grupo 40 – 49 años (49% vs 46%).

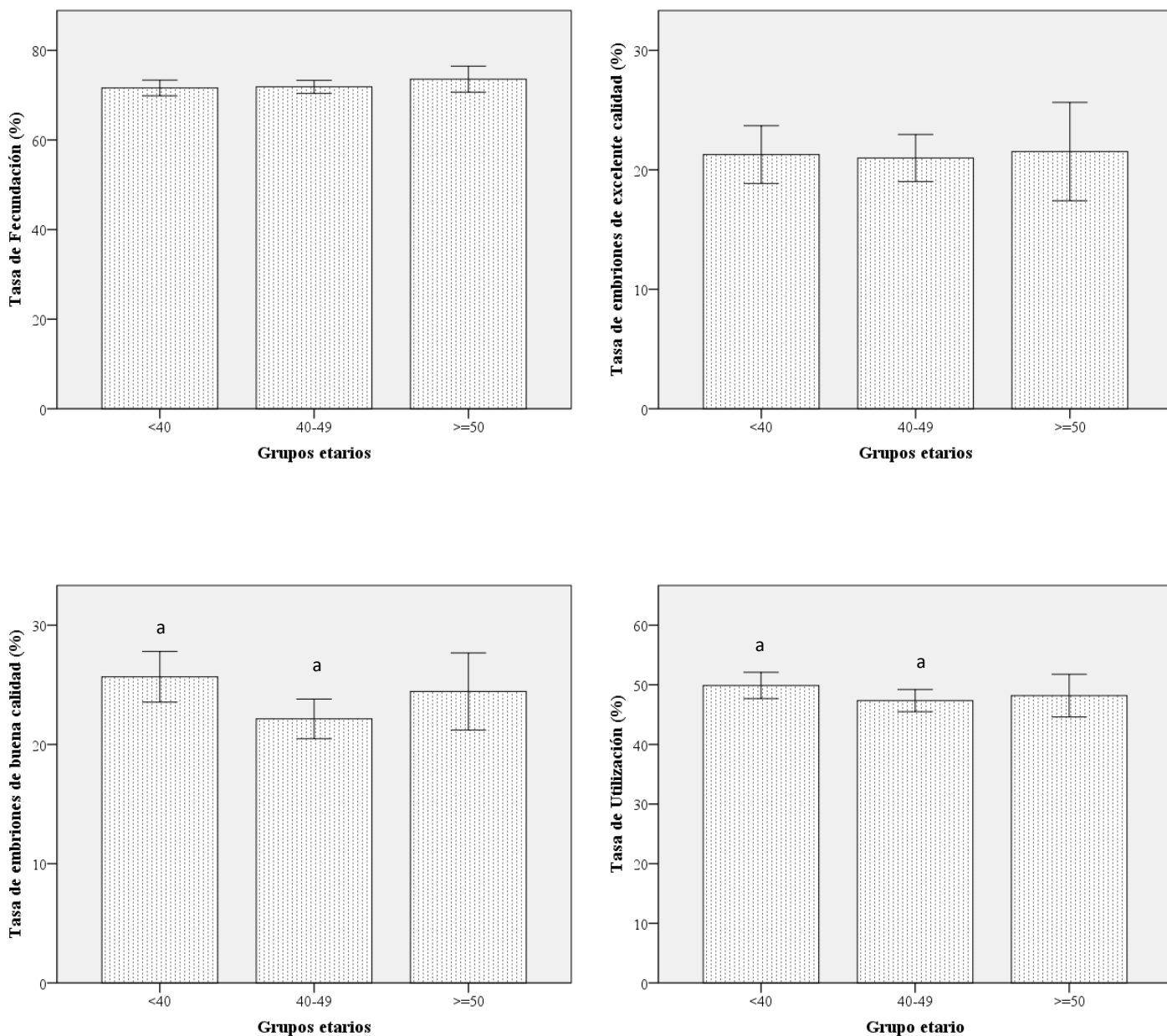


Figura 6.2.5. Evaluación del desarrollo embrionario (Tasa de fecundación, tasa de embriones de excelente calidad en día 3 del desarrollo, tasa de embriones de buena calidad en día 5 del desarrollo y tasa de utilización) entre los diferentes grupos etarios. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y  $\geq 50$ .
- c diferencias significativas entre grupo <40 y  $\geq 50$ .
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

### 6.3.CORRELACIÓN DE LAS TASAS DE EMBARAZO ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

El análisis de las tasa de embarazo bioquímico y clínico incluyó 851 transferencias, las cuales fueron divididas entre los grupos de edad paterna y edad de la receptora. El punto de corte de la edad de la receptora fue de 39 años, en este primer grupo se incluyeron 178 transferencias divididos entre los tres grupos de edad paterna, mientras que el segundo grupo ( $\geq 39$  años) incluyó 673 transferencias, también divididos entre los tres grupos de edad paterna (Tabla 6.3.1)

Al evaluar las tasas de embarazo en el grupo de la edad de la receptora  $< 39$  años, se observó que las tasa de embarazo bioquímico y clínico fue similar entre los tres grupos de edad paterna ( $p > 0.05$ ), mismo patrón se obtuvo al evaluar la tasa de abortos espontáneos.

En el caso del segundo grupo de edad de la receptora ( $\geq 39$  años), no se obtuvieron diferencias significativas en las tasas de embarazo bioquímico, clínico ni abortos espontáneos entre los grupos de edad paterna.

Asimismo, se compararon las tasas de embarazo bioquímico, clínico y abortos espontáneos entre los dos grupos de edad de la receptora ( $< 39$  años). Sin embargo, estos no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

		Edad paterna (años)		
		<40	40-49	≥50
<39	Tasa de embarazo bioquímico	65% (79/121)	74% (37/50)	43% (3/7)
	Tasa de embarazo clínico	62% (75/121)	70% (35/50)	43% (3/7)
	Tasa de abortos espontáneos	5% (4/79)	5% (2/37)	0% (0/3)
≥39	Tasa de embarazo bioquímico	65% (115/176)	63% (244/386)	66% (73/111)
	Tasa de embarazo clínico	59% (103/176)	57% (220/386)	55% (61/111)
	Tasa de abortos espontáneos	10% (12/115)	10% (24/244)	16% (11/73)

Tabla 6.3.1. Evaluación de la tasa de embarazo bioquímico, clínico y tasa de abortos espontáneos entre los diferentes grupos etarios. Además, dividido entre la edad de la receptora (<39 y ≥39 años).

No se encontraron diferencias significativas inter ni intra grupos ( $P>0.05$ ).

Por último, se realizó un sub-análisis entre los grupos etarios del varón para determinar si la edad promedio de la receptora y el varón que registraron embarazo clínico son diferentes de los que no registraron embarazo clínico (datos no mostrados).

En el grupo de varones <40 años, la edad promedio de la receptora y varón que registraron embarazo clínico no fue significativamente diferente respecto de los que no registraron embarazo clínico ( $p>0.05$ ). El promedio de edad de la receptora que registró embarazo fue de  $39.25 \pm 4.88$  y no embarazo de  $39.82 \pm 4.74$ , de igual manera el promedio de edad del varón fue de  $35.23 \pm 3.55$  vs.  $35.11 \pm 3.29$ .

Sin embargo, en el grupo de varones de 40 – 49 años, se observó un patrón distinto. Se encontraron diferencias significativas respecto al promedio de edades del varón que registraron embarazo clínico, el promedio de edad del varón fue de  $43.43 \pm 2.66$  vs.  $44.08 \pm 2.79$ , observando que los varones que no registraron

embarazo clínico fueron significativamente mayores en comparación con lo que registraron embarazo. Por otro lado, el promedio de edad de la receptora que registró embarazo de  $42.19 \pm 3.68$  y no embarazo de  $42.70 \pm 3.25$ , no mostrando diferencias.

Finalmente, en el grupo de varones  $\geq 50$  años no se obtuvieron diferencias significativas respecto al promedio de edades que registraron embarazo. El promedio de edad de la receptora que registró embarazo fue de  $45.06 \pm 4.64$  y no embarazo de  $44.41 \pm 4.82$ , de la misma manera el promedio de edad del varón fue de  $54.08 \pm 4.20$  vs.  $53.33 \pm 3.69$ .

#### 6.4.EVALUACIÓN DE LOS CICLOS CON DIAGNÓSTICO GENETICO PREIMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDIAS ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

Un total de 2169 ciclos con ovodonación fueron realizados desde enero del 2011 a agosto del 2016. Sin embargo solo 654 ciclos incluyeron algún análisis genético, estos fueron distribuidos según el día de realizada la biopsia (día 3 o 5).

##### 6.4.1. EVALUACIÓN DE LOS CICLOS CON PGD-A POR FISH ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

La Tabla 6.4.1 muestra las características de los ciclos de ovodonación con PGD-A que fueron biopsiados en día 3. 292 ciclos fueron analizados y distribuidos de la siguiente manera: 111 ciclos en el grupo de varones  $< 40$  años, 140 en el grupo de 40 – 49 años y 41 en el grupo de  $\geq 50$  años, además la edad del varón al momento del tratamiento fue diferente entre los grupos.

El promedio del número de ovocitos obtenidos entre los tres grupos etarios fue de  $12.00 \pm 3.52$ ,  $12.10 \pm 3.98$  y  $11.73 \pm 2.92$ , respectivamente; donde no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ), tampoco se observaron diferencias en la tasa de fecundación. Sin embargo, se observó una mayor tasa de formación de

blastocistos en el grupo de varones entre 40-49 años, 59% (666/1120). Por último, no se obtuvieron diferencias en cuanto a la calidad embrionaria en embriones de día 3 y 5.

<b>Biopsia en día 3 (FISH)</b>	<b>Edad paterna (años)</b>		
	<b>&lt;40</b>	<b>40-49</b>	<b>≥50</b>
<b>N° de ciclos</b>	111	140	41
<b>Edad del varón al tratamiento</b>	35.37 ± 3.11 a,b,c	43.97 ± 2.72 a,b,c	53.78 ± 3.98 a,b,c
<b>Número de ovocitos obtenidos</b>	12.00 ± 3.52	12.10 ± 3.98	11.73 ± 2.92
<b>Tasa de fecundación</b>	70% (876/1257)	72% (1120/1560)	70% (315/451)
<b>Tasa de formación de blastocistos</b>	55% (480/876) <sup>a</sup>	59% (666/1120) <sup>a,b</sup>	52% (165/315) <sup>b</sup>
<b>Embriones de excelente calidad (Día 3)</b>	1.95 ± 1.62	2.05 ± 1.57	1.76 ± 1.45
<b>Tasa de excelente calidad (Día 3)</b>	24% (213/876)	25% (285/1120)	23% (72/315)
<b>Tasa de buena calidad (Día 5)</b>	16% (144/876)	17% (195/1120)	14% (45/315)

Tabla 6.4.1. Características de los ciclos de ovodonación con PGD-A por FISH dividido entre los grupos etarios. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar. Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y ≥50.
- c diferencias significativas entre grupo <40 y ≥50.
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

#### 6.4.2. EVALUACIÓN DE LOS CICLOS CON PGD-A POR aCGH o NGS ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

Las características de los ciclos con ovodonación con biopsia en día 5 para el análisis por aCGH o NGS se muestran en la Tabla 6.4.2. En el análisis se incluyeron 362 ciclos que fueron distribuidos entre los tres grupos de estudio; 125 ciclos en el grupo de varones <40 años, 196 en el grupo de 40 – 49 años y 41 en el grupo de  $\geq 50$  años, además la edad del varón al tratamiento tuvo diferencias entre grupos.

De esta manera, el número de ovocitos obtenidos fue similar en los tres casos. Sin embargo, el grupo de varones <40 años obtuvo mayor tasa de fecundación en comparación con el grupo de 40 – 49 años. (74% vs 71%). Asimismo, la tasa de formación de blastocistos en el grupo  $\geq 50$  años fue el menor en comparación con los demás grupos etarios (45% vs 51% y 53%). Para finalizar, no se observaron diferencias en la tasa de embriones de buena calidad en el día 5 del desarrollo.

<b>Biopsia en día 5 (aCGH y NGS)</b>	<b>Edad paterna (años)</b>		
	<b>&lt;40</b>	<b>40-49</b>	<b>≥50</b>
<b>N° de ciclos</b>	125	196	41
<b>Edad del varón al tratamiento</b>	35.56 ± 3.21 a,b,c	43.72 ± 2.57 a,b,c	53.63 ± 4.53 a,b,c
<b>Número de ovocitos obtenidos</b>	13.59 ± 4.07	13.50 ± 3.52	14.78 ± 4.62
<b>Tasa de fecundación</b>	74% (1220/1646)a	71% (1793/2522)a	73% (406/555)
<b>Tasa de formación de blastocistos</b>	51% (625/1220)c	53% (955/1793)b	45% (183/406)b,c
<b>Tasa de buena calidad (Día 5)</b>	23% (277/1220)	23% (415/1793)	19% (76/406)

Tabla 6.4.2 Características de los ciclos de ovodonación con PGD-A por aCGH y NGS dividido entre los grupos etarios.  
Diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

- a diferencias significativas entre grupo <40 y 40 – 49.
- b diferencias significativas entre grupo 40 – 49 y ≥50.
- c diferencias significativas entre grupo <40 y ≥50.
- a,b,c diferencias significativas entre los tres grupos.

### 6.4.3. EVALUACIÓN DE LA TASA DE ANEUPLOIDIAS Y EDAD PATERNA

La evaluación de los ciclos de ovodonación con PGD-A según el tipo de análisis realizado por FISH, aCGH o NGS entre los grupos etarios se muestra en la Tabla 6.4.3 Tal como se mencionó anteriormente, 292 ciclos fueron analizados por FISH con un total de 2042 embriones biopsiados: 784 embriones en el grupo <40 años, 967 en el grupo de 40 – 49 años y 291 en el grupo ≥50 años. Se observó que la tasa de embriones euploides no tuvo diferencias significativas entre grupos.

De la misma manera, 272 ciclos fueron analizados por aCGH con 1205 embriones biopsiados, siendo distribuidos entre los grupos etarios. Se biopsiaron

452 en el grupo <40 años, 620 en el grupo de 40 – 49 años y 133 en el grupo  $\geq 50$  años. No se observaron diferencias en la tasa de embriones euploides entre grupos.

Por ultimo, 92 ciclos fueron analizados por NGS en el cual se biopsiaron 405 embriones. Los cuales fueron distribuidos de la siguiente manera: 136 en el grupo <40 años, 232 en el grupo 40 – 49 años y 37 en el grupo  $\geq 50$  años. Asimismo, la tasa de embriones euploides y mosaicos no mostraron diferencias entre grupos.

<b>Análisis</b>		<b>Edad paterna (años)</b>		
		<40	40-49	≥50
<b>FISH</b>	Numero de Ciclos	111	140	41
	N° de embriones biopsiados	784	967	291
	Tasa de embriones euploides	30% (235/784)	30% (291/967)	29% (84/291)
<b>aCGH</b>	Numero de Ciclos	94	147	31
	N° de embriones biopsiados	452	620	133
	Tasa de embriones euploides	60% (270/452)	63% (390/620)	55% (73/133)
<b>NGS</b>	Numero de Ciclos	32	50	10
	N° de embriones biopsiados	136	232	37
	Tasa de embriones euploides	48% (65/136)	43% (99/232)	41% (15/37)
	Tasa de embriones mosaicos	17% (23/136)	23% (53/232)	19% (7/37)

Tabla 6.4.3. Evaluación de los ciclos de ovodonación con PGD-A dividido entre los grupos etarios. Los valores están expresados como medias y su respectiva desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $P>0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1.COMPARACION DE LA CALIDAD SEMINAL ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

La calidad seminal es un importante indicador de la fertilidad masculina, diversos estudios han mostrado correlación entre ciertos parámetros espermáticos con respecto al incremento de la edad. Los cambios fisiológicos en el sistema reproductor masculino a causa del envejecimiento pueden disminuir su capacidad reproductiva.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el volumen seminal mostró ser menor en varones  $\geq 50$  años (el 56% de ciclos registró bajo volumen seminal). Sin embargo, el volumen fue similar en varones menores de 40 años y entre 40 y 49 años de edad ( $1.93 \pm 1.19$  mL frente a  $2.54 \pm 1.27$  mL y  $2.44 \pm 1.31$  mL, respectivamente). De la misma manera, la motilidad progresiva fue menor en el grupo de avanzada edad paterna (tanto en la motilidad de grado II y III). Por otro lado, no se encontró correlación entre la concentración espermática y la edad (Tabla 6.1.1).

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Duran y col (2010), que mediante la evaluación retrospectiva de 519 ciclos con ovodonación, compararon la calidad seminal y desarrollo embrionario entre tres grupos etarios (25 – 38 años, 39 – 49 años y  $\geq 50$  años). Concluyendo que la avanzada edad paterna se asocia significativamente con la disminución del volumen seminal y la motilidad espermática. Sin encontrar diferencias en la concentración espermática (88). Otros autores también muestran un decline en el volumen seminal (6, 89) y disminución de la motilidad (6, 90) en el grupo de mayor edad. Sin embargo, en contra de los resultado obtenidos en el presente estudio, otras investigaciones no encontraron diferencias en ningún parámetro espermático (7, 91).

Se ha demostrado que el semen está constituido por el plasma seminal y los espermatozoides. El plasma seminal consiste en las secreciones que se originan

en el epidídimo y en las glándulas sexuales accesorias, además, la vesícula seminal aporta aproximadamente el 60% del volumen seminal, la próstata 30%, mientras que las glándulas bulbouretrales 10% (92). La diferenciación, crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la vesícula seminal y la próstata dependen de la actividad de los andrógenos. La literatura no ha mostrado una correlación entre la edad y las secreciones de la próstata y epidídimo, aunque demostraron que la función de la vesícula seminal disminuye a causa del incremento de la edad (60).

El menor volumen seminal y motilidad progresiva observada en varones mayores de 50 años puede ser explicado por la disminución progresiva de testosterona libre en sangre por aumento de la globulina ligadora de hormonas sexuales relacionada a la edad. Dichos cambios influyen negativamente la función de las glándulas sexuales accesorias (58). Al disminuir la función de la vesícula seminal y la próstata, los volúmenes seminales decaerán. Asimismo, la motilidad espermática se verá afectada por los cambios en la interacción de los componentes secretados por dichas glándulas, interfiriendo con la licuefacción normal del semen al momento de la eyaculación.

A pesar que en este estudio el promedio de la motilidad progresiva reportada en el grupo de avanzada edad paterna ( $33.96 \pm 16.24$ ) es significativamente menor en comparación a los otros grupos etarios, este se encuentra dentro de los parámetros normales registrados por el Manual de laboratorio para el análisis de semen de la OMS 2010 (límite inferior de referencia = 32%). Sin embargo, en 54% de ciclos se observó baja motilidad progresiva.

Por otro lado, los resultados no fueron corregidos por los días de abstinencia, siendo este un variable confusora debido a la correlación que tiene con los parámetros espermáticos (93, 94). Asimismo, de acuerdo al protocolo interno del laboratorio se le indica a todos los pacientes que emiten muestra seminal para procedimientos de alta complejidad tener de 3 a 5 días de abstinencia como máximo.

## 7.2. EVALUACION DEL DESARROLLO EMBRIONARIO ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

La disminución de la fertilidad en mujeres de edad reproductiva avanzada se debe principalmente a la baja reserva ovárica y calidad ovocitaria, además del menor número de embriones de buena calidad morfológica y al aumento del riesgo de abortos espontáneos por las aneuploidias embrionarias (95). La donación de gametos es una conocida alternativa para mujeres que tienen problemas de infertilidad relacionadas con su ovocitos. Las donantes son mujeres jóvenes que usualmente tienen una excelente reserva ovárica, con mayores probabilidades de formar embriones viables.

Debido al sesgo asociado con la avanzada edad materna, el modelo de ovodonación fue utilizado en el presente estudio ya que representa una herramienta óptima para la evaluación del efecto de la edad del varón sobre el potencial reproductivo.

El promedio de ovocitos asignados por receptora fue similar en cada grupo, de aproximadamente 11 ovocitos por grupo etario. Además, en el análisis de desarrollo embrionario se distribuyeron los ciclos según su técnica de inseminación (FIV o ICSI), esto fue necesario para excluir el potencial impacto del factor masculino severo en el análisis. En los ciclos con FIV no hubo diferencias en la tasa de ovocitos fecundados ni en la tasa de ovocitos con falla de fecundación. Sin embargo, en los ciclos con ICSI se encontró mayor tasa de fecundación y menor tasa de ovocitos con falla de fecundación en el grupo de  $\geq 50$  años. Por otro lado, al evaluar la tasa global de fecundación no se encontraron diferencias. De acuerdo a los indicadores de calidad del laboratorio se considera que las tasas de fecundación por encima de 65% son óptimas (96), a pesar de las diferencias encontradas en el análisis (tasa de fecundación de aproximadamente 70%).

En concordancia con los resultados obtenidos, ciertos estudios usando el mismo modelo de ovodonación tampoco encontraron diferencias en la tasas de fecundación en los grupos de avanzada edad paterna (6, 9, 64, 97, 98), a pesar que un estudio incluyó en su análisis un grupo etario con varones mayores de 64 años (91).

Por otro lado, otros estudios sugieren que la tasa de fecundación decae significativamente con la avanzada edad ( $\geq 50$  años) a pesar que sus parámetros seminales sean óptimos independientemente del método de inseminación (5, 88). Un análisis similar lo realizaron Chapuis y col (2017), ellos evaluaron la influencia del factor masculino según el método de inseminación, encontrando menor tasa de fecundación por FIV en el grupo etario de avanzada edad y mayores tasas por ICSI. Asimismo, encontraron que la astenozoospermia (motilidad progresiva  $< 32\%$ ) afecta significativamente las tasas de fecundación por FIV y la oligozoospermia (concentración espermática  $< 15$  mill) en los casos por ICSI. Por lo que este estudio sugiere que los parámetros seminales tienen un impacto importante sobre la fecundación (99).

Hasta el 2013, los ovocitos fecundados fueron cultivados y vistos en la etapa de clivaje. Independientemente de la técnica de inseminación, la tasa de embriones de excelente calidad en día 3 fue de aproximadamente 20%, sin encontrarse diferencias con el incremento de la edad paterna. Algunos estudios tampoco encontraron diferencias en la calidad embrionaria en la etapa de clivaje (6, 64, 65, 100). Sin embargo, Luna y col (2009) hallaron menor número de embriones de excelente calidad en etapa de clivaje en el grupo de varones de avanzada edad ( $\geq 50$  años) (5).

Cabe recalcar que comparar la calidad embrionaria en etapa de clivaje entre los diferentes estudios es dificultoso ya que no todos siguen el mismo protocolo de clasificación embrionaria. Tres de estos estudios clasificaron a los embriones en clivaje de acuerdo al número y simetría de las blastómeras así como el porcentaje de fragmentación de las células (6, 64, 100), Campos y col (2008) clasificaron a los embriones por el número de las blastómeras y el grado de fragmentación (65). Por otro lado, Luna y col (2009) clasificaron a los embriones solo por el número de blastómeras ( $\geq 7$  células serían embriones de excelente calidad) (5).

Se ha demostrado que el cultivo extendido hasta la etapa de blastocisto permite un mejor proceso de selección (101) debido a que los embriones se “autoseleccionan” por activación del genoma embrionario (102). En el presente estudio todos los embriones fueron evaluados en día 5 del desarrollo.

Hasta el día de hoy, la evaluación de la calidad embrionaria es el método estándar de selección siendo capaz de elegir al embrión con capacidad de implantar y dar un nacido vivo (86). Van den Abbel y col (2013) encontraron que blastocistos de buena calidad presentan mejores resultados clínicos, donde un grado de trofoectodermo alto indica que es funcional capaz de eclosionar de la zona pelúcida e implantar, mientras que la masa celular interna de buena calidad podría reducir el riesgo de aborto precoz (103). Los resultados encontrados en el presente análisis indican que la edad paterna avanzada no correlaciona con una menor tasa de embriones de buena calidad puesto que se encontraron mayor número de embriones de buena calidad en el grupo  $\geq 50$  años en comparación con el grupo de 40-49 años (31% vs 26%, respectivamente, ver Tabla 6.2.4) en los casos inseminados por FIV. Sin encontrar diferencias en las tasas de embriones de buena calidad en los casos por ICSI, donde la tasa aproximada es de 20%. Asimismo, independientemente del método de inseminación, la edad paterna avanzada no correlaciona con la baja calidad embrionaria en la etapa de blastocisto. En concordancia con Garcia-Ferreira y col (2015), donde no encontraron diferencias en la tasa de blastocistos de buena calidad en el grupo de avanzada edad paterna ( $\geq 50$  años) (104).

De la misma manera, la tasa de utilización (# de embriones transferidos + criopreservados entre el total de cigotos) no se relaciona con la avanzada edad paterna. Sin embargo, se observó mayor tasa de utilización en el grupo  $< 40$  años en comparación con el de 40-49 años a pesar que este último grupo incluía mayor número de embriones fecundados (Tabla 6.2.4). El presente estudio muestra que la tasa de utilización de embriones encontrada en el grupo de varones de avanzada edad es alta y no disminuye con relación a la edad. Asimismo, otras variables podrían estar afectando la tasa de utilización en el grupo de 40-49 años que no se han evaluado en el análisis.

Otros estudios no evalúan la tasa de blastocistos de buena calidad, mas evalúan la tasa de formación de blastocistos, el cual cuantifica el número de embriones que llegaron a blastular, independientemente de la calidad embrionaria. Algunos autores indican que la avanzada edad paterna ( $> 50$  años) disminuye la tasa de formación de blastocistos (64). Dain y col (2011) sugieren que esta

disminución podría deberse a la activación del genoma paterno, junto con el materno, en la blastulación (105).

Aún existe gran controversia sobre si el desarrollo embrionario temprano está influenciado únicamente por factores maternos. La literatura sugiere que las primeras dos divisiones celulares son principalmente controlados por los genes maternos, mientras que a partir del estadio de 4 células inicia el control de los genes paternos (106). Asimismo, otros sugieren que el control del desarrollo embrionario temprano hasta la etapa de clivaje es de origen materno y las etapas siguientes, al control genómico de ambos padres (107).

Sabemos que los parámetros utilizados para evaluar la calidad seminal en el espermatograma no indican la integridad del ADN espermático, ya que algunos estudios han demostrado que anomalías en el ADN espermático afectan negativamente la calidad embrionaria (108, 109), mientras que una baja calidad seminal está asociada con bajas tasas de fecundación y lento desarrollo embrionario (110-112).

En el presente estudio, no se realizaron mediciones de fragmentación del ADN espermático, sin embargo esto podría dar una explicación en los diferentes resultados obtenidos por otros autores. Simon y col (2014) encontraron que la cromatina espermática dañada afecta todos los estadios del desarrollo embrionario, siendo el daño mayor cuando ha ocurrido la activación del genoma embrionario (a partir del día 3 del desarrollo). Asimismo, sugieren que en la fecundación tiene un gran efecto materno más que una influencia paterna (113).

Asimismo, el ovocito activa mecanismos de reparación para contrarrestar el daño producido por el ADN paterno (114), si el daño es elevado las células van a apoptosis aumentando la posibilidad de eliminar embriones en la etapa de blastocisto (113).

En resumen, ningún efecto de la avanzada edad paterna fue encontrado en el presente estudio sobre el desarrollo embrionario. De la misma manera, la literatura sugiere que no hay evidencia sólida que demuestre que la edad paterna avanzada está asociada directamente con el desarrollo embrionario en un modelo de ovodonación (115).

### 7.3. CORRELACION DE LAS TASAS DE EMBARAZO ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

Con el fin de eliminar el sesgo de la edad materna avanzada sobre las tasas de embarazo, el punto de corte de la edad de la receptora fue de 39 años. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre grupos, a pesar que el primer grupo (<39 años) incluyó mujeres entre 23 y 38 años. Además, al no encontrar diferencias entre los grupos de edad de la receptora y los grupos de edad paterna, los resultados sugieren que las tasas de embarazo no disminuyen con respecto a la edad paterna avanzada (Tabla 6.3.1). De la misma manera, algunos autores tampoco encontraron diferencias en las tasas de embarazo ni abortos espontáneos (5, 8, 9, 64, 116). En el presente análisis, todas las transferencias se realizaron en el día 5 del desarrollo, aunque los mencionados anteriormente no necesariamente realizaron la transferencia embrionaria en el mismo día del desarrollo.

Sin embargo, Wu y col (2015) encontraron cierta influencia negativa de la edad paterna avanzada sobre las tasas de implantación y abortos espontáneos, mas no en las tasas de embarazo y nacidos vivos, corrigiendo la edad materna en grupos (117). De la misma manera, Ferreira y col (2010) obtuvieron que la edad paterna avanzada (<51 años) afecta negativamente la tasa de embarazo clínico cuando la receptora es mayor a 37 años (7).

Al analizar los datos según el registro negativo de embarazo clínico, no se encontraron diferencias entre el promedio de edades tanto de la receptora como el varón entre los grupos de edad paterna (<40 años y  $\geq 50$  años), sugiriendo nuevamente que la avanzada edad paterna no influye sobre el embarazo, a pesar de observar que en el grupo de 40-49 años los que no registraron embarazo fueron significativamente mayores en comparación con el grupo que registró embarazo. Por otro lado, Girsh y col (2008) observaron que los varones pertenecientes al grupo “no embarazo” eran significativamente mayores en comparación con el grupo “embarazo” (66).

En concordancia con este estudio, el punto de corte de 39 años de la receptora ha sido utilizado por Campos y col (2008) en un análisis con 915 ciclos

con ovodonación para evaluar el efecto de la edad paterna sobre distintos parámetros reproductivos. Sin embargo, ellos reportaron una reducción en las tasas de embarazo cuando ambos padres eran mayores a 38 años. Una observación a tomar en cuenta es que también encontraron diferencias en las tasas de embarazo cuando solo la receptora era mayor a 38 años, notando que el efecto en las tasas de embarazo no necesariamente es de origen paterno (65). En el presente estudio, no se encontraron diferencias en las tasas de embarazo ni abortos espontáneos con la edad paterna avanzada ( $\geq 50$  años) independientemente de la edad de la receptora.

Algunos autores sugieren que las tasas de embarazo e implantación decaen a partir de los 40 años (118), otros sugieren a partir de los 45 años, siendo la disminución mayor cuando la receptora es mayor o igual a 50 años (119) a pesar de ser ciclos con ovodonación. Esta disminución en las tasas de embarazo podría deberse a factores uterinos relacionados a la avanzada edad materna, siendo la disminuida receptividad endometrial la posible causa (120).

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron hace más de diez años con respecto a la disminución de las tasas de embarazo en receptoras de avanzada edad, la literatura sugiere que múltiples factores podrían estar involucrados en el cambio del patrón de edad en la que las tasas de embarazo podrían disminuir entre las receptoras. Estas mejoras podrían deberse a la mejor selección de las donantes de ovocitos, mejores protocolos de estimulación ovárica en donantes y endometrial para las receptoras (119).

#### 7.4.EVALUACION DE LOS CICLOS CON DIAGNÓSTICO GENETICO PREIMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDIAS ENTRE LOS GRUPOS ETARIOS

Las aneuploidías embrionarias son la principal causa de fallos en la TRA, debido a que la mayoría de embriones con aneuploidías no implantan o son abortados espontáneamente durante el primer trimestre del embarazo (73, 76). El

diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías (PGD-A) ha reducido las tasa de pérdidas, aumentando las tasas de embarazo y nacidos vivos sanos (121).

La avanzada edad paterna ha demostrado tener efectos adversos sobre la integridad del ADN y aneuploidías en los espermatozoides. Estas causas podrían resultar en un desarrollo embrionario anormal pudiendo también estar relacionado con las aneuploidías embrionarias (122).

El análisis de los ciclos con PGD-A, tanto en día 3 como 5, muestra una reducción en la tasa de formación de blastocistos en el grupo de avanzada edad paterna (tabla 6.4.1 y 6.4.2), el cual sugiere que hay influencia de la edad paterna sobre la blastulación, en concordancia con otros estudios ya antes mencionados (64, 105).

Debido a que el presente estudio abarcó ciclos del 2011 al 2016, el protocolo para PGD-A se ha ido modificando y distintos análisis fueron implementándose. Asimismo, al controlar el sesgo de la edad materna con ovocitos donados, en la evaluación por PGD-A para los distintos análisis no se observó un aumento en las tasas de aneuploidías debido a la avanzada edad paterna (tabla 6.4.3), sugiriendo que el incremento de la edad paterna no modifica la constitución cromosómica de los embriones en desarrollo, a pesar que aún existe posibilidad de encontrar hasta el 39% embriones aneuploides en los ciclos de ovodonación (123).

En concordancia con estos resultados, Tieggs y col (2017) no encontraron relación entre la edad paterna y el porcentaje de embriones euploides por ciclo utilizando aCGH como análisis (122). Sin embargo, Garcia-Ferreira y col (2015) analizaron 32 ciclos de ovodonación en conjunto con PGD-A por FISH para determinar si el incremento de la edad paterna influye sobre la composición cromosómica embrionaria. El estudio sugiere que la edad paterna avanzada ( $\geq 50$  años) aumenta las tasas de aneuploidías embrionarias, disminuye la tasa de formación de blastocistos y aumenta la tasa de fragmentación de ADN espermático.

Asimismo, el análisis por FISH ha demostrado ser menos preciso al momento de detectar las aneuploidías (87), teniendo en cuenta que la biopsia de una blastómera se lleva a cabo en un embrión en clivaje y analiza un número restringido de cromosomas. Se demostró que las aneuploidías podrían aparecer en cualquiera de los 24 pares de cromosomas, dejando a la técnica obsoleta por sus limitaciones en el PGD-A (124, 125). La gran diferencia con la biopsia de trofoectodermo, es la capacidad de evaluar los 24 pares de cromosomas y necesariamente se necesita extender el cultivo embrionario hasta el día 5 o 6 del desarrollo, permitiendo un mejor proceso de selección, ya que no todos los embriones llegan a la etapa de blastocisto (126, 127).

Por otro lado, PGD-A mediante aCGH fue reemplazado por NGS, el cual detecta las aneuploidías parciales o segmentales como resultado del aumento en la resolución del análisis cromosómico. Así como también, presenta mayor amplitud de análisis que permite detectar la presencia de mosaicismo en muestras multicelulares (81, 128).

Thiel y col (2017) evaluaron 243 ciclos de ovodonación para determinar el efecto de la edad paterna en la tasa de embriones euploides por NGS, sin encontrar diferencias significativas (129). Sin embargo, ellos no evaluaron si la tasa de embriones mosaico aumenta conforme a la edad, lo que si realizó el presente estudio, sin obtener diferencias.

Una limitación en el análisis de PGD-A en este estudio es la poca cantidad de ciclos y embriones biopsiados en el grupo de avanzada edad paterna en comparación con los otros grupos estudiados. En el análisis por aCGH y NGS, se observa una disminución en las tasas de embriones euploides, sin embargo no es estadísticamente significativo (Tabla 6.4.3), se sugiere aumentar el número de embriones en el grupo de avanzada edad paterna con el fin de tener resultados más robustos.

## 8. CONCLUSIONES

Este estudio confirmó que la calidad seminal se deteriora a causa del incremento de la edad del varón ( $\geq 50$  años), evidenciándose por la disminución del volumen seminal y la motilidad progresiva sin afectar la concentración espermática. Por otro lado, la avanzada edad paterna no disminuye las tasas de fecundación, no interfiere con la buena calidad embrionaria en día 3 y 5, además no modifica el número de embriones utilizables.

Asimismo, al evaluar las tasas de embarazo utilizando el punto de corte de 39 años de la receptora, se demostró que la avanzada edad paterna no influye sobre las tasas de embarazo bioquímico y clínico, y abortos espontáneos.

Por último, el análisis mostró que el incremento de la edad paterna ( $\geq 50$  años) no influye sobre la tasa de embriones euploides al utilizar PGD-A por FISH, aCGH o NGS.

Debido a los resultados controversiales encontrados en la literatura, se sugiere seguir con las investigaciones acerca de la influencia de la edad paterna en los resultados de los TRA, aumentando el número de ciclos en el grupo de avanzada edad paterna con el fin de incrementar la confiabilidad del análisis estadístico. Así como también, realizar estudios con otro punto de corte de las receptoras para evaluar la influencia sobre las tasas de embarazo, como lo sugieren otros estudios.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen W, Hu J, Liu Q, Wei YL, Zhu GJ. [Influence of maternal age on meiotic spindle and chromosome configuration of oocytes]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2007;24(1):6-9.
2. Sahmay S, Oncul M, Tuten A, Tok A, Acikgoz AS, Cepni I. Anti-mullerian hormone levels as a predictor of the pregnancy rate in women of advanced reproductive age. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(11):1469-74.

3. Amarin VN, Akasheh HF. Advanced maternal age and pregnancy outcome. *East Mediterr Health J*. 2001;7(4-5):646-51.
4. Pantos K, Athanasiou V, Stefanidis K, Stavrou D, Vaxevanoglou T, Chronopoulou M. Influence of advanced age on the blastocyst development rate and pregnancy rate in assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 1999;71(6):1144-6.
5. Luna M, Finkler E, Barritt J, Bar-Chama N, Sandler B, Copperman AB, et al. Paternal age and assisted reproductive technology outcome in ovum recipients. *Fertility and sterility*. 2009;92(5):1772-5.
6. Bellver J, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reproductive biomedicine online*. 2008;17(5):595-604.
7. Ferreira RC, Braga DP, Bonetti TC, Pasqualotto FF, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr. Negative influence of paternal age on clinical intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in oligozoospermic patients. *Fertility and sterility*. 2010;93(6):1870-4.
8. Meijerink AM, Ramos L, Fleischer K, Veltman JA, Hendriks JC, Braat DD. Influence of paternal age on ongoing pregnancy rate at eight weeks' gestation in assisted reproduction. *Reproductive biomedicine online*. 2016;32(1):96-103.
9. Whitcomb BW, Turzanski-Fortner R, Richter KS, Kipersztok S, Stillman RJ, Levy MJ, et al. Contribution of male age to outcomes in assisted reproductive technologies. *Fertility and sterility*. 2011;95(1):147-51.
10. Enger ED, Ross FC, Bailey DB. *Physiological Processes. Concepts in biology*. 13th ed. Dubuque, IA: McGraw-Hill; 2009. p. 387-94.
11. Silbernagl S, Despopoulos A. Hormonas, reproducción. *Fisiología: texto y atlas*. 7ma edición ed: Médica Panamericana; 2008. p. 281- 309.
12. Fox SI. *Reproduction. Human physiology*. 8th ed. Boston: McGraw-Hill; 2004. p. 644-63.
13. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1520-4.
14. Masoumi SZ, Parsa P, Darvish N, Mokhtari S, Yavangi M, Roshanaei G. An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemeh Hospital in Hamadan. *Iran J Reprod Med*. 2015;13(8):513-6.

15. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med.* 2012;9(12):e1001356.
16. Rock J, Menkin MF. In Vitro Fertilization and Cleavage of Human Ovarian Eggs. *Science.* 1944;100(2588):105-7.
17. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research Ser B: Biological sciences.* 1951;4(4):581-96.
18. Moricard R. Observations of in vitro fertilization in the rabbit. *Nature.* 1954;173(4415):1140.
19. Pavlok A. Development of mouse ova in explanted oviducts: fertilization, cultivation, and transplantation. *Science.* 1967;157(3795):1457-8.
20. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978;2(8085):366.
21. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertility and sterility.* 1988;49(5):835-42.
22. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340(8810):17-8.
23. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983;305(5936):707-9.
24. Farquhar C, Rishworth JR, Brown J, Nelen WL, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;8:CD010537.
25. Bahadur G, Homburg R, Al-Habib A. A New Dawn for Intrauterine Insemination: Efficient and Prudent Practice will Benefit Patients, the Fertility Industry and the Healthcare Bodies. *Journal of obstetrics and gynaecology of India.* 2017;67(2):79-85.
26. Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby JA, Musri C, Urbina MT. Assisted reproductive techniques in Latin America: The Latin American Registry, 2013. *JBRA assisted reproduction.* 2016;20(2):49-58.
27. Huang JY, Rosenwaks Z. Assisted reproductive techniques. *Methods in molecular biology.* 2014;1154:171-231.

28. Gadella BM, Evans JP. Membrane fusions during mammalian fertilization. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011;713:65-80.
29. Sher G, Davis VM, Stoess J. *In vitro fertilization : the A.R.T. of making babies (assisted reproductive technology)*. 4th ed. New York: Skyhorse Pub.; 2013. 394 p. p.
30. Perea-Gomez A, Vella FD, Shawlot W, Oulad-Abdelghani M, Chazaud C, Meno C, et al. Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Developmental cell*. 2002;3(5):745-56.
31. Niakan KK, Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental biology*. 2013;375(1):54-64.
32. Honnma H, Baba T, Sasaki M, Hashiba Y, Ohno H, Fukunaga T, et al. Trophectoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2012;98(2):361-7.
33. Parsanezhad ME, Jahromi BN, Rezaee S, Kooshesh L, Alae S. The Effect of Four Different Gonadotropin Protocols on Oocyte and Embryo Quality and Pregnancy Outcomes in IVF/ICSI Cycles; A Randomized Controlled Trial. *Iranian journal of medical sciences*. 2017;42(1):57-65.
34. Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016(6):CD002118.
35. Su YT, Lin PY, Huang FJ, Kung FT, Lin YJ, Tsai YR, et al. Age is a major prognosticator in extremely low oocyte retrieval cycles. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. 2017;56(2):175-80.
36. Aflatoonian A, Eftekhar M, Mohammadian F, Yousefnejad F. Outcome of assisted reproductive technology in women aged 40 years and older. *Iranian journal of reproductive medicine*. 2011;9(4):281-4.
37. Ron-El R, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Kasterstein E, Friedler S. Outcome of assisted reproductive technology in women over the age of 41. *Fertility and sterility*. 2000;74(3):471-5.
38. Navarro D, Acosta A, Robles E, Diaz C. Hormone profile of menopausal women in Havana. *MEDICC review*. 2012;14(2):13-5.

39. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocrine reviews*. 2009;30(5):465-93.
40. Meldrum DR, Casper RF, Diez-Juan A, Simon C, Domar AD, Frydman R. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? *Fertility and sterility*. 2016;105(3):548-59.
41. Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and sterility*. 2006;85(3):584-91.
42. Frati P, Foldes-Papp Z, Panici PB, Brunelli R, Zaami S, Busardo FP, et al. A Retrospective Study on Advanced Maternal Age and Assisted Reproductive Techniques, Medico-Legal Advice, "Food for Thought". *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(4):330-6.
43. Bhasin S, Huang G, Travison TG, Basaria S. Age-Related Changes in the Male Reproductive Axis. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
44. Lunenfeld B, Nieschlag E. Testosterone therapy in the aging male. *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male*. 2007;10(3):139-53.
45. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Baltimore Longitudinal Study of A. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *Baltimore Longitudinal Study of Aging. The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(2):724-31.
46. Yang H, Chryssikos T, Houseni M, Alzeair S, Sansovini M, Iruvuri S, et al. The effects of aging on testicular volume and glucose metabolism: an investigation with ultrasonography and FDG-PET. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2011;13(2):391-8.
47. Mahmoud AM, Goemaere S, El-Garem Y, Van Pottelbergh I, Comhaire FH, Kaufman JM. Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(1):179-84.
48. In: Liverman CT, Blazer DG, editors. *Testosterone and Aging: Clinical Research Directions*. Washington (DC)2004.
49. Auger J, Jouannet P. Age and male fertility: biological factors. *Revue d'epidemiologie et de sante publique*. 2005;53 Spec No 2:2S25-35.

50. Corrales JJ, Burgo RM, Garca-Berrocal B, Almeida M, Alberca I, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Partial androgen deficiency in aging type 2 diabetic men and its relationship to glycemic control. *Metabolism: clinical and experimental*. 2004;53(5):666-72.
51. Kaplan SA, Crawford ED. Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes care*. 2006;29(3):749; author reply -50.
52. Kalme T, Seppala M, Qiao Q, Koistinen R, Nissinen A, Harrela M, et al. Sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 as indicators of metabolic syndrome, cardiovascular risk, and mortality in elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(3):1550-6.
53. Fukui M, Kitagawa Y, Nakamura N, Kadono M, Mogami S, Hirata C, et al. Association between serum testosterone concentration and carotid atherosclerosis in men with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2003;26(6):1869-73.
54. Crawford BA, Liu PY, Kean MT, Bleasel JF, Handelsman DJ. Randomized placebo-controlled trial of androgen effects on muscle and bone in men requiring long-term systemic glucocorticoid treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(7):3167-76.
55. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 271 p. p.
56. Neaves WB, Johnson L, Porter JC, Parker CR, Jr., Petty CS. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1984;59(4):756-63.
57. Homonnai ZT, Fainman N, David MP, Paz GF. Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. *Andrologia*. 1982;14(2):164-70.
58. Jung A, Schuppe HC, Schill WB. Comparison of semen quality in older and younger men attending an andrology clinic. *Andrologia*. 2002;34(2):116-22.
59. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertility and sterility*. 2001;75(2):237-48.
60. Elzanaty S. Association between age and epididymal and accessory sex gland function and their relation to sperm motility. *Archives of andrology*. 2007;53(3):149-56.

61. Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C, Renou P. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature*. 1984;307(5947):174-5.
62. Storgaard M, Loft A, Bergh C, Wennerholm UB, Soderstrom-Anttila V, Romundstad LB, et al. Obstetric and neonatal complications in pregnancies conceived after oocyte donation: a systematic review and meta-analysis. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2017;124(4):561-72.
63. Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby J, Musri C, Urbina MT, Latin American Network of Assisted R. Assisted reproduction techniques in Latin America: the Latin American Registry, 2014. *Reproductive biomedicine online*. 2017;35(3):287-95.
64. Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott RT, Jr. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertility and sterility*. 2008;90(1):97-103.
65. Campos I, Gomez E, Fernandez-Valencia AL, Landeras J, Gonzalez R, Coy P, et al. Effects of men and recipients' age on the reproductive outcome of an oocyte donation program. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2008;25(9-10):445-52.
66. Girsh E, Katz N, Genkin L, Girtler O, Bocker J, Bezdin S, et al. Male age influences oocyte-donor program results. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2008;25(4):137-43.
67. De La Rochebrochard E, McElreavey K, Thonneau P. Paternal age over 40 years: the "amber light" in the reproductive life of men? *Journal of andrology*. 2003;24(4):459-65.
68. de La Rochebrochard E, de Mouzon J, Thepot F, Thonneau P, French National IVFRA. Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of in vitro fertilization in France. *Fertility and sterility*. 2006;85(5):1420-4.
69. Carrell DT. Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness. *Reproductive biomedicine online*. 2008;16(4):474-84.
70. Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Perez-Crespo M, Sanchez-Martin M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod*. 2008;78(4):761-72.

71. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod.* 2002;17(1):184-9.
72. Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2010;94(3):875-87.
73. Hyde KJ, Schust DJ. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2015;5(3):a023119.
74. West JD, Gosden JR, Angell RR, Hastie ND, Thatcher SS, Glasier AF, et al. Sexing the human pre-embryo by DNA-DNA in-situ hybridisation. *Lancet.* 1987;1(8546):1345-7.
75. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990;344(6268):768-70.
76. Munne S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L, et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenatal diagnosis.* 1998;18(13):1459-66.
77. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simon C, et al. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reproductive biomedicine online.* 2003;6(2):232-7.
78. Ren Y, Zhi X, Zhu X, Huang J, Lian Y, Li R, et al. Clinical applications of MARSALA for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao.* 2016;43(9):541-7.
79. Ly KD, Agarwal A, Nagy ZP. Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo? *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2011;28(9):833-49.
80. Lai HH, Chuang TH, Wong LK, Lee MJ, Hsieh CL, Wang HL, et al. Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization. *Molecular cytogenetics.* 2017;10:14.
81. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy

screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human reproduction*. 2014;29(12):2802-13.

82. Mertzaniidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human reproduction*. 2013;28(1):256-64.

83. Fan J, Wang L, Wang H, Ma M, Wang S, Liu Z, et al. The clinical utility of next-generation sequencing for identifying chromosome disease syndromes in human embryos. *Reproductive biomedicine online*. 2015;31(1):62-70.

84. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *The New England journal of medicine*. 2015;373(21):2089-90.

85. L. V. An atlas of human gametes and conceptuses. Carnforth: Parthenon Publishing; 1999.

86. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and sterility*. 2000;73(6):1155-8.

87. Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and sterility*. 2011;95(3):953-8.

88. Duran EH, Dowling-Lacey D, Bocca S, Stadtmauer L, Oehninger S. Impact of male age on the outcome of assisted reproductive technology cycles using donor oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 2010;20(6):848-56.

89. Spandorfer SD, Avrech OM, Colombero LT, Palermo GD, Rosenwaks Z. Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction*. 1998;13(2):334-8.

90. Aboulghar M, Mansour R, Al-Inany H, Abou-Setta AM, Aboulghar M, Mourad L, et al. Paternal age and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive biomedicine online*. 2007;14(5):588-92.

91. Gallardo E, Simon C, Levy M, Guanes PP, Remohi J, Pellicer A. Effect of age on sperm fertility potential: oocyte donation as a model. *Fertility and sterility*. 1996;66(2):260-4.

92. Sherwood L. The Reproductive System. *Human Physiology: From Cells to Systems*. Ninth Edition ed: Cengage Learning; 2015. p. 731.

93. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertility and sterility*. 2004;82(1):57-65.
94. Mayorga-Torres BJ, Camargo M, Agarwal A, du Plessis SS, Cadavid AP, Cardona Maya WD. Influence of ejaculation frequency on seminal parameters. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2015;13:47.
95. O'Brien YM, Ryan M, Martyn F, Wingfield MB. A retrospective study of the effect of increasing age on success rates of assisted reproductive technology. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2017;138(1):42-6.
96. Hughes C. Association of clinical embryologists - guidelines on good practice in clinical embryology laboratories 2012. *Hum Fertil (Camb)*. 2012;15(4):174-89.
97. Paulson RJ, Milligan RC, Sokol RZ. The lack of influence of age on male fertility. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001;184(5):818-22; discussion 22-4.
98. Gu L, Zhang H, Yin L, Bu Z, Zhu G. Effect of male age on the outcome of in vitro fertilization: oocyte donation as a model. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012;29(4):331-4.
99. Chapuis A, Gala A, Ferrieres-Hoa A, Mullet T, Bringer-Deutsch S, Vintejou E, et al. Sperm quality and paternal age: effect on blastocyst formation and pregnancy rates. *Basic and clinical andrology*. 2017;27:2.
100. Wu Y, Kang X, Zheng H, Liu H, Liu J. Effect of Paternal Age on Reproductive Outcomes of In Vitro Fertilization. *PloS one*. 2015;10(9):e0135734.
101. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1998;13(12):3434-40.
102. Ozgur K, Humaidan P, Coetzee K. Segmented ART - The new era in ART? *Reproductive biology*. 2016;16(2):91-103.
103. Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJ, Klein BM, et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reproductive biomedicine online*. 2013;27(4):353-61.
104. Garcia-Ferreira J, Luna D, Villegas L, Romero R, Zavala P, Hilario R, et al. High Aneuploidy Rates Observed in Embryos Derived from Donated Oocytes are Related to

Male Aging and High Percentages of Sperm DNA Fragmentation. *Clinical medicine insights Reproductive health*. 2015;9:21-7.

105. Dain L, Auslander R, Dirnfeld M. The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. *Fertility and sterility*. 2011;95(1):1-8.

106. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988;332(6163):459-61.

107. Agostoni E. Preimplantation development of the mammalian embryo. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 1993;29(1):15-25.

108. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and sterility*. 2004;81(5):1289-95.

109. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and sterility*. 2007;87(1):93-100.

110. Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems biology in reproductive medicine*. 2011;57(3):133-8.

111. Ron-el R, Nachum H, Herman A, Golan A, Caspi E, Soffer Y. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertility and sterility*. 1991;55(2):338-44.

112. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertility and sterility*. 1993;60(5):888-92.

113. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod*. 2014;29(11):2402-12.

114. Bazrgar M, Gourabi H, Yazdi PE, Vazirinasab H, Fakhri M, Hassani F, et al. DNA repair signalling pathway genes are overexpressed in poor-quality pre-implantation human embryos with complex aneuploidy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2014;175:152-6.

115. Sagi-Dain L, Sagi S, Dirnfeld M. Effect of paternal age on reproductive outcomes in oocyte donation model: a systematic review. *Fertility and sterility*. 2015;104(4):857-65 e1.
116. Robertshaw I, Khoury J, Abdallah ME, Warikoo P, Hofmann GE. The effect of paternal age on outcome in assisted reproductive technology using the ovum donation model. *Reproductive sciences*. 2014;21(5):590-3.
117. Wu YX, Liu JQ, An G, Liu HY. [Influence of male age on the pregnancy outcomes of IVF-ET]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology*. 2015;21(6):527-31.
118. Borini A, Bianchi L, Violini F, Maccolini A, Cattoli M, Flamigni C. Oocyte donation program: pregnancy and implantation rates in women of different ages sharing oocytes from single donor. *Fertility and sterility*. 1996;65(1):94-7.
119. Yeh JS, Steward RG, Dude AM, Shah AA, Goldfarb JM, Muasher SJ. Pregnancy outcomes decline in recipients over age 44: an analysis of 27,959 fresh donor oocyte in vitro fertilization cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology. *Fertility and sterility*. 2014;101(5):1331-6.
120. Toner JP, Grainger DA, Frazier LM. Clinical outcomes among recipients of donated eggs: an analysis of the U.S. national experience, 1996-1998. *Fertility and sterility*. 2002;78(5):1038-45.
121. Scott RT, Jr., Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertility and sterility*. 2012;97(4):870-5.
122. Tiegs AW, Sachdev NM, Grifo JA, McCulloh DH, Licciardi F. Paternal Age Is Not Associated With Pregnancy Outcomes After Single Thawed Euploid Blastocyst Transfer. *Reproductive sciences*. 2017;24(9):1319-24.
123. Haddad G, Deng M, Wang CT, Witz C, Williams D, Griffith J, et al. Assessment of aneuploidy formation in human blastocysts resulting from donated eggs and the necessity of the embryos for aneuploidy screening. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(6):999-1006.
124. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Human reproduction update*. 2011;17(4):454-66.

125. Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and sterility*. 2010;94(4):1173-7.
126. Harton GL, Munne S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, et al. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertility and sterility*. 2013;100(6):1695-703.
127. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2014;12:22.
128. Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT, Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertility and sterility*. 2013;99(5):1377-84 e6.
129. Thiel A, Li X., Kolb, B., Nelson, J., Norian, J. M., Wilcox, J. G., Tan, T. T. Advanced paternal age does not affect embryo aneuploidy rate in egg donor cycles. [Abstract]. In press 2017.