

Gradu Amaierako Lana  
Medikuntzako Gradua

## Oozito bitrifikatuen benetako eraginkortasuna

Kohorte ikerketa emaleen eta emakume nagusien oozito bitrifikatu eta freskoen erabilerarekin

Egilea  
ALAZNE OCHOA ARNAIZ

Zuzendaria  
GORKA BARRENETXEA ZIARRUSTA

© 2018, Alazne Ochoa Arnaiz

Leioa, 2018ko apirilaren 16a

## ABSTRACT-a

**Sarrera:** Azken urteotan aldaketa soziokulturalengatik, emakumeak adin nagusiagoan bihurtzen dira ama, honek dakarren ugalkortasun gaitasunaren gutxitzearekin batera. Ugalkortasuna preserbatzeko teknikak bere lekua aurkitzen daude lagundutako ugalkortasun zentroetan, horietako bat oozito autologoaren bitrifikazioa izanik.

**Helburua:** Oozito fresko eta bitrifikatuen emaitzak alderatzea. Horretarako, bi ikerketa obserbazional -kohorte-erretrospektibo egin dira; bat donazio programako oozitoekin, eta bestea, oozito metaketa programan lortutako oozitoekin.

**Metodoak:** 2016-2017 urteen artean lagundutako ugalketan espezializatutako zentro pribatuko (*Reproducción Bilbao*) datuak aztertu ziren.

Aztertutako emaitza nagusiak ernalkuntza-tasa, blastozisto garapen-tasa eta *ongoing* haurdunaldi-tasa/ transferentziako izan ziren. Gainera, oozito autologoaren ikerketan datu horietaz gain, euploidia-tasa eta *ongoing* haurdunaldi-tasa/ pazienteko ere aztertu ziren.

Emaitzak alderatzeko Pearsonen  $\chi^2$  testa eta t-student erabili ziren.

**Emaitzak:** Emaleen oozitoen artean, oozito freskoekin lortutako ernalkuntza- eta *ongoing* haurdunaldi-tasak/ transferentziako estatistikoki hobeak izan ziren (%96,20 vs %70,61- p=0,0001-eta %58,14 vs %40,98- p=0,0398-, hurrenez hurren). Blastozisto garapen-tasa, ordea, bi taldetan antzekoa izan zen.

Oozito autologoaren kasuan, euploidia-tasa eta *ongoing* haurdunaldi-tasak/ pazienteko hobeak ziren oozito freskoen taldean (%40,79 vs %13,04- p=0,0012-eta %64,00 vs %16,67- p=0,0190-, hurrenez hurren). Ernalkuntza- eta *ongoing* haurdunaldi-tasak/ transferentziako, ordea, bi taldeetan antzekoak izan ziren.

**Ondorioak:** Bi ikerketetan oozito bitrifikatuekin ez dira freskoekin bezain emaitza onak lortu, hala ere, ezin daiteke oozitoen bitrifikazioa baztertu ugalkortasuna preserbatzeko teknika bezala, oraindik ikerketa gehiagoren beharra dago.

**Hitz gakoak:** Oozitoak, bitrifikazioa, bitrifikatuak vs freskoak, ernalkuntza-tasa haurdunaldi-tasa,

---

## AURKIBDIEA

<b>1. SARRERA</b>	<b>1</b>
<b>1. 1. EGOERA SOZIAL-DEMOGRAFIKOA</b>	<b>1</b>
<b>1. 2. UGALKORTASUNAREN PRESERBAZIO TEKNIKAK</b>	<b>3</b>
<b>1. 3. OOZITOEN KRIOPRESERBAZIOA</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1. Historia</b>	<b>4</b>
<b>1.3.2. Teknika</b>	<b>5</b>
<b>1.3.3. Gaur egungo egoera</b>	<b>8</b>
<b>2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIALAK eta METODOAK</b>	<b>9</b>
<b>3.1. IKERKETAREN DISEINUA ETA AZTERTUTAKO EMAITZAK</b>	<b>9</b>
<b>3.2. PAZIENTEEN LAGINAREN EZAUGARRIAK ETA OOZITOEN ESLEIPENA</b>	<b>10</b>
<b>3.3. TEKNIKA</b>	<b>11</b>
<b>3.4. METODO ESTATISTIKOA</b>	<b>15</b>
<b>4. EMAITZAK</b>	<b>15</b>
<b>4.1. EMAILEEN OOZITOAK</b>	<b>15</b>
<b>4.2. OOZITO AUTOLOGOAK</b>	<b>17</b>
<b>5. EZTABAIDA</b>	<b>19</b>
<b>5.1. EMAITZEN LABURPENA</b>	<b>19</b>
<b>5.2. IKERKETAREN MUGAK</b>	<b>20</b>
<b>5.3. ONDORIOAK</b>	<b>22</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA:</b>	<b>24</b>



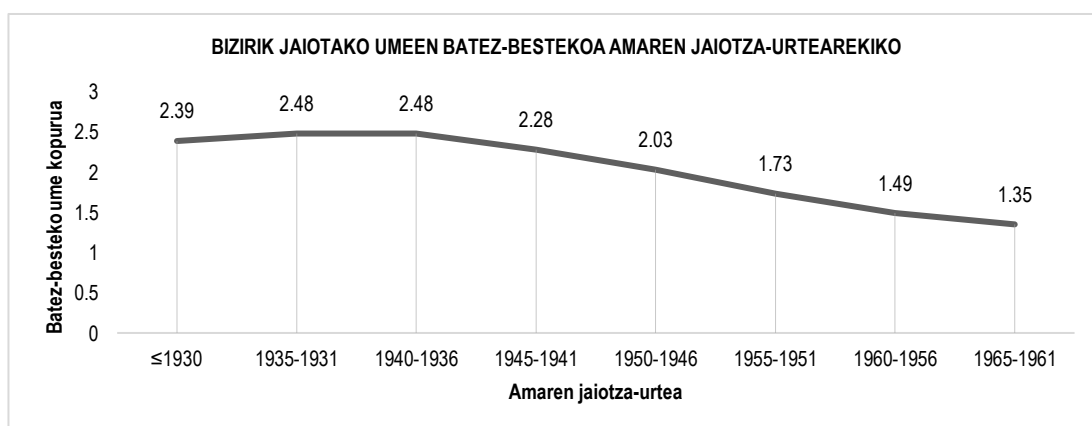
## 1. SARRERA

### 1. 1. EGOERA SOZIAL-DEMOGRAFIKOA

Azken hamarkadetan zehar, aldaketa sozial-demografiko nabaria egon da Euskal Autonomia Erkidegoan.

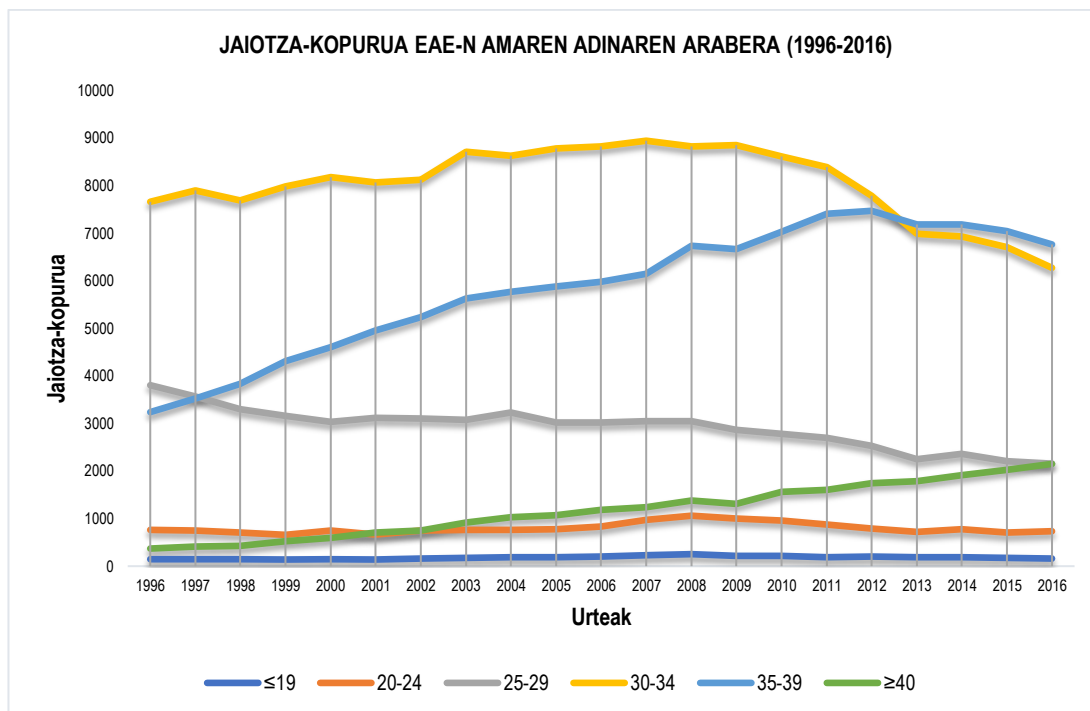
Alde batetik, bizirik jaiotako umeen kopuruak beheranzko joera izan du, (2011-2016 urteen artean %13,88-ko txikitzearekin) [1], EAEko jaiotza-tasa Europar Batasuneko txikienetarikoa izaten jarraitzen duela. [2]

Gehiago esanda, denbora aurrera doan heinean, emakume bakoitzak gero eta ume gutxiago dituela baieztatu daiteke (ikus **1. Irudia**). Gainera, ume gutxiago izateko joera azken urteotan nabariagoa dela ikus daiteke (horrela, emakume bakoitzari dagokion adinarekiko izango zituen batez-beste ume kopurua aurreikusitakoaren oso azpitik geratzen dela baieztatu daiteke). [3,4]



**1.Irudia.** EUSTAT. Biztanleria eta etxebizitza estatistika (2006). 53 urte baino gehiagoko emakume bakoitzak batez-beste edukitako umeen kopurua, belaunaldika adierazita.

Beste alde batetik, ume gutxiago edukitzeaz ez ezik, emakumeak gero eta adin nagusiagoan bilakatzen dira ama (ikus **2. Irudia**). Azken urteetan izandako bilakaerari erreparatuta, 25-34 urte dituzten emakume gutxiago bilakatzen dira ama eta 35 urte baino gehiagokoen kopurua, ordea, gero eta handiagoa da. Nabaria da 40 urte baino gehiagoko ama kopuruaren goranzko joera progresiboa. [1]



**2.Irudia.** EUSTAT. Bizirik jaiotako umeen kopuru totala amaren adin-tartearen arabera, 1996-2016 urteetan zehar izandako bilakaera.

Aldaketa demografiko hau arrazoi soziokultural desberdinengatik azaldu daiteke.

Herrialde industrializatu baten ekonomia garatu ahala, biztanleriaren bizi-eredia ere aldatzen da, are gehiago emakumea lan-merkatuan sartzearekin batera.

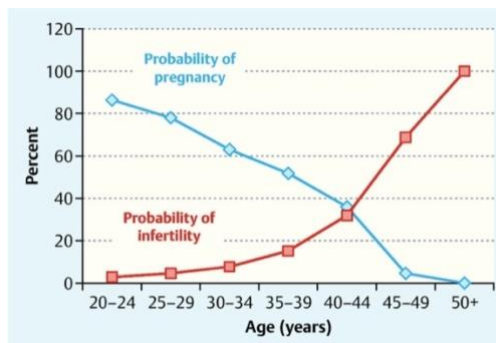
Emakumeek, bereziki lan kualifikatua daukatenak, beranduago edukitzen dituzte umeak, euren ikasketak bukatu eta karrera profesionalean arrakasta izan eta egonkortasun ekonomikoa eta familiarra eduki arte. [5]

Gainera, bestelako arrazoiekin ere lotu izan da: antisorkuntza metodoen aurrerapena eta erabilera, amatasuna aurrera eramateko gizarte-babesaren eskaintza gabezia (amatasun-bajen luzatzea, haurtzaindegi eskuragarriagoak, berme-ekonomikoa...), zaintza-lana emakumearen eskuetan bakarrik geratzea, haurduntze, erditze eta puerperioan zehar emakumeen ongizate mentala bermatzeko tresnarik ez eskaintzea... [6]

Pixkanaka gertatzen ari den baina jada agerikoa den joera horretaz kontziente izan behar gara medikuntzaren alorrean, ginekologia eta obstetriziari dagokionean, batik bat.

## 1. 2. UGALKORTASUNAREN PRESERBAZIO TEKNIKAK

Aldaketa sozial-demografiko honek dakarren arazorik nagusia amaren adina atzeratzearekin, eta horrenbestez, menopausiaren adina gerturatzearekin (48-51 urte), ugalkortasun gaitasuna nabarmen jaisten dela da [7], 32 urtetik aurrera gradualki eta 37 urtetik aurrera era nabarmenagoan, eta honekin batera, ezinbestean jaiotza-tasa ere jaisten da. (Ikus **3.Irudia**)



**3.Irudia.** Emakumearen zahartzea antzutasun eta ugalkortasun proportzioarekin erlazionatua.

Gainera, aurrerapen medikoen bestelako ondorioa gaixotasun larria (minbizia, gaixotasun autoinmuneak...) duten emakumeen bizitza-itxaropena luzatzea da tratamendu agresiboen bidez. Hauek ere arazo iatrogenikoak sor ditzakete ugalkortasun gaitasunean, izan ere, paziente hauek tratamendu gonadotoxikoak jaso beharko dituzte. [7,8,12]

Kimioterapiaren kasuan, bereziki droga zitostatiko alkilanteek (ziklofosfamida...) DNA, RNA eta proteinen sintesian aldaketak sor ditzakete eta folikulu primordial eta granulosa zelulen kopurua gutxitu.

Erradioterapiaren kasuan, erradiazio ionizatzaileak DNAn aldaketak sor ditzake. <2-4Gy nahikoa da oozitoen %50 kaltetzeko. Obulutegiko kalteez gain, garunari bideratutako erradiazioak hipogonadismoa sortu dezake (hipotalamo-hipofisi-obulutegi ardatza kaltetuz). [7,8,12]

Horrela, ugalkortasuna preserbatzeko teknikak garatu dira bi egoera hauei erantzuna emateko<sup>1</sup>:

- Enbrioien kriopreserbazioa: pazientearen oozitoetatik *in-vitro* ernaldutako enbrioia izoztatzea, gerora inplantatzeko. Halabeharrez, gameto arrak beharko ziren prozedura honetarako (arazo bat dena momentuan emakumeak

<sup>1</sup> Arazo iatrogenikoei erantzuten dieten bestelako teknikak badaude ere, bereziki aholku mediko gabe (ama adintsuen kasua) aplikatu daitezkeen tekniken inguruko berrikusketa da hau.

bikotea ez badauka) eta soberako enbrioiekin zer egitearekin arazo etikoak [11,12] sor daitezke.

- Obulutegi ehunaren kriopreserbazioa (autotransplanterako): Ehun-terapian oraindik ikerketan dagoen teknika da. Emakumearen obulutegiaren ehuna erauzi eta izoztatzean datza, gerora ortotopikoki (obulutegian) edo heterotopikoki (obulutegitik kanpo, honek *in-vitro* tekniken beharra dauka ernalkuntza gertatzeko) inplantatzeko.

Erauzitako ehunak pedikulu baskularra ez duenez (agente kriobabesleen penetrantzia gaitasun urria dela eta), ehunaren iskemia arriskua dago inplantearen ostean neoangiogenesisia ematen ez bada.

Aurreko teknikek aurkezten dituzten oztopoak direla eta, oozitoen kriopreserbazioa da gaur egun ugalkortasuna preserbatzeko aurkezten zaigun teknikarik egokienetarikoa, bereziki aholku medikorik gabeko kasuetan. [7, 8, 9, 12, 13]

### **1. 3. OOZITOEN KRIOPRESERBAZIOA**

#### **1.3.1. Historia**

Kriopreserbazioaren hasierako hastapenak 1949 urtean hasi ziren Polgek eta bere taldeak glizerolaren ezaugarri kriobabesgarriak deskubritu zituztenean.

Hasierako urteetan saguekin egindako ikerketetan oozitoen izozte erritmo motelaren beharra ikusten zen arren, enbrioiak garatzeko zailtasuna zegoela ikusita (akats genetikoengatik bereziki), 1985. urtean, bitrifikazioaren prozedura ikertzen hasi zen saguen enbrioiekin.

1986. urtean izozte motela/ desizozte azkarra teknika eta DMSO (dimetilsulfoxidoa) substantzia kriobabesle bidez Chenek eta bere taldeak lehen haurdunaldia (eta bikien jaiotza) lortu zuten.

Gerora, 1993-1995. urteen artean PROH (propanediol) kriobabeslearekin frogatu zuten giza-oozitoetan Gookek eta bere taldeak, emaitza onak jasoz. Horrela, 1997 urtean prozedura honen bidez lortutako lehenengo umea jaio zen Porcu eta bere taldeak gidatuta.



1994. urtean, Melbournen Royal Women's Hospital-ean lehenengo oozito bankua ezarri zen, minbizia zuten emakume gazteen ugalkortasuna babesteko asmoarekin.

1995. urtean Hunterrek oozitoak fertilizatzea lortu bazuen ere, ez zen geroko zatiketa enbrionariorik ikusi izan. 1999. Urtean, ordea, Hongek oozito bitrifikatuetatik lortutako enbrioiak blastozistora heltzea ikusi zuen, aneuploidiarik erakutsi ez zutenak, baina jaiotzarik lortu gabe.

1999. urtean bitrifikazio bidez lortutako ooztitoetatik lehenengo jaiotza lortu zuen Kuleshovak gidatutako taldeak, desizoztearen ostean IVF-ICSI teknika eraman zen aurrera.

Azkenengo aurrerapenak bitrifikazioan EG (etilenglikol) kriobabeslearen (2003an Yoon eta bere taldeak) eta Japonian garatutako *Cryotop*® metodoaren erabilera izan dira (2003an ere Katayamak eta bere taldeak garatutakoa). [10, 11, 12]

### 1.3.2. Teknika

Emakumeak euren oozitoak kriopreserbatu nahi izatekotan 35-38 urte bete aurretik egin behar dute, erreserba folikularraren<sup>2</sup> balorazioa egin eta bideragarria dela baieztatu ostean. [9]

Emakumeari oozitoak erauzi aurretik, obulutegien estimulazio farmakologikoa behar du, oozito helduak II metafasean egon daitezen. Estimulazio hau gonadotropinekin egiten da, baina aurretik, GnRH antagonistak erabiltzen dira emakumea edozein fasean dagoela ere, obulazioa ekidin eta oozitoak interesatzen den fasean gera daitezen. Ondoren, anestesiapean ekografoak gidatutako eta bagina bidezko ziztada eta aspirazioa egiten dira obulutegietan eta kriopreserbazioa jasaten dute oozitoek. [8,9,11]

---

<sup>2</sup> **Erreserba folikularraren balorazioa:** froga estatikoen bidez (FSH, E<sub>2</sub>, B inhibina, AMH serikoa neurtuz), froga dinamikoen bidez (klomifeno zitrato/GnRH agonistaen bidezko estimulazioa, FSH exogenoarekin neurtutakos testa) edo ekografia bidezko aurkikuntzekin (oozito bolumenaren/ folikulu antralen neurketa). [14]

### 1.3.2.1. Izozte-motela

Izotzaren formazioa eta disoluzio efektuak shock osmotikoa ekiditeko, oozitoa erauzi ostean oreka lortu beharra dauka, horretarako, substantzia kriobabesle baten soluzioan sartzen da (PROH 1,5M-ko kontzentrazioan), 10 minutuz, zelulatik ura atera eta PROH sartzeko (zelula deshidratatzeko). Gero, oreka-soluzio horri, 0,2M sakarosa (kriobabesle ez penetrantea) gehitzen zaizkio izozte-soluzioa lortzeko eta 10,5-15 minutuz uzten da, espazio estrazelularrerako uraren igarotze osmotikoa errazteko.

Temperaturaren jaitsiera kontrolatua egiteko, bioizozkailu bat erabiltzen da. Temperaturaren 2°C/min-ko abiaduran jaisten da, -5°C eta -15°C arteko temperatura lortu arte. Orduan baieztatu daiteke zelularen deshidratazioa gertatu dela eta ura pixkanaka zelulatik atera eta zelulaz kanpoko espazioan izozten dela (intrazelularki gertatuz gero, kaltegarria litzateke). Momentu horretan *seeding* deritzon teknika egiten da, oozitoak dauden izozte-soluzioaren edukiontzia -196°C-ko temperaturan (nitrogeno likidoa egongo den temperatura, zeinetan oozitoak ez diren biologikoki aktiboak) dagoen tresna batekin ukitzea.

Honen ostean, nitrogeno likidoan uzten dira gordeta desizozte eta espermatozoiden mikroinjekzioaren momenturarte. [11,12]

### 1.3.2.2. Bitrifikazioa

Gaur egun, hau da normalizatua dagoen kriopreserbazio teknika; izan ere, ikerketa desberdinen bitartez ikusi izan da bitrifikazioak oozitoaren fisiologian izozte-motelak baino inpaktu gutxiago daukala [15]. Gehiago esanda, bitrifikazioa eta oozitoen izozte-motela konparatzen dituzten ikerketak ondorioztatu dute lehenengokoarekin emaitza hobeak lortzen zirela [16, 17, 18, 19, 20].

Kasu honetan, soluzio likidoa egoera solidora pasatzean datza, kristalino fasetik igaro gabe. Bitrifikazio prozedura gehienetan, Kuwayamak. proposatutako bitrifikazio-pausuak eta *Cryotop*® (Kitazato, Biopharma) kit komertzialak erabiltzen dira.

Oozitoak %7,5 EG eta %7,5 DMSO (penetranteak) disoluzioan ekilibratzen dira, gradualki eta giro-temperaturan. 12-15 minutuko inkubazioaren ostean, %15 EG, %15 DMSO eta 0,5M sakarosako bitrifikazio soluzioan uzten dira, minutu batez bakarrik, izan ere, substantzien kontzentrazio altu hau toxikoa da zelularentzat eta ezin da luzez

horrelako inguruan egon, horrenbestez, minutu hori igaro ostean, oso modu azkarrean nitrogenu likidoan (LN<sub>2</sub>), -196°C-tan dagoena, hondoratu behar dira oozitoak. Izozte super azkarra gertatzen denez, oozittoa ez da deshidratatzen baina ez dago denborarik izotz intrazelularrak garatzeko. [11,12, 21, 22, 23, 24, 25, 26]

#### 1.3.2.3. Desizoztea

Desizoztea tenperaturaren igoera oso azkarrarekin izan behar da (275°C/min); izan ere, baliteke izozte-fasean izotzezko kristalen bat geratu izana espazio intrazelularrean eta desizoztea motela bada, kristalizazio-nukleo moduan jardun dezake tamaina handituz eta zelula kaltetuz.

Bestetik, oozittoa desizoztean urrituz doazen substantzia kriobabeslearen soluzio desberdinetan sartu behar da (sakarosa extrazelularrak ere laguntzen du honetan); bestela, ura substantzia kriobabeslea atera baino azkarrago sartzen denez zelulan, bat-batean oozitooan sartuko litzateke hau handituz, lehertzeraino; progresiboki berhidratatu behar da oozittoa. [11,12]

Oro har, nitrogenu likidotik atera eta berehala 37°C-ko 1M sakarosa berotze-diluzio (1ml) batean sartzen dira oozitoo bitrifikatuak, minutu batez. Ondoren, giro-tenperaturan dagoen 0.5M sakarosako diluziora (1ml) pasatzen dira, 3 minutuz. Azkenik, garbiketa soluzio bitara pasatzen dira, batera 5 minutuz eta bestera minutu batez, hau ere giro-tenperaturan.

Bizirauten duten oozitooak 37°C-ko tenperaturan kultibatzen dira, %6 CO<sub>2</sub> eta %5 O<sub>2</sub> kontzentraziotan ICSI jasan eta 2 ordu lehenagoz. [20, 21, 22, 23, 24, 25]

#### 1.3.2.4. Oozitooen bideragarritasuna

Oozitooak bideragarriak diren ziurtatzeko, haurdunaldirako eta gerorako prozesuan zehar kontrol desberdinak egiten dira [11,12]:

1. Mikroskopia bidezko azterketa desizozte eta inkubazio ostean.
2. Espermatooidearen mikroziudadaren (ICSI) osteko fertilizazio normala garatzea.

3. *In vitro* bidezko zatikatze eta garatze normala.
4. Umetokira transferentzia egin aurretik, enbrioaren ikerketa kromosomikoa.
5. Behin haurdunaldia lortuta, amniozentesia fetuaren kromosomopatiak baztertzeko.
6. Jaioberriaren azterketa pediatrikoa.

### **1.3.3. Gaur egungo egoera**

14/2006 legeari erreparatuz, III. kapituluan (*Criopreservación y otras técnicas coadyuvantes de la Reproducción Asistida*), 11. artikuluan kriopreserbatutako oozitoen erabilera zentro bakoitzari dagokion osasun-autoritateari aldeztu aurretik baimena eskatu behar zaiola dio. [27]

Horrela, gaur egun estatuko edozein klinika pribatutan dago oozitoak bitrifikatze aukera.

2015eko SEF-eko<sup>3</sup> datuen arabera, 9126 oozito desbitrifikatu ziren %82,4-ko biziraute oozitarioarekin eta %67,7 kasuetan, fertilizazioa lortuz. Haurdunaldi-tasa %31,6-koa eta jaiotza-tasa %21,8-koa izan ziren. 2015 urteko bukaerarako, 47.346 oozito zeuden kriopreserbatuak. [28]

Emaitza horiek isolatuta ikusteak ideia orokor bat eman baliezaguke ere, beharrezkoa litzateke oozito freskoekin IVF-ICSI bidez lortutako datuekin konparatzea ugalkortasuna preserbatzeko teknika egokitzat jotzeko edo ez.

## **2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK:**

Enbrioien kriopreserbazio-teknikaren aldeko emaitzak aztertuta [29, 30], ate bat irekitzen da oozito bitrifikatuen inguruan ikertzeko eta honen emaitzak oozito freskoenen antzekoak izatea aurreikusten da.

Lan honen helburua bitrifikatutako oozitoen eta oozito freskoen arteko emaitzak alderatzea da. Horretarako, bi ikerketa eraman dira aurrera, donazio programatik

---

<sup>3</sup> **SEF:** *Sociedad Española de Fertilidad*

lortutakoa alde batetik, eta bestetik, *sibling* oozito metodoarekin, oozito autologoekin, alegia.

Emitza antzekoak lortuz gero, ebidentzia zientifikoa oinarri, etorkizun hurbilean oozitoak izozteko teknika pixkanaka normalizatzen joango litzateke, emakumeak euren ugalkortasuna preserbatzeko asmotan.

### **3. MATERIALAK eta METODOAK**

#### **3.1. IKERKETAREN DISEINUA ETA AZTERTUTAKO EMAITZAK**

Bi ikerketa obserbazional egin ziren, biak kohorteak, era erretrospektiboan. 2016-2017 urteen artean lagundutako ugalketan espezializatutako zentro pribatuko (*Reproducción Bilbao*) erregistroa aztertu zen.

Alde batetik, donazio programan lortutako oozitoak bi taldetan banatu ziren, oozito freskoak batetik, eta bestetik, bitrifikazioa jasan zutenak. Ondoren, haurdunaldia bilatzen zuten beste emakumeei transferitu zitzaizkien lortutako blastozistoak. Kasu honetan, beraz, emale talde bakoitzak (oozito freskoak eman zituenak vs bitrifikatuak eman zituenak) osatzen zuen kohorteetako bakoitza.

Beste alde batetik, *sibling*-oozitoekin egin zen ikerketa, oozito-metaketa programa<sup>4</sup> batean parte-hartutako pazienteen oozitoekin, alegia. Kasu honetan, oozitoak erauzitako pazienteei berauei transferitu zitzaizkien euren oozito propioekin lortutako blastozistoak, beraz, pazienteak barik, kasu honetan, oozito freskoak vs bitrifikatuak osatu zituzten kohorteak.

Aztertutako emaitza nagusiak fertilizazio-tasa, blastozisto garapen-tasa eta *ongoing* haurdunaldi-tasa/ transferentziako izan ziren. Gainera, oozito autologoen ikerketan datu horietaz gain, euploidia-tasa eta *ongoing* haurdunaldi-tasa/ pazienteko ere aztertu ziren.

---

<sup>4</sup> **Oozito metaketa programa:** Paziente bakoitzari estimulazio obariko bat baino gehiago eskaintzen zaio eta era honetan, oozito gehiago lor ditzakegu. Honi esker, IVF-ICSI prozesua jasotzeko oozito gehiago egongo lirakeke prest eta aukera gehiago oozito genetikoki normalak eta potentzialki transferigarriak lortzeko. [39]

### 3.1.1. Definizioak

- **Zikloa:** ICSI-IVF tratamendu osoa. Hau da, estimulazio obariko bat eta horretatik lortutako enbrioak (oozitoak erauzi, gorde- fresko/ bitrifikatu-, ICSI-IVF jasan) transferitu artekoa.
- **Fertilizazio-tasa:** Zigoto kantitatea/ IVF-ICSI jasandako MII oozito kopuruarekiko.
- **Blastozisto garapen-tasa:** Blastozisto<sup>5</sup> kopurua/ IVF-ICSI bidez lortutako enbrioi kopuru totalarekiko.
- **Euploidia-tasa:** Genetikoki normalak<sup>6</sup> diren blastozisto kantitatea/ IVF-ICSI bidez lortutako blastozisto kopuru totalarekiko.
- **Ongoing haurdunaldi-tasa:** Fertilizaziotik 12 astetik aurrera, bihotz-taupadak nabaritzen zaizkion fetu bat duen paziente kantitatea/ transferentzia kopuruarekiko edota transferentzia jaso duen paziente kopuruarekiko. Abortu-tasaren<sup>7</sup> osagarria.

### 3.2. PAZIENTEEN LAGINAREN EZAUGARRIAK ETA OOZITOEN ESLEIPENA

Lagundutako ugalkortasun-zentrora haurduntzeko asmoarekin joan ziren emakumeak sartu ziren bi ikerketen pazienteen laginean. Bi ikerketetan oozitoak jaso zituzten emakumeen antzutasun kausa nagusia adina izan zen, hau da, obulutegi erreserba urria.

Emileen programan, pazienteen laginean emileen oozitoak jasotzeko prest eta irizpideak betetzen zituzten emakumeak sartu ziren. Oozito bitrifikatuak jasoko zituen taldea eta freskoak jasoko zituenak konparagarriak zirela bermatu zen (adina, antzutasun arrazoi eta antzutasun-denbora...). Kasu honetan, emileen oozito freskoen

---

<sup>5</sup> **Blastozisto:** Enbrioia sortu eta 5-6 egunera, 200 zelula dituen. Egitura aldetik, kanpoko geruza dauka (trofoblastoa), barneko likidoa (blastozelea) eta barneko masa zelularra, zeinetatik fetua garatuko den.

<sup>6</sup> **Euploidia**=  $2n= 46$  kromosoma (zelula diploideak, bakoitzak 23 kromosomen 2 kopiekin, karga genetiko bikoitzarekin).

**Aneuploidia** kromosomen alterazio kuantitatiboari dagokio: kromosoma zehatz batean 2 kopia baino gutxiago/ gehiago dagoelako (adb. trisomia:  $2n+1= 47$ ).

<sup>7</sup>**Abortu-tasa:** 20 (bereziki 12) astetik behera huts egiten duten haurdunaldiak/ transferentzia kopuruarekiko edota transferentzia jaso duen paziente kopuruarekiko.

kopuru zehatza zegoen enbrioiak lortzeko (oozito freskoen kohortea), hauekin lortutako enbrioiak lagina osatzen zuten paziente batzuei transferitu zitzairen, gainerakoei, oozito bitrifikatuekin lortutakoak transferitu zitzaizkien (oozito bitrifikatuen kohortea). Oozito bitrifikatu zein freskoekin lortutako enbrioen esleipena ausazkoa izan zen, beraz.

Oozito autologo kasuan, donazio programan parte hartzeari uko egin edo oozitoak jasotzeko irizpideak betetzen ez zituzten pazienteak sartu ziren laginean, oozito erreserba baxua zutenak. Kasu honetan partaide guztiak euren artean ezaugarri komunak zituztela bermatu zen ere (gainera, kasu honetan, paziente berdinen oozitoak zirenez bai bitrifikatutakoak bai freskoak, konfusio-faktoreak hobeto kontrolatuta egongo ziren). Ikerketa honetan, pazientei oozitoak erauzi zitzaizkien lehenengo momentu batean, bitrifikatzeko (oozito bitrifikatuen kohortea). Gero, bigarren momentu batean, bideragarriak ziren oozitoen kopurua behatuta, horren baliokidea erauzi zitzairen paziente berdinei, oozito fresko moduan (oozito freskoen kohortea). Prozesu guztia jasan ondoren bideragarriak eta genetikoki kalitate onenekoak ziren blastozistoak bakarrik transferitu ziren, paziente bakoitzari zegozkionak.

Bi kasuetan *informatutako baimena* sinatu ostean eta *LOPD*<sup>8</sup> errespetatuz gauzatu ziren prozedimenduak.

### 3.3. TEKNIKA

#### 3.3.1. Estimulazio obarikoa, oozito erauzketa, denudazioa, oozitoen hautaketa

Kasu guztietan GnRH antagonista + gonadotrofina artifizialak (*Elonva*®<sup>9</sup> eta *Bemfola*®<sup>10</sup> edo *Puregon*®<sup>11</sup>) protokoloa erabili zen estimulazio obarikoa eta folikulu askoren garapena lortzeko (ez zen, beraz, LH edo giza jatorrizko gonadotropinarik erabili izan, hau erabiltzeak emaitzen hobekuntzarik ez dakarrela frogatu izan baita [51]).

<sup>8</sup> **LOPD:** *Ley Orgánica de Protección de Datos*.

<sup>9</sup> **Elonva®:** Korifolitropina alfa. FSH hormona eraldatua ingeniaritza genetikoaren bidez.

<sup>10</sup> **Bemfola®:** Folitropina alfa, GONAL-F ®ren baliokidea. FSH hormona eraldatua ingeniaritza genetikoaren bidez.

<sup>11</sup> **Puregon®:** Folitropina beta. FSH hormona eraldatua ingeniaritza genetikoaren bidez.

Obulazioa (triggerra) GnRH agonistekin eragin zen eta ondoren, oozitoak erauzi ziren ekografiaz gidatutako puntzio-folikularren bitartez.

Ondoren, denudazio prozesua eragin zitzaien, 1-2 ordu puntzioaren ostean, hialuronidasa inguru batean granulosa geruza erauzi eta oozitoaren morfologiari erreparatuta, II metafasean zeuden kalitate oneko oozitoak aukeratzeko (gainera, ICSI errazten du denudazioak).

Emaileen ikerketan, emakume bakoitzak ziklo bakarra jasan zuen, autologo kasuan, ordea, paziente bakoitzak ziklo bat baino gehiago jasan zuen.

### **3.3.2. Oozito bitrifikazioa eta berotze prozedura, ICSI**

*Cryotop*® (Kitazato, Biopharma) kit komertzialak erabili ziren oozitoak bitrifikatzeke, VT601 bitrifikazio medioaren bitartez, Kuwayamak proposatutako metodoari jarraituz, sistema irekia erabili zen honetarako.

Ondorengo izan zen bitrifikatzeke jarraitutako prozedura zehatza [37]:

1. Bitrifikazio medioa 37°C-tara berotu zen ordubetez, fluxu laminarreko kanpian (oinarrian zegoen berogailua itzalita egonda).
2. Petri plaka txiki batean BS oinarrizko soluzioaren 25µl-ko tanta bat utzi zen eta alboan ES oreka soluzioaren 25µl-ko tanta bi.
3. Bitrifikatuko ziren oozitoak (gehienez 9) aspiratu eta BS soluzioaren tantan utzi ziren.
4. ES soluzioa BS soluzioaren tantarekin nahastu zen eta oozitoak 3 minutuz utzi ziren.
5. Oozitoak BS soluziotik aspiratu eta ES soluzioaren lehenengo tantan utzi ziren, beste ES tantarekin nahastuz eta 3 minutuz utzi ziren.
6. ES soluzioaren 50µl-ko tanta bat utzi zen plakaren beheko partean eta oozitoak han utzi ziren, 9 minutuz.
7. Bitrifikazio plakan VS bitrifikazio soluzioaren 300µl utzi ziren, kikara bakoitzean (bi zeuden). Behin oreka lortuta, oozitoak petri plakatik aspiratu eta



bitrifikazio soluzioa zuen lehenengo kikaran (VS1) utzi ziren, soluzio honekin pipetaren bidez “ureztatuz” eta mugituz, 0,5 minutuz.

8. VS2 soluzioarekin oozitoak “ureztatu” ziren eta ondoren VS2dun (300µl) kikaran utzi ziren, hauek berriro “ureztatuz” eta mugituz, 0,5 minutuz.
9. Oozitoak deshidratatuta zeudenean, aspiratu eta *Cryotop* bakoitzean 3 oozito utzi ziren, soluzio soberakina aspiratuta. Ondoren, *Cryotop*-a nitrogenodun soluzioan sartu zen azkar lastotxo baten barruan eta hor utzi ziren gordeta (-23.000°C minutuko izoztuz).

Berotzeko prozedura, ordea, ondorengoa izan zen [37]:

1. TS berotze-soluzioa 37°C-tan berotu zen 1,5 orduz baino gehiagoz inkubadora batean eta mikroskopiopon utzi zen soluzioa. DS diluzio soluzioa eta WS garbiketa soluzioa giro-tenperaturan egon behar ziren bitartean (25-27°C).
2. Lastotxoa kontuz atera zen nitrogenu likidoan zegoen *Cryotop*-etik.
3. Mikroskopiopon zegoen TS soluziora lekualdatu zen lastotxoa eta oozitoa utzi zen bertan, minutu batez eta gero oozitoa aspiratu zen (+42.000°C/ minutuko berotuz).
4. DS soluzioari oozitoarekin pipetan zegoen TS soluzioa gehitu eta oozitoa utzi zen gero, 3 minutuz eta gero oozitoa aspiratu zen.
5. WS lehenengo soluzioari (WS1) oozitoarekin pipetan zegoen DS soluzioa gehitu eta oozitoa utzi zen gero, 5 minutuz eta gero oozitoa aspiratu zen.
6. WS bigarren soluzioari (WS2) oozitoarekin pipetan zegoen WS1 soluzioa gehitu eta oozitoa utzi zen gero plakaren azaleko (goiko) zatian, oozitoa oinarrira (beheko) zatira “jausi” zenean, prozesua errepikatu zen (oozitoa aspiratu eta soluzio berdinean utzi zen berriro).
7. Kultura medioan utzi ziren ondoren oozitoak eta 37°C-tan inkubatu ziren, 2 orduz.

Mikroinjekzio espermaticoa (ICSI) egiteko, espermatozoidea hautatu eta orratzaren bitartez aspiratu zen, gero, oozitoaren barruan txertatu eta ernalketa gertatzeko.

### 3.3.3. Blastozistoaren kalitatearen ebaluazioa, endometrioaren prestaketa eta transferentzia

2-3 eguneko enbrioiak transferitu beharrean, 5-6 eguneko blastozistoak<sup>12</sup> ebaluatu eta transferitu ziren, izan ere, ikusi da 3 eguneko enbrioiak mosaizismo-tasa<sup>13</sup> handiak erakusten dituzten bitartean, 5 eguneko blastozistoen tasa nabarmen txikiagoa dela [31]. Honela, bideragarriak izango ez ziren enbrioen inplantazioa saihestuko zen hein handi batean. Gainera, garapenaren egun honetan transferentzia eginez, haurdunaldi ektopikoen tasa txikiagoa dela ikusi da [49, 50].

Esan bezala, transferentziaren aurretik, inplantazio-aurreko baheketa genetiko (PGS<sup>14</sup>) egin zitzairen 5-6 eguneko blastozistoei, enbriologistak genetikoki ebaluatu eta egokiak zirenak (euploideak,  $2n=46$ ) transferentziarako aukeratzeko. Horretarako, garatzen zegoen blastozistoen trofoektodermoaren zeluletatik biopsia hartu zen eta euren konposizio genetiko aztertu zen, mikroarrai teknologia<sup>15</sup> erabilita. NGS<sup>16</sup> metodoa erabili zen genetikoki egokiak ziren ikusteko.

Endometrio blastozisto transferentziarako eta inplantaziorako prest egoteko, estradiol baleratoa eta progesterona mikronizatua erabili ziren.

Aukeratutako blastozistoak transferitu ziren baginan kateter estu bat sartuz eta enbrioiak umetokiko endometrioan utziz. Enbrioi bakarra transferitu zen pazienteko, hau da, enbrioi bat/ transferentziako<sup>17</sup>, horrela, emaitza zehatzagoak lortzeko eta haurdunaldi anizkoitzaren aukera eta ondoriozko konplikazioak saihestu zitezien. Gainera, ikerketa batzuetan [42] enbrioi bat baino gehiago eta nahastuta (oozito fresko

<sup>12</sup> 5 eguneko blastozistoekin emaitza hobekak ikusi dira [52].

<sup>13</sup> **Mozaizismoa:** Garatzen ari den enbrioi bakar batean lerro genetiko zelular bakar bat baino gehiago dagoenean. Horrela, lerro euploide (normala) zein aneuploidea (anormala) eduki dezake enbrioi batek.

<sup>14</sup> **PGS:** *Preimplantational Genetic Screening*. Betidanik enbrioen morfologia mikroskopikoari erreparatu izan zaio umetokirako transferentzia egiteko; baina ikusi da ebaluazio hau ez dela nahikoa enbrioen bideragarritasuna bermatzeko, klinika gehienetan %40ko inplantazio-tasa baino txikiagoa delarik. [31]

<sup>15</sup> **Mikroarrai teknologia:** Gene desberdinen edo genomaren zati handi baten espresioa aztertzeko erabiltzen da. Oinarri solido baten gainean DNA zati desberdinak uzten dira eta bakoitzaren hibridazioa (oinarri solidoaren gaineko mugimendua) sonda espezifikotik, itu-molekulararte aztertzen da, fluoreszentzia erabiliz.

<sup>16</sup> **NGS:** *Next Generation Sequencing*. Giza genoma osoa sekuentziatu dezake egun bakarrean.

<sup>17</sup> Espainian 14/2006 legeaz baimendutako gehiengoa 3 enbrioi/ transferentziakoa da, [27] baina zentro honetan enbrioi bakarra inplantatzeko estrategia jarraitzen da.

eta bitrifikatuetatik lortutakoak) transferitzen direnez, gero haurdunaldia gertatzekotan, ezin da jakin zein izan den aurrera egin duena.

### **3.4. METODO ESTADISTIKOA**

Emaitzak interpretatzerako orduan, pazienteen batez-besteko adina eta oozito-kopurua/ zikloko bi taldeen emaitzak konparagarriak zirela aztertu zen, emaitzetan aztertutako aldagaiez gain, bestelako konfusio-faktoreak ez zeudela berresteko.

Hipotesi nulua oozito fresko eta bitrifikatuen artean desberdintasun estatistikoki esanguratsurik ez zegoela zen eta alternatiboa, ordea, bazegoela. Aztertutako emaitzak estatistikoki esanguratsuak zirela berresteko eta ez ausaz aurki zitezkeenak, analisi estatistiko bi erabili ziren, IBM-SPSS software estatistikoa erabiliz. Alde batetik, aldagai kuantitatibo diskretuentzako- portzentajeak- (oozito kopurua/ zikloko, ernalkuntza-tasa, blastozistoen garapen-tasa, euploidia-tasa, *ongoing* haurdunalditasa/ transferentzia eta pazienteko) Pearsonen  $\chi^2$  testa erabili zen (Yates zuzenketarekin, laginaren tamaina txikia izan zelako) eta bestetik, aldagai kuantitatibo jarraientzako (pazienteen batez-besteko adina) t-student (lagin independenteetarako) analisi estatistikoa. Emaitzak estatistikoki esanguratsu bezala definitzeko,  $p < 0,05$ -koa izan behar zen.

## **4. EMAITZAK**

### **4.1. EMAILEEN OOZITOAK**

Donazio programan 123 ziklo ebaluatu ziren (oozito freskoekin 88 eta bitrifikatuekin 35). Emaileen oozitoak jaso zituzten pazienteen batez-besteko adina zein IVF-ICSI bidez zizatutako oozito kopurua ez ziren desberdinak izan bi taldeen artean (40 urte inguruko pazienteak izan ziren). Emaileen batez-besteko adina, ordea, oozito freskoen taldean 22,15 urtekoa zen eta bitrifikatuen taldean 22,78 urtekoa.

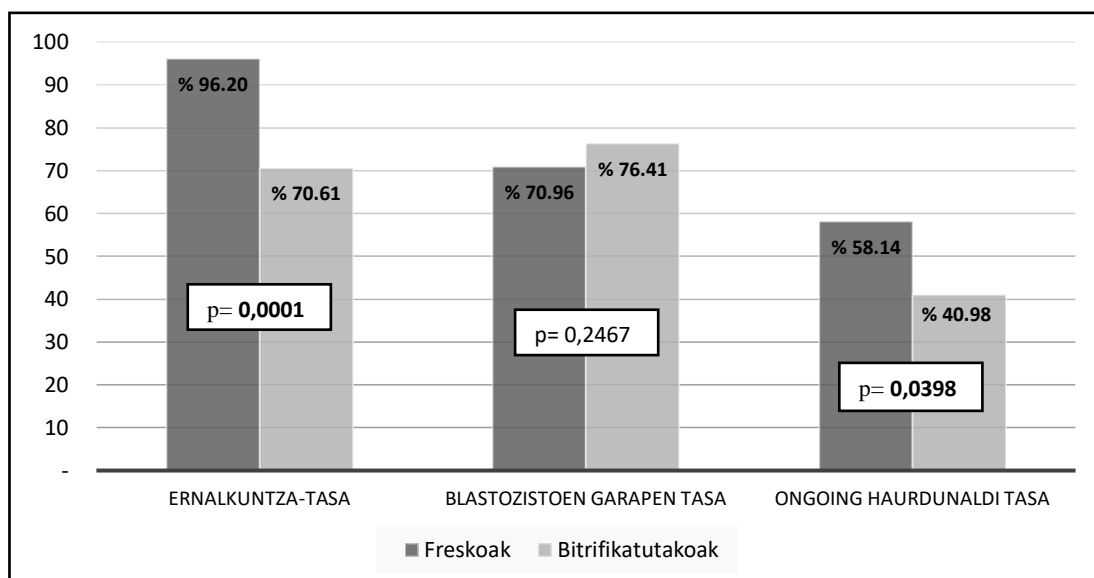
Ernalkuntza-tasa oozito freskoen taldean hobeak (%96,20 vs %70,61) izan zen eta desberdintasuna estatistikoki esanguratsua zela ikusi zen ( $p = 0,0001$ ).

Blastozistoen garapen-tasa, ordea, oozito bitrifikatuen taldean hobeak izan bazen ere, ez zen estatistikoki esanguratsua izan ( $p = 0,2467$ ).

Bestetik, *ongoing* haurdunaldi-tasa/ transferitutako blastozistoko, bi taldeetan guztira %52,63-koa izan zen. Freskoen taldean %58,14 izan zen bitartean, bitrifikatuen taldean %40,98 izan zen; desberdintasun hau estatistikoki esanguratsua izan zelarik ( $p=0,0398$ ). (Ikus **1. Taula**; **4. Irudia**)

	Oozito freskoak	Oozito bitrifikatuak	p balioa
<b>Ziklo kopurua</b>	88	35	
<b>Pazienteen batez-besteko adina</b>	40,40±3,27	39,93±5,76	0,3033
<b>Oozito kopurua</b>	953	295	
<b>Oozito kopurua/ ziklo</b>	10,83±1,01	8,34±0,96	0,0512
<b>Ernalkuntza-tasa</b>	%96,20	%70,61	<b>0,0001</b>
<b>Blastozisto garapen-tasa</b>	%70,96	%75,38	0,2467
<b>Ongoing haurdunaldi-tasa/ transferentzia</b>	%58,14	%40,98	<b>0,0398</b>

**1.Taula.** Emaleen oozitoekin (fresko vs bitrifikatuak) lortutako emaitzak.



**4.Irudia.** Emaleen oozitoekin (fresko vs bitrifikatuak) lortutako emalkuntza- eta blastozistoen garapen- eta ongoing-haurdunaldi tasa.

## 4.2. Oozito Autologoak

Kasu honetan, 47 pazientek hartu zuten parte, horietatik, oozito freskoekin lortutako blastozistoak 25 emakumeei transferitu zitzairen eta bitrifikatutako oozitoekin lortutakoak 12 emakumeei. Hau da, prozesu guztiaren ostean, 25 pazienteetan oozito freskoak ziren kalitate onenekoak eta beraz, transferrigarriak eta 12 pazienteetan, oozito bitrifikatuak izan ziren kalitate onenekoak. Gainerako 10 pazienteen kasuan, euren oozitoekin lortutako blastozistoen kalitate genetikoa ez zen batean ere ez ona izan, blastozisto transferrigarritzat hartzeko eta ezin izan zitzairen transferentziarik egin.

Batez-besteko adina 37,78 urtekoa izan zen. Guztira, 626 oozito (300 fresko eta 306 bitrifikatu) erabili ziren, pazienteko 13,32 batez-beste; zehatzago esanda, pazienteko batez-beste 6,81 oozito fresko bezala eta 6,51 bitrifikatuta gorde ziren.

Ernalkuntza-tasa zein blastozistoen garapen tasa oozito freskoetan hobea izan zen baina estatistikoki desberdintasun esanguratsua ez zela ikusi zen ( $p = 0,2509$ , bi kasuetan).

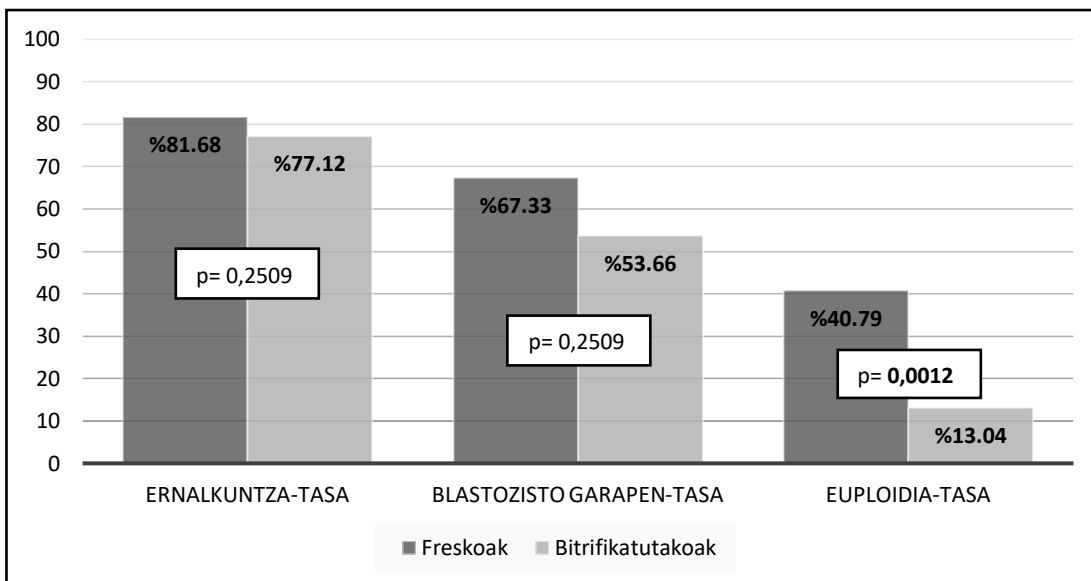
Bestetik, euploidia-tasa estatistikoki desberdina izan zen, oozito freskoen taldea genetikoki normalak ziren oozitoak %40,79 izan ziren bitartean, oozito bitrifikatuen taldean %13,04 izan zen ( $p = 0,0012$ ). (Ikus **2. Taula; 5. Irudia**)

*Ongoing* haurdunaldi-tasa/ transferitutako blastozistoko oro har %81,82 izan zen. Oozito freskoen artean %80koa (16/20) eta oozito bitrifikatuen artean %100ekoa (2/2), baina desberdintasun hau ez zen estatistikoki esanguratsua izan.

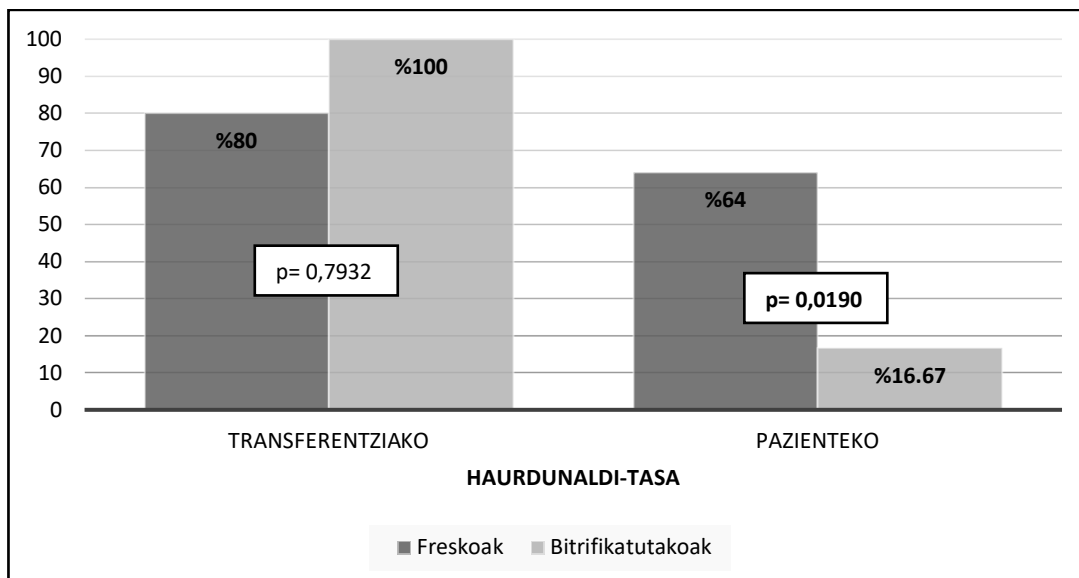
*Ongoing* haurdunaldi-tasa/ pazienteko, ordea, oozito freskoen taldean %64-koa izan zen eta bitrifikatutako oozitoen taldean %16,67koa eta bi taldeen arteko alde hau estatistikoki esanguratsua zela ondorioztatu zen ( $p = 0,0190$ ). (Ikus **2. Taula; 6. Irudia**).

	Oozito freskoak	Oozito bitrifikatuak	Guztira	p balioa
<b>Paziente kopurua</b>	47			
<b>Pazienteen batez-besteko adina</b>	37,78±2,77			
<b>Oozito kopurua</b>	320	306	626	
<b>Oozito kopurua/ ziklo</b>	6,81±0,91	6,51±0,99	13,32±0,65	0,343
<b>Ernalkuntza-tasa</b>	81,68%	77,12%	79,52%	0,2509
<b>Blastozisto garapen-tasa</b>	67,33%	53,66%	61,20%	0,2509
<b>Euploidia-tasa</b>	40,79%	13,04%	30,33%	<b>0,0012</b>
<b>Ongoing haurdunaldi-tasa/ transferentzia</b>	80,00%	100%	81,82%	0,7932
<b>Ongoing haurdunaldi-tasa/ paziente</b>	64,00%	16,67%	48,65%	<b>0,0190</b>

2.Taula. Oozito autologoekin (fresko vs bitrifikatuak) lortutako emaitzak.



5.Irudia. Oozito autologoekin (fresko vs bitrifikatuak) lortutako emalkuntza- eta blastozistoen garapen- eta euploidia-



**6.Irudia.** Oozito autologoekin (fresko vs bitrifikatuak) lortutako haurdunaldi- tasa (transferentziako eta pazienteko).

## 5. EZTABAIDA

### 5.1. EMAITZEN LABURPENA

Emaileen oozitoen artean, oozito freskoekin lortutako ernalkuntza- eta *ongoing* haurdunaldi-tasak/ transferentziako hobeak izan zirela ondorioztatu daiteke. Emaizta hauek ezin dira bata bestearen ondorio bezala ulertu. Izan ere, aztertutako haurdunaldi-tasa egindako transferentziako neurtu zen eta ez pazienteko, beraz, nahiz eta ernalkuntza-tasa oozito bitrifikatuen taldean txikiagoa izan eta blastozisto gutxiago transferitu talde horretako pazienteei, haurdunaldi-tasa ez zuen honengatik eraginik edukiko. Blastozisto garapen-tasa, ordea, bi taldetan antzekoa zela ondorioztatu zen.

Ikerketa honen emaitzak orain arteko donazio programako oozito fresko eta bitrifikatuen arteko emaitzak konparatzen badira, desberdinak direla ikusten da. Izan ere, ernalkuntza-tasa [42, 44] alderatutako bi taldeen artean estatistikoki desberdinak ez zirela ikusi da. *Ongoing* haurdunaldi-tasa/ transferentziako emaitzari dagokionez ere beste ikerketetan [36, 42, 43, 45], oozito fresko eta bitrifikatuen arteko emaitzak antzekoak zirela ikusi zen. Blastozistoen garapen tasa ezin izan zen beste ikerketekin konparatu, irakurritako bibliografian enbrioiak 2-3 egunean transferitzen zirelako eta ondorioz, ezin zelako aldagai hau aztertu.

Oozito autologoen kasuan, ordea, euploidia-tasa eta *ongoing* haurdunaldi-tasak/pazienteko hobeak zirela ikusi zen oozito freskoen taldean. Kasu honetan, bi datu hauek batera ulertu behar dira, izan ere, genetikoki kalitate onenekoak ziren oozitoak bakarrik transferitu zirenez, bitrifikatutako oozitoetatik lortutako blastozisto genetikoki normal gutxiago egon ziren eta honenbestez, gutxiago transferitu ziren eta haurdunaldi-tasa txikiagoa izan zen, halaberrez (kontuan izan behar da blastozisto aneuploideak transferitu izan baziren, etikoa ez izateaz gain, faktore hau izanik abortuen kausa garrantzitsuena, gehienetan haurdunaldi hauek ez zirela bideragarriak izango [40]). Ernalkuntza- eta *ongoing* haurdunaldi-tasak/ transferentziako, ordea, bi taldeetan antzekoak zirela ondorioztatu zen. Azpimarratu behar da *ongoing* haurdunaldi-tasen emaitzak aldatzen direla pazienteko edo transferentziako aztertzen badira; zikloa jasan duen paziente bakoitza aztertzean, ziklo hasieratik oozitoen prozesua aztertzen delako (prozesuaren faseren batean gal daitekezeela: biziraupen eskasagatik, ernalkuntza akatsengatik, aneuploidia arazoengatik...) eta transferentziako aztertzean, soilik enbrioi euploidea transferitutako momentutik.

Ikerketa honen emaitzak orain arte egindako ikerketa desberdinekin konparatuz [21, 22, 25, 26, 35], ernalkuntza-tasaren emaitzak berdinak zirela ikusi da, hau da, fresko zein bitrifikatutako oozitoen emaitzak antzekoak zirela. Blastozistoen garapen tasa kasu honetan ere, ezin izan zen beste ikerketekin konparatu, irakurritako bibliografian enbrioiak 2-3 egunean transferitzen zirelako eta ondorioz, ezin zelako aldagai hau aztertu.

Haurdunaldi-tasari dagokionez, ordea, ikerketa gehienek [23, 24, 35, 36] bi taldeen arteko haurdunaldi-tasa antzekoak zirela ondorioztatu zuten, nahiz eta gure ikerketan emaitzak estatistikoki desberdinak agertu.

Bereziki interesgarria den emaitza euploidia-tasa oozito freskoen taldean handiagoa izatea da. Izan ere, orain arteko ikerketek kontrako datuak adierazi dituzte, hau da, euploidia-tasak antzekoak zirela oozito fresko zein bitrifikatuen taldean [23, 39].

## **5.2. IKERKETAREN MUGAK**

Kontuan izan behar da bi ikerketa hauetan lagina txikia izan zela emaitzen programan 123 paziente (hartzaile) eta oozito autologoen kasuan 47 paziente, eta orokortu daitekeen ondorioz ezin daitekeela atera, bereziki haurdunaldi-tasari begira. Hala



ere, blastozistoa transferitu arte ikertu diren aldagaien kasuan, oozito kopuru handia ikertu da (1248 oozito emaileen ikerketan eta 626 autologoetan) eta emaitza horiek, beraz, esanguratsuagoak dira.

Bestalde, aldagai batzuk aztertu gabe geratu ziren: oozitoen biziraupen-tasa, adibidez. Hau bereziki garrantzitsua da oozito freskoak ez dutelako bere oreka osmotikoa kolokan jar dezakeen inolako prozesurik jasan behar. Emaileen ikerketan euploidia-tasa aztertu izana ere interesgarria izango litzateke.

Gainera, *ongoing* haurdunaldi-tasa aztertu bazen ere, haurdunaldi hauen jarraipenaren erregistroa ez zen ikerketan bildu (jaioberri bizien-tasa), nahiz eta zentroak egiten duen (zentroaren datuen arabera, %100eko jaioberri-bizien tasa lortu da momentuz, erditutako emakumeen artean). Datu hauek islatzea garrantzitsuak dira, bereziki adin nagusiarekin- 30 urtetik aurrera- (bi ikerketen laginean 38-40 urte) lotu baita jaioberri hildako-tasarik altuenak. [41]

Argitaratutako bibliografiaren eta gure emaitzen arteko aldea ikusita, metodologian edo emaitzen interpretatzeko momentuan zelako desberdintasunak egon daitezkeen aztertzea komeniko litzateke, ea faktore hauek eragin esanguratsua izan zezaketen emaitzetan eta desberdintasun hauek azal dezakeen hipotesiren bat formulatzeko, etorkizuneko ikerketak egiteari begira.

Azkenik eta aurreko puntuarekin lotua, garrantzitsuena dena, oozito fresko vs bitrifikatuen arteko emaitzak konparatzea eta ondorioak ateratzea lortu bada ere, ugalkortasuna preserbatzeko aplikazio klinikora begira beharrezkoa litzateke prozedimendu zehatz hori gauzatzea etorkizunean haurdundu nahi diren emakumeetan (gaztetan oozitoak erauzi eta emakume berak nagusiagoak direnean IVF-ICSI bidez haurdundu).

Izan ere, ikerketa bi hauek egin ziren parametroak ez ziren izan ugalkortasuna preserbatzera begirakoak, epe laburrean haurdunaldia lortzerakoak baizik: donazio programan emakume gazteen oozitoak erabili ziren arren, emakume desberdinei (nagusiagoei) egin zitzaaien lortutako blastozistoen transferentzia.

Oozito autologoen ikerketan, oozitoak erauzi eta IVF-ICSI jaso zuten arte ez zen denbora asko igaro, haurdunaldia zelako bilatzen zena (gainera jasotako oozitoen adina euren adinaren antzekoa zen).

Bi ikerketa hauen bitartez, beraz, ezin daiteke jakin nola eraman daitekeen aurrera haurdunaldia oozito gazte baina emakumea adin nagusiagoan haurduntzen denean (bere oozitoekin) edota bitrifikazioa denbora luzez oozitoen zelako biziraupen-tasa ekar dezakeen, nahiz eta emaitzak bitrifikatuta gordetako denboraren arabera aldatzen ez direla ikusi den [38].

Are gehiago, ikerketa hauekin frogatu da adin berdintsua zuten oozitoak jasotzean (emaileen oozito gazteak zein propio zaharragoak erabilia), oozito freskoen taldeak emaitza hobekak lortu zituela. Interesgarria litzateke frogatzea, ordea, emakume berdinean, nagusia denean bere oozito freskoekin edo bitrifikatutako bere oozito gazteekin emaitzak desberdinak ote diren.

### 5.3. ONDORIOAK

Oro har, bi ikerketetan oozito freskoekin bitrifikatuekin baino emaitza hobekak lortu dira eta horrenbestez, ikerketaren hipotesia ez da sostengatzen.

Bestetik, oozito autologoaren taldean aztertutako aneuploidia-tasa ikusirik eta hau haurdunaldiengan eduki dezakeen eragina jakinik [40], *screening* genetiko preinplantazionalaren garrantzia azalaratzen da. [31].

Gainera, gerora begira, ikerketa hauetatik ateratako datuei jarraiki, ugalkortasun-zentroen arteko emaitzak aztertzerako orduan kriterio berri bat kontuan izan behar dugu, oozitoen egoera (freskoa vs bitrifikatua): emaileen oozitoak jasotzen dituzten zentroek emaitza hobekak izango dituztela; izan ere, oozito hauek freskoan transferitzen dira. Emaileen oozitoak ez dituztenek, ordea, oozitoak erosi beharra dute eta hauek gordetzeko modu bakarra bitrifikatzea da (ezin dituzte fresko lortu) eta ondorioz, emaitzak ez dira hain onak izango.

Hala ere, kontuan hartu behar dira orain arte egindako ikerketen emaitzekin bat ez datozela eta ikerketa gehiagoren beharra dagoela oozitoen bitrifikazioa, ugalkortasuna preserbatzeko ezaugarriak dituzten pazienteen lagina eta metodologia erabiliz eta teknika egokitzat hautatzeko edo beste aukera eraginkorragoen inguruan ikertzeko (obulutegiaren ehunaren kriopreserbazioa, kasu). Ikerketa honekin bakarrik, beraz, adin berdina duten oozitoak jasotzen dituzten emakumeen artean egokiagoa dela

oozito freskoak erabiltzea ondorioztatu dezakegun arren, ezin dezakegu ezeztatu teknika egokia denik ugalkortasuna preserbatzeko.

Gaineratzeko, kontuan izan behar da ziklo hauek jasateak, haurdunaldi espontaneoekin alderatuta, badauzkala bere arriskuak: haurdunaldi ektopikoa, erditze aurreko hemorragia, alterazio kongenitoak, haurdunaldiaren hipertentsioa, mintzen alde aurreko haustura, zesarearen beharra, jaioberriaren pisu baxua eta txikia izatea bere adin gestazionalerako, hilkortasun perinatala, alde aurreko erditzea (preterminoa), diabete gestazionala, besteak beste [47, 48].

Aurreko puntuarekin jarraituz eta bukatzeko, medikuntzaren eremutik haratago doan arazo bat izanda ama adindunena, lagundutako ugalkortasun-teknikekin konponbide posibleak aurki daitezkeen arren, emakumeak adin idealean haurduntzeko eta umeak izateko erosotasun sozioekonomikoa edukitzea izango zen hausnartu beharreko gakoetako bat. Arazo honi, beraz, zientzia arlotik ez ezik, erabaki politikoetatik ere heldu behar zaiola kontuan hartu behar da (laneko baja luzeagoa/ soldata murrizketarik gabeko lanaldi-partziala, hartzaindegi gehiago eta merkeagoak...) [5].

## 6. BIBLIOGRAFIA:

1. Euskal AEko bizirik jaioak, lurralde historiko, amaren adina eta jaiotza-ordenaren arabera-PX-Web [Internet]. PX-Web. Eskuragarri: [http://eu.eustat.eus/bankupx/pxweb/eu/euskara/-/PX\\_2217\\_enac02.px/table/tableViewLayout1/?rxid=7100bc49-30cc-4434-bcda-6f5c0b5be68d#axzz53WTrHaME](http://eu.eustat.eus/bankupx/pxweb/eu/euskara/-/PX_2217_enac02.px/table/tableViewLayout1/?rxid=7100bc49-30cc-4434-bcda-6f5c0b5be68d#axzz53WTrHaME)
2. Euskal AEko jaiotza-tasa 28-EBko batez bestekoaren oso azpitik da [Internet]. Eu.eustat.eus. Eskuragarri: [http://eu.eustat.eus/elementos/ele0014300/ti\\_Euskal\\_AEko\\_jaiotza-tasa\\_28-EBko\\_batez\\_beste\\_oso\\_azpitik\\_da/not0014325\\_e.html](http://eu.eustat.eus/elementos/ele0014300/ti_Euskal_AEko_jaiotza-tasa_28-EBko_batez_beste_oso_azpitik_da/not0014325_e.html)
3. 40 urte eta gehiagoko emakumeengandik bizirik jaiotako seme-alaben batezbesteko kopurua bizi-eskualdeko, jaioturtearen arabera. Euskal AE. 2006 [Internet]. Eu.eustat.eus. Eskuragarri: [http://eu.eustat.eus/elementos/ele0007900/ti\\_4\\_NUMERO\\_MEDIO\\_DE\\_HIJOS\\_NACIDOS\\_VIVOS\\_DE\\_MUJERES\\_DE\\_40\\_Y\\_MAS\\_AOS\\_POR\\_LA\\_COM\\_ARCA\\_DE\\_RESIDENCIA\\_SEGUN\\_EL\\_AO\\_DE\\_NACIMIENTO\\_CA\\_de\\_Euskadi\\_2006/tb10007969\\_e.html](http://eu.eustat.eus/elementos/ele0007900/ti_4_NUMERO_MEDIO_DE_HIJOS_NACIDOS_VIVOS_DE_MUJERES_DE_40_Y_MAS_AOS_POR_LA_COM_ARCA_DE_RESIDENCIA_SEGUN_EL_AO_DE_NACIMIENTO_CA_de_Euskadi_2006/tb10007969_e.html)
4. 15-40 urteko emakumeek aurreikusitako batez besteko seme-alaba kopurua eta aurreikusitako eta edukitako seme-alaba kopuruen arteko batez besteko aldea, belaunaldika. 2011 [Internet]. Eu.eustat.eus. Eskuragarri: [http://eu.eustat.eus/elementos/ele0000000/ti\\_Numero\\_medio\\_de\\_hijosas\\_previstas\\_y\\_diferencia\\_media\\_entre\\_el\\_numero\\_de\\_hijosas\\_previstas\\_y\\_habidosas\\_de\\_mujeres\\_de\\_15\\_a\\_40\\_años\\_por\\_generación\\_2011/tb10000046\\_e.html](http://eu.eustat.eus/elementos/ele0000000/ti_Numero_medio_de_hijosas_previstas_y_diferencia_media_entre_el_numero_de_hijosas_previstas_y_habidosas_de_mujeres_de_15_a_40_años_por_generación_2011/tb10000046_e.html)
5. Sampedro R, Gómez M, Montero M. Maternidad tardía: incidencia, perfiles y discursos. EMPIRIA Revista de metodología de ciencias sociales. 2002;(5):11-36.
6. Maroto-Navarro G, del Mar García-Calvente M, Mateo-Rodríguez I. El reto de la maternidad en España: dificultades sociales y sanitarias. Gaceta Sanitaria. 2004;18(2):13-23.
7. Findekle S, Lotz L, Heusinger K, Hoffmann I, Dittrich R, Beckmann M. Fertility Protection in Female Oncology Patients: How Should Patients Be Counseled? Geburtshilfe und Frauenheilkunde. 2015;75(12):1243-1249.
8. Guía 27 (SEF-SEGO), Técnicas de preservación de la fertilidad [PDF] Eskuragarri: <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/guiasPracticasClinicas/guia27.pdf>
9. Criopreservación de gametos propios (Preservación de la Fertilidad sin indicación médica) [PDF] Eskuragarri: <http://www.sefertilidad.net/docs/grupos/preservacion/info-profesionales-gpreservacion-sef.pdf>
10. Gook D. History of oocyte cryopreservation. Reproductive BioMedicine Online. 2011;23(3):281-289.
11. Marina S, Mar Marina S, Marina F. Congelación de ovocitos para reproducción asistida: Revisión. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 2002; 19(1):59-68.

12. Jain J, Paulson R. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006;86(4):1037-1046.
13. Martinez F. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Fertil Steril*, 2017; 108: 407-15.
14. Marcadores de reserva folicular [PDF] Eskuragarri:  
[http://www.hvn.es/servicios\\_asistenciales/ginecologia\\_y\\_obstetricia/ficheros/curso2011\\_reprod\\_02\\_marcadores\\_reserva\\_folicular.pdf](http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/curso2011_reprod_02_marcadores_reserva_folicular.pdf)
15. Gardner D, Sheehan C, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman M. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007;67(1):64-72.
16. Bianchi V, Macchiarelli G, Borini A, Lappi M, Cecconi S, Miglietta S *et al*. Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):110.
17. Nagy Z, Anderson R, Feinberg E, Hayward B, Mahony M. The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) Registry: evaluation of cryopreservation techniques and oocyte source on outcomes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2017;15(1).
18. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera A, Kaser D, Ubaldi F *et al*. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update*. 2016.
19. Cil A, Bang H, Oktay K. Age-specific probability of live birth with oocyte cryopreservation: an individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril*.. 2013;100(2):492-499.e3.
20. Li Z, Wang Y, Ledger W, Edgar D, Sullivan E. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Human Reproduction*. 2014;29(12):2794-2801.
21. Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E *et al*. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Human Reproduction*. 2009;25(1):66-73.
22. Parmegiani L, Cognigni G, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante F. *et al*. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. 2011;23(4):505-512.
23. Forman E, Li X, Ferry K, Scott K, Treff N, Scott R. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril*. 2012;98(3):644-649.
24. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007;14(1):72-79.

25. Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, Baroni E, Albricci L, Colamaria S. *et al.* Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Human Reproduction*. 2010;25(5):1199-1205.
26. Chang C, Elliott T, Wright G, Shapiro D, Toledo A. *et al.* Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1891-1897.
27. Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. (Boletín Oficial del Estado, número 126, de 27 de mayo de 2006)
28. Registro Nacional de Actividad 2015-Registro SEF [PDF] Eskuragarri:  
[http://www.cnrha.msssi.gob.es/registros/pdf/Informe\\_Global\\_Registro\\_actividad\\_2015.pdf](http://www.cnrha.msssi.gob.es/registros/pdf/Informe_Global_Registro_actividad_2015.pdf)
29. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;99(1):156-162.
30. Wirleitner B, Schuff M, Stecher A, Murtinger M, Vanderzwalmen P. Pregnancy and birth outcomes following fresh or vitrified embryo transfer according to blastocyst morphology and expansion stage, and culturing strategy for delayed development. *Human Reproduction*. 2016;31(8):1685-1695.
31. Brezina P, Ke R, Kutteh W. Preimplantation Genetic Screening: A Practical Guide. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*. 2013;7: CMRH.S10852.
32. Cobo, A., Diaz, C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*, 2011; 96(2): 277-285.
33. Potdar N, Gelbaya T, Nardo L. Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014;29(2):159-176.
34. Oktay K, Cil A, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006;86(1):70-80.
35. Almodin C, Minguetti-Camara V, Paixao C, Pereira P. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Human Reproduction*. 2010;25(5):1192-1198.
36. Crawford S, Boulet S, Kawwass J, Jamieson D, Kissin D. Cryopreserved oocyte versus fresh oocyte assisted reproductive technology cycles, United States, 2013. *Fertil Steril*. 2017;107(1):110-118.
37. Cryotop Safety Kit (Vitrification Protocol for Cryotop® Method) [PDF]
38. Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohí J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertil Steril*. 2015; 104(6):1426-1434

39. Chamayou S, Sicali M, Alecci C, Ragolia C, Liprino A, Nibali D. *et al.* The accumulation of vitrified oocytes is a strategy to increase the number of euploid available blastocysts for transfer after preimplantation genetic testing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017;34(4):479-486.
40. Ma Y, Jia C, Wang L, Lan Y, Song R, Zhou L. Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors. *Chinese Medical Journal*. 2015;128(20):2772.
41. Andersen A. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*. 2000;320(7251):1708-1712.
42. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1657-1664.
43. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction*. 2010;25(9):2239-2246.
44. Garcia J, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Human Reproduction*. 2011;26(4):782-790.
45. Trokoudes K, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril*. 2011;95(6):1996-2000.
46. Kumar P, Sharma A, Sait S, Kumar M. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2011;4(2):70.
47. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*. 2012;18(5):485-503.
48. Palomba S, Homburg R, Santagni S, La Sala G, Orvieto R. Risk of adverse pregnancy and perinatal outcomes after high technology infertility treatment: a comprehensive systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2016;14(1).
49. Milki A, Jun S. Ectopic pregnancy rates with day 3 versus day 5 embryo transfer: a retrospective analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2003;3(1).
50. Zhang B, Cui L, Tang R, Ding L, Yan L, Chen Z. Reduced Ectopic Pregnancy Rate on Day 5 Embryo Transfer Compared with Day 3: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2017;12(1): e0169837.
51. G. Barrenetxea, A. López de Larruzea, T. Ganzábal, R. Jiménez, K. Carbonero, M. Mandiola. Blastocyst transfer alter repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril*; 2005;83(1): 49-53.
52. G. Barrenetxea, JA Agirregoikoa, MR Jimenez, A López de Larruzea, T Ganzábal, K Carbonero. Ovarian response and pregnancy outcome in poor-responder women: a randomized controlled trial on the effect of luteinizing hormone supplementation on in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2008;89(3): 546-53.