



Universidad Autónoma
de Madrid

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

-TESIS DOCTORAL -

**SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS): DESARROLLO,
VALIDACIÓN Y APLICABILIDAD EN EL
DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL
(DGP)**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

ÁLVARO GÓMEZ DURO

Directora

Dra. ESTHER FERNÁNDEZ GARCÍA

Tutor académico

Dr. CARLOS GARCÍA DE LA VEGA

Madrid, 2018



*“Me he dedicado a investigar la vida y
no sé por qué ni para qué existe”*

Severo Ochoa

*“Trabajando en los detalles más pequeños
que pueden dar una gran vida”*

Álvaro Gómez

Agradecimientos

No me permito comenzar este agradecimiento, sin nombrar a la persona que me ha dado la oportunidad de crecer y formarme científica, profesional y personalmente en el apasionante campo de la Genética. Recuerdo mi primer día en este laboratorio, parece que han pasado unos meses...y echando la vista atrás veo el camino recorrido...prácticamente diez años trabajando codo a codo, formando parte de este equipo que dirige, y trabajando para la consecución de los objetivos. Gracias por tus conocimientos, tus sugerencias, tu visión constructiva y tus críticas sin los cuales nada de esto habría sido posible. GRACIAS Dra. Esther Fernández.

Al Dr. Carlos García de la Vega, por sus lecturas, sus críticas, sus opiniones, sus versiones de los "hechos" y por "darme caña al castellano". Gracias por tus ánimos: ánimo..., ya queda menos..., ya no queda nada..., ánimo que no queda, ahora sí, nada....Gracias Carlos.

Gracias a todos los que en un pasado formasteis parte de este equipo, de esta familia, y de los cuales aprendí muchísimo, vivimos grandes momentos y no solo fuisteis compañeros de trabajo... gracias Paula, Elisa, Xavi, Herminio, Estela, Edu...

A mis padres, por haberme enseñado los valores del esfuerzo, del trabajo y la constancia, y haberme proporcionado la mejor educación y lecciones de vida. Sois un ejemplo a seguir.

A mi hermanas, por estar ahí, por su cariño y comprensión.

A mis sobrinos, que son una fuente de energía y alegría y a su lado "todo se olvida".

A mi novia, por sus ánimos, por su apoyo, por sus palabras y actos, por ser el motor que mueve este engranaje, y como no por su paciencia (especialmente en el último mes...), gracias.

Gracias al equipo actual de Geniality...Emilio, Lidón, Esperanza, Vero, por su trabajo diario incondicional, por su profesionalidad, y por haberme cubierto en esos días... espero no haberos "enmarronado" mucho.

A mi familia, amigos y a todas esas personas que de un modo u otro han contribuido a mi formación y han estado ahí, aportando su granito de arena, gracias.

Simplemente....gracias

ÍNDICE

I. RESUMEN	12
II. INTRODUCCIÓN	14
II.1. Técnicas de reproducción asistida y Test genético preimplantacional.	14
II.2. Test genético preimplantacional.	16
II.2.1. Concepto y antecedentes.	16
II.2.2. Etapas del Proceso del Test Genético Preimplantacional.	27
II.2.2.1. Consulta de asesoramiento genético y reproductivo.	27
II.2.2.2. Enfermedades monogénicas	28
II.2.2.2.1. Herencia Autosómica Dominante	29
II.2.2.2.2. Herencia Autosómica Recesiva.	30
II.2.2.2.3. Herencia Ligada a los cromosomas sexuales.	30
II.2.2.3. Anomalías cromosómicas.	31
II.2.2.3.1. Anomalías cromosómicas estructurales.	32
II.2.2.3.2. Anomalías cromosómicas numéricas.	35
II.2.2.4. Ciclo de fecundación <i>in vitro</i> .	39
II.2.2.5. Biopsia embrionaria.	39
II.2.2.6. Análisis genético.	41
II.2.2.6.1. Análisis genético de enfermedades monogénicas.	41
II.2.2.6.2. Análisis genético de anomalías numéricas y estructurales.	43
II.2.2.6.3. Mosaicismo Cromosómico.	44
II.2.3. Fiabilidad del Test genético Preimplantacional: error de diagnóstico.	47
II.3. Aspectos legales y bioéticos del TGP.	49
III. OBJETIVOS	54
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	57
IV.1. Material	57
IV.1.1. Validación de NGS en línea celular.	57
IV.1.2. Validación de NGS en los casos de TGP-A	57
IV.1.3. Validación de NGS en los casos de TGP-SR	57
IV.1.4. Enfermedades monogénicas mediante PCR clásica	59
IV.1.5. Test genético preimplantacional combinado, COMB-TGP.	59
IV.1.6. TGP en enfermedades monogénicas más frecuentes: Eficiencia de amplificación, tasa de Fallo de Amplificación y tasa de Allele Drop-Out (ADO).	59
IV.2. Metodología del TGP-A y TGP-SR	60
IV.2.1. Cultivo de línea celular	60
IV.2.2. Aislamiento de células cultivadas	60
IV.2.3. Extracción de ADN y "array"-CGH de oligos 44K.	61
IV.2.4. Lisis celular y amplificación de genoma completo	61
IV.2.5. Gel de electroforesis	62
IV.2.6. "Array"-CGH 24 sure v3	62
IV.2.6.1. Apertura del caso y elaboración de la plantilla de hibridación.	62
IV.2.6.2. Marcaje de las muestras	63
IV.2.6.3. Combinación y precipitación de las muestras.	64
IV.2.6.4. Hibridación, lavados y escaneo.	64
IV.2.6.5. Lectura e interpretación de los resultados	66
IV.2.7. "Array"-CGH 24 sure +	67
IV.2.8. Secuenciación Masiva (NGS)	67

IV.2.9.	Clasificación cromosómica de embriones analizados por “array”-CGH 24 surev3, “array”-CGH 24 sure+ y NGS	71
IV.2.10.	Evaluación de la sensibilidad y especificidad para NGS	73
IV.3.	METODOLOGÍA TGP-M	73
IV.3.1.	Estudio de validación e informatividad	74
IV.3.1.1.	Búsqueda y diseño de cebadores para el estudio de STR y mutaciones.	74
IV.3.1.1.1.	Búsqueda de STRs y elaboración del mapa cromosómico	74
IV.3.1.1.2.	Búsqueda de Mutaciones	76
IV.3.1.1.3.	Diseño de Cebadores para amplificación de STRs y mutaciones.	76
IV.3.1.2.	Aislamiento de ADN genómico a partir de sangre periférica	79
IV.3.1.3.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	79
IV.3.1.4.	Pre-minisequenciación	80
IV.3.1.5.	Minisequenciación	80
IV.3.1.6.	Análisis de fragmentos y mutaciones puntuales	81
IV.3.1.7.	Análisis de resultados y elaboración de árbol genealógico.	81
IV.3.2.	TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE ENFERMEDADES MONOGENICAS	83
IV.3.2.1.	Lisis celular y amplificación de genoma completo	83
IV.3.2.2.	PCR sobre los productos de MDA (STRs y mutaciones)	83
IV.3.3.	Test Genético Preimplantacional combinado: enfermedades monogénicas y screening de aneuploidías o alteraciones cromosómicas estructurales.	85
V.	RESULTADOS	88
V.1.	Primera Fase: Resultados de la Validación:	89
V.1.1.	Tipificación mediante “array”-CGH de oligos y NGS de la línea celular (GM50159).	89
V.1.2.	Análisis comparativo mediante NGS de muestras amplificadas con “Sureplex” y “Genomiphi”	91
V.1.3.	Rebiopsia y reanálisis de muestra de trofoectodermo.	92
V.1.4.	Validación del NGS para TGP de aneuploidías.	93
V.1.5.	Validación del NGS para alteraciones cromosómicas estructurales	97
V.2.	Segunda fase: Análisis de los resultados clínicos obtenidos.	101
V.2.1.	Resultados de los ciclos de TGP-A y TGP-SR realizados mediante NGS tras la validación en el periodo de 2017-2018.	101
V.2.1.1.	Resultados de los ciclos de TGP-A	101
V.2.1.2.	Resultados de los ciclos de TGP-SR	102
V.2.2.	Resultados los ciclos del Test Genético Preimplantacional en parejas portadoras de alteraciones cromosómicas estructurales y parejas portadoras de enfermedades monogénicas.	103
V.2.2.1.	Análisis de los resultados obtenidos mediante “array”-CGH en pacientes portadores de alteraciones cromosómicas estructurales en equilibrio en el período 2011-2017	104
V.2.2.2.	Estandarización de enfermedades monogénicas mediante PCR clásica.	107
V.2.2.4.	COMB-TGP	112
V.2.2.5.	TGP en enfermedades monogénicas más frecuentes: Eficiencia de amplificación, tasa de Fallo de amplificación y tasa de Allele Drop-Out (ADO).	113
VI.	DISCUSIÓN	118
VII.	CONCLUSIONES	130
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	132
IX.	ANEXOS	150

Abreviaturas

μl	microlitro
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADO	allele drop-out
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
ASRM	Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
ATM	Amplicon Tagmentation Mixture
BACs	Cromosoma artificial bacteriano
CCS	Comprehensive Chromosome Screening
CGH	Hibridación genómica comparada
CNRHA	Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida
CNV	Variación de número de copia
CP	Corpúsculo polar
ddNTPs	Dideoxinucleótido trifosfato
DOP-PCR	Degenerated Oligonucleotide Primed PCR
DP	Diagnóstico prenatal
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
GiGR	Grupo de Interés en Genética y Reproducción
GWAS	Genome-Wide Association Study
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
LNA1	Tampón de normalización
LNB1	Partículas de normalización
MCI	Masa celular interna
MDA	Multiple Displacement Amplification
MPS	Secuenciación masiva paralela
ng	Nanogramo
NGS	Secuenciación de próxima generación
NPM	Nextera PCR Master Mix
NT	Tampón de neutralización
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Primer extension PCR
PGDIS	Sociedad Internacional sobre DGP
PGM	Personal Genome Machine
PMT	tubo fotomultiplicador
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RCOG	Real Colegio de Obstetras y Ginecólogos
rpm	Revoluciones por minuto
SAV	Visor de análisis de secuenciación
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
STRs	Short Tandem Repeat

TD	Tagmentación de ADN
TEC	Transferencia de embriones congelados
TGP	Test genético preimplantacional
TGP-A	Test genético preimplantacional aneuploidías
TGP-M	Test genético preimplantacional de enfermedades monogénicas
TGP-SR	Test genético preimplantacional alteraciones cromosómicas estructurales
TRA	Técnicas de reproducción asistida
UK NEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment Services
WGA	Amplificación del genoma completo
ZP	Zona pelúcida

I. RESUMEN

El Test Genético Preimplantacional (TGP) es el estudio de la información genética de un embrión obtenido mediante técnicas de reproducción asistida, fecundación *in vitro* con inyección intracitoplasmática y biopsia embrionaria, para seleccionar aquellos embriones cromosómicamente normales o libres de desórdenes genéticos heredados antes de la transferencia al útero materno. Está englobado dentro de la medicina preventiva y es un método de diagnóstico que surge gracias a los avances en las técnicas de reproducción asistida como la biopsia embrionaria en estadio temprano de división (blastómero) o en estadio de blastocisto (trofoectodermo). Sobre esas muestras se pueden aplicar técnicas de análisis cromosómico y molecular para poner de manifiesto posibles alteraciones genéticas y cromosómicas en el embrión y con anterioridad a su posible implantación.

El objeto fundamental de esta tesis doctoral ha sido validar un protocolo de Secuenciación Masiva (NGS) aplicado al TGP de “screening” de aneuploidías (TGP-A) y alteraciones cromosómicas estructurales (TGP-SR) para el análisis de blastómeros y trofoectodermo. Además, se ha desarrollado de un protocolo de análisis estandarizado mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa para TGP para su aplicación a distintas enfermedades monogénicas (TGP-M) y para los casos de análisis de enfermedad monogénica y complemento cromosómico (COMB-TGP).

Los resultados obtenidos confirman que la secuenciación masiva es una técnica robusta, de alto rendimiento y lista para su aplicación clínica en el campo de la genética reproductiva. Permite detectar con altísima fiabilidad tanto aneuploidías, desequilibrios cromosómicos como mosaicismo. El protocolo desarrollado para el TGP-M permite identificar en un embrión cualquier enfermedad monogénica cuyo gen esté identificado y además analizar su complemento cromosómico.

II. Introducción

II. INTRODUCCIÓN

II.1. Técnicas de reproducción asistida y Test genético preimplantacional.

Uno de los principales problemas de salud presentes en la actualidad, es el relacionado con la infertilidad y la esterilidad. Hacemos referencia a la esterilidad como la incapacidad para concebir, no se consigue una gestación; y a la infertilidad como la imposibilidad para finalizar la gestación con el nacimiento de un descendiente sano.

Los cambios en los actuales estilos de vida (el retraso en la edad de maternidad, por ejemplo), así como factores ambientales (la contaminación, entre otros) están provocando que cada vez haya más casos de esterilidad y que la calidad ovárica y seminal esté descendiendo (Kupka et al., 2014).

En los países occidentales la esterilidad afecta al 15% de la población en edad reproductiva, es decir, a una de cada seis parejas, y experimenta una evolución creciente. La edad avanzada de las mujeres con deseo reproductivo, puede considerarse como la principal causa actual de incremento de la esterilidad en nuestro medio, aunque el varón es responsable de entre el 25 al 35% de los casos (Stouffs et al., 2014).

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) como la fecundación *in vitro* (FIV), y las técnicas de micromanipulación, como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se emplean para solventar los problemas de esterilidad.

Desde la primera niña concebida mediante fecundación *in vitro* en 1978, en su momento llamada “bebé probeta”, en todo el mundo y gracias a los importantes avances en las TRA, han nacido cientos de miles de niños y esta cifra aumenta año tras año.

A primeros de los años 90 del siglo pasado, nace dentro de los laboratorios de reproducción asistida, el test genético preimplantacional (TGP), un área especializada del diagnóstico genético relativamente joven. El TGP se engloba dentro de la medicina preventiva y permite analizar los embriones obtenidos mediante fecundación *in vitro* (FIV), en busca de alteraciones cromosómicas o enfermedades genéticas graves, seleccionando aquellos embriones sanos o cromosómicamente normales, antes de la transferencia al útero materno y por tanto, antes de que se haya producido la implantación. Esta técnica representa para las parejas portadoras de alteraciones genéticas graves, la única alternativa a la interrupción del embarazo después de un Diagnóstico Prenatal (DP) de feto afecto.

El Test genético preimplantacional puede ser:

- Preconcepcional: consiste en el análisis genético o cromosómico del ovocito (primer o segundo corpúsculo polar) antes de que este sea inseminado. La desventaja es que solo nos da la mitad de información del embrión, faltando la información genética correspondiente al espermatozoide.
- Preimplantacional: consiste en el análisis genético o cromosómico del embrión, (blastómero o trofoectodermo), antes de ser transferido al útero materno, y por tanto antes de su implantación.

En 1990 se publica el primer embarazo obtenido mediante TGP, en una pareja portadora de enfermedad ligada al sexo (Handyside et al., 1990). Desde entonces esta tecnología, utilizada por primera vez para seleccionar el sexo del embrión, ha ido ampliando sus indicaciones tanto en enfermedades monogénicas (TGP-M) como anomalías cromosómicas estructurales, (translocaciones, inversiones) (TGP-SR), siendo una técnica consolidada y de aplicación rutinaria en muchos centros de Reproducción Asistida, donde esta técnica es especialmente importante debido a la frecuente asociación entre la esterilidad y los factores genéticos.

Uno de los aspectos diferenciales del TGP, son aquellas indicaciones que nunca habían sido contempladas en el Diagnóstico Prenatal (DP) y que debido a las características de la técnica pueden ser defendidas desde un punto de vista ético. La aplicación del TGP en enfermedades como la Enfermedad de Huntington donde puede aplicarse en pacientes presintomáticos, o incluso en pacientes que deciden no conocer su status genético, mediante el test de exclusión, abren la puerta a otras enfermedades de aparición tardía como el Alzheimer, o pacientes portadores de genes con predisposición al cáncer (BRCA1, BRCA2) (Goossens et al., 2008), así como el TGP que implica la selección de embriones de acuerdo a su HLA, de manera que los niños nacidos de estos ciclos de TGP pueden ser donantes de células madres para su hermano enfermo (Verlinsky et al., 2001).

El TGP tiene en la actualidad retos a los que enfrentarse como es el diagnóstico de enfermedades mitocondriales. Se han intentado un número limitado de casos, debido a la dificultad de predecir la carga de mutación en el embrión (depleción mitocondrial) y su efecto clínico (Bredenoord et al., 2008). No ha sido hasta 2015, cuando el Reino Unido dio el primer paso para la aprobación de la transferencia mitocondrial como técnica terapéutica, terapia de reemplazo mitocondrial (MRT), esta técnica, permite el reemplazo casi completo del citoplasma del óvulo / embrión, eliminando la transmisión de mitocondrias defectuosas no deseadas (ADN mitocondrial mutado: ADNmt) en pacientes con enfermedades mitocondriales hereditarias (Tachibana et al., 2018; Wolf et al., 2015).

El TGP también es una herramienta muy útil para las parejas que, sin problemas genéticos conocidos, tienen dificultad para la concepción por vía natural y no consiguen el embarazo deseado tras fecundación *in vitro*. Estas parejas se derivan a TGP para estudio genético de alteraciones cromosómicas numéricas o “screening” de aneuploidías (TGP-A) en los embriones, ya que se presume que existe alguna alteración genética en el embrión que puede comprometer su viabilidad. En estos casos el TGP-A tiene como fin, incrementar las tasas de implantación, reducir el riesgo de aborto espontáneo y evitar el embarazo de un feto aneuploide.

Las indicaciones para el TGP-A incluyen: edad materna avanzada (≥ 38 años); fallos repetidos de implantación (≥ 3 fallos previos); parejas con abortos recurrentes de causa desconocida (> 2 abortos previos); factor masculino severo.

La mayor parte de las aneuploidías que se detectan en los embriones son de origen materno debidas a errores en la meiosis de la gametogénesis. Estos errores aumentan con la edad materna (Capalbo et al., 2013a; Franasiak et al., 2014; Rabinowitz et al., 2012), por

tanto la principal indicación del Test Genético Preimplantacional de Aneuploidías, sería la edad materna avanzada sin olvidar el resto de indicaciones.

El análisis de las alteraciones genéticas y cromosómicas del embrión antes de la implantación se hace posible gracias al uso de diversas estrategias: Las técnicas de Fecundación *in vitro* con las técnicas de micromanipulación que permiten realizar la biopsia embrionaria en estadio temprano de división (blastómero) (Tarin y Handyside, 1993) o en estadio de blastocisto (trofoectodermo) (Kokkali et al., 2005; McArthur et al., 2005), hasta el desarrollo de las técnicas de citogenética y genética molecular que permiten analizar el ADN a partir de la célula o células biopsiadas, en un primer momento mediante la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), pasando por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación genómica comparada (CGH), el “array” de CGH, “microarrays”-SNP y por último la secuenciación masiva (NGS).

Podemos concluir que el Test Genético Preimplantacional está englobado dentro de la medicina preventiva. Es un método de diagnóstico que surge gracias a los avances en las técnicas de reproducción asistida que junto con las técnicas de citogenética y genética molecular, nos permiten conocer, en un embrión, la presencia o no de una determinada anomalía genética o citogenética asociada a una enfermedad, antes de su transferencia al útero materno. Supone la única opción reproductiva para los pacientes portadores de una enfermedad monogénica ya que, hasta no hace mucho, las alternativas para reducir el riesgo eran: abstenerse de tener hijos (Alemañ et al., 2007), la adopción (Gadow, 2007), aceptar el riesgo (Nielsen, 1975) o utilizar gametos de donantes (Boué et al., 1975).

II.2. Test genético preimplantacional.

II.2.1. Concepto y antecedentes.

El Test Genético Preimplantacional es el estudio de la información genética de un embrión obtenido mediante técnicas de reproducción asistida, fecundación *in vitro* con inyección intracitoplasmática y biopsia embrionaria, para seleccionar aquellos embriones cromosómicamente normales o libres de desórdenes genéticos heredados (Handyside et al., 1992).

El TGP ha resultado de gran utilidad en parejas que presentan un riesgo elevado de transmitir enfermedades monogénicas a la descendencia así como para descartar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. Representa, por tanto, una alternativa al diagnóstico prenatal y permite evitar la interrupción voluntaria del embarazo.

El TGP permite el estudio del complemento cromosómico del embrión antes de su transferencia al útero materno, sin verse afectado su desarrollo o capacidad de implantación (Hardy et al., 1990). La biopsia embrionaria puede realizarse en día 3 o en día 5 del desarrollo embrionario, analizando un blastómero o una parte de trofoectodermo (4 a 8 células), respectivamente. La ventaja de realizar la biopsia en día 3 es que, tras el estudio genético (37-48 horas), puede realizarse la transferencia embrionaria en el mismo ciclo de estimulación ovárica. La desventaja es que al analizar una única célula, si el embrión es un mosaico, este no puede ser detectado. Cuando la biopsia es en el día 5, se analiza un grupo

de células del trofoectodermo, y este riesgo disminuye, pero se hace necesaria la vitrificación de los embriones a la espera del resultado genético y la transferencia embrionaria diferida.

Los embriones normales y de buena calidad pueden ser por tanto transferidos, o vitrificados para ser transferidos en un ciclo posterior. Se ha comprobado que la vitrificación de embriones biopsiados en estadio de blastocisto no afecta a su desarrollo e implantación, cuando se compara con blastocistos vitrificados sin haberse realizado la biopsia (El-Toukhy et al., 2009).

Desde su primera aplicación clínica publicada en 1989 (Handyside et al., 1989), en parejas con enfermedades de herencia ligada a los cromosomas sexuales, mediante la amplificación por PCR de una secuencia de ADN específica del cromosoma Y (Handyside et al., 1990), se han realizado en el mundo alrededor de 50.000 ciclos de TGP y han nacido más de 10.000 niños (Moutou et al., 2014). La aplicación de esta técnica se ha ampliado progresivamente y, hoy en día, se utiliza para la detección de una gran cantidad de enfermedades genéticas heredadas. Así son de común aplicación el Test Genético Preimplantacional de enfermedades monogénicas (TGP-M), el TGP de anomalías cromosómicas estructurales (TGP-SR) (Lissens y Sermon, 1997; Verlinsky et al., 1994); el específico para la selección embriones HLA compatibles con fines a terceros (Rechitsky et al., 2004), el destinado a pacientes en tratamientos de FIV con probabilidades altas de generar embriones aneuploides (Munné y Cohen, 1998), Test Genético Preimplantacional de Aneuploidías (TGP-A) y, en algunos países y dependiendo de la legislación, para la determinación del sexo embrionario por motivos sociales (Malpani y Malpani, 2002).

La técnica más común utilizada en el DGP para enfermedades monogénicas es la PCR (Figura 1). Los protocolos para genotipar enfermedades monogénicas en una única célula están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Li et al., 1988; Saiki et al., 1985), siendo un método sensible para detectar mutaciones únicas en genes. La PCR es una técnica con alta sensibilidad y se le pueden asociar ciertos errores como: amplificación de ADN exógeno o contaminaciones, por lo que se debe tener precaución en su uso en el diagnóstico clínico, ya que puede comprometer la fiabilidad del resultado.

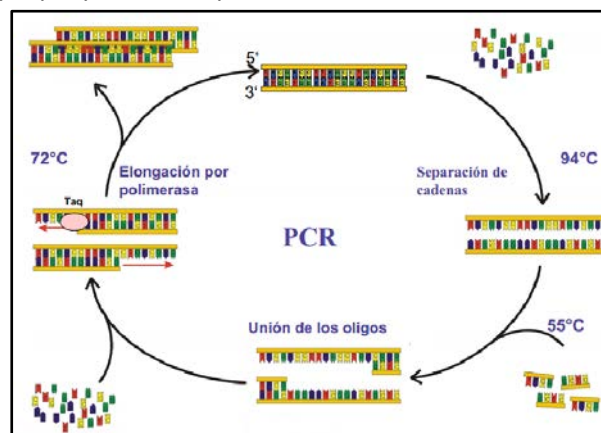


Figura 1. Diagrama de la reacción en cadena de la polimerasa, donde se muestra la desnaturalización, la unión de los cebadores y la elongación por la polimerasa.

Cuando utilizamos la PCR en el TGP de enfermedades monogénicas nos encontramos con un problema que estaba ausente en el análisis genético convencional con esta misma técnica: la cantidad y calidad de ADN obtenida de una sola célula (Harper et al., 2002).

Desde la realización del primer TGP basado en la PCR en los años 90, han sido muchas las enfermedades monogénicas analizadas y a un mayor el número de niños nacidos. Desde los primeros casos se han puesto de manifiesto diversas dificultades relacionadas con la amplificación del ADN de una sola célula, incluyendo “allele drop-out” (ADO), contaminaciones de las muestras, fallos en la amplificación y amplificaciones preferenciales de uno de los alelos. De estos fenómenos, el principal es el ADO que consiste en el fallo de amplificación de uno de los dos alelos esperados en una célula heterocigota. La mayoría de las publicaciones describen para la PCR una eficiencia de amplificación en torno al 80% (pudiendo llegar al 90-95%) y unas tasas de ADO del 10% (rango 0-40%).

Por este motivo se ha necesitado invertir un largo periodo de tiempo para llegar a un protocolo de trabajo ajustado a las nuevas condiciones de la PCR, sin perder de vista la contaminación con ADN exógeno y problemas específicos como la amplificación alelo específica, “allele drop-out”.

A lo largo de estos años se han utilizado numerosas variantes de la PCR y detección alélica a nivel de una sola célula. La mayoría de métodos (Lissens and Sermon, 1997; Ray et al., 1998), han quedado en desuso y han sido reemplazados por la PCR fluorescente (PCR-“multiplex”) (Findlay et al., 1995; Pickering et al., 1994), técnica por excelencia utilizada en TGP de enfermedades monogénicas (Thornhill et al., 2005) que ha facilitado el diagnóstico y mejorado la seguridad y fiabilidad del TGP para esta indicación.

Gracias a la amplificación de marcadores STRs, en PCR multiplex, se pueden detectar posibles fenómenos de recombinación, solventar fenómenos de ADO, así como posibles contaminaciones (Peciña et al., 2010; Spits y Sermon, 2009), resultando un método ideal para el TGP (Renwick et al., 2006).

Uno de los factores limitantes a la hora de realizar un TGP, además del tiempo, es la cantidad de ADN de partida para realizar el diagnóstico. Por ello, se diseñó un método para la amplificación del genoma completo (WGA) con el objetivo de generar una nueva muestra que es indistinguible del original pero con una mayor concentración de ADN. El primer método de amplificación de genoma completo fue descrito en 1992 y estaba basado en el principio de la PCR. Zhang y sus colaboradores desarrollaron el “Primer Extension PCR” (PEP) y Telenius y sus colaboradores diseñaron el “Degenerated Oligonucleotide Primed PCR”(DOP-PCR) (Telenius et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Actualmente, el método más usado para la amplificación de ADN en el TGP de enfermedades monogénicas es la técnica MDA (Multiple Displacement Amplification). El tamaño medio de un producto de MDA es >10kb y la tasa de error de la polimerasa es de $10^6 - 10^7$ nucleótidos (Coskun y Alsmadi, 2007; Zheng et al., 2011).

El MDA se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos hexaméricos de secuencia al azar que hibridan en distintas regiones del genoma y que son extendidos posteriormente por la ADN

polimerasa del bacteriófago *Phi29*, mediante una reacción isotérmica a 30°C, sin necesidad de ciclos de desnaturalización/ renaturalización. El éxito de MDA radica en las características intrínsecas y específicas de la ADN polimerasa de *Phi29* (Blanco et al., 1989).

En 2004, Hellani et al. emplean la amplificación previa de ADN (MDA) (Hellani et al., 2004) para amplificar el genoma completo directamente de un leucocito. Estos datos demostraron la utilidad del MDA en el diagnóstico de enfermedades monogénicas (Burllet et al., 2006; Handyside et al., 2004). El MDA, a partir de una sola célula, permite obtener un gran rendimiento de ADN, $35 \pm 5 \mu\text{g}$ (1.000.000 de veces más que el ADN que se obtiene de una sola célula) y emplearlo en múltiples análisis de reacción en cadena de la polimerasa, incluyendo microsatélites (STRs, del inglés Short Tandem Repeat), mutaciones puntuales, tipaje del HLA (Handyside et al., 2004; Verlinsky et al., 2001).

Todos los estudios publicados que utilizan el MDA para amplificar el genoma de una célula única indican que la mayor desventaja de esta amplificación es la tasa de ADO (25%) así como la amplificación preferencial de ciertos alelos que pueden causar errores de diagnóstico en el TGP (Spits et al., 2006; Wilton et al., 2009).

Con el fin de solventar estas desventajas, se analizan mediante STRs un mayor número de *loci* que deben ser informativos. Esto conduce a una disminución de la tasa de ADO hasta el 10% y la amplificación preferencial de alelos deja de ser un problema (Renwick et al., 2006).

La combinación del MDA con las distintas variantes de PCR ha permitido la aplicación del TGP-M a un extenso número de enfermedades monogénicas (Lledó et al., 2008). Además el MDA ha permitido la combinación de técnicas de amplificación genómica completa, como la PCR y el “array”-CGH o más recientemente la secuenciación masiva (NGS), pudiendo realizar el diagnóstico genético preimplantacional de una determinada enfermedad monogénica y el “screening” de aneuploidías para todos los cromosomas de forma simultánea y en la misma muestra.

El “array”-SNP se diseñó inicialmente para estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés Genome-Wide Association Study) antes de su primera aplicación en el TGP en 2011 (Treff et al., 2011a). Con millones de sondas que cubren todo el genoma, el conjunto de SNP tiene una resolución relativamente alta para detectar enfermedades monogénicas, translocaciones equilibradas y desequilibradas (Brezina et al., 2011; Tobler et al., 2014; Treff et al., 2011b), así como aneuploidías incluyendo la triploidía y la disomía uniparental (Treff et al., 2011b).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano. Debido a su amplia distribución, estos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma y producen una variación en un solo par de bases.

Esta técnica utiliza un portaobjetos en el que se han adherido secuencias de ADN polimórficas, SNPs. El ADN control y el problema se hibridan separadamente en distintas áreas de SNPs de un mismo soporte y se puede utilizar el mismo fluorocromo para marcarlos. Para calcular el número de copias de cada cromosoma se comparan las

intensidades de fluorescencia obtenidas para la hibridación control y la hibridación problema. El éxito de diagnóstico mediante “array”-SNPs es del 96% (Treff et al., 2011a).

Handyside y colaboradores, propusieron por primera vez el término “karyomap”, que a diferencia del “cariotipo”, identifica los genotipos SNP de la descendencia de los cuatro posibles haplotipos hereditarios en todos los cromosomas y revela posibles anomalías cromosómicas, CNVs, y mutaciones en un único gen. En el estudio de dos familias portadoras de mutaciones en el gen de la fibrosis quística (*CFTR*), Handyside y colaboradores, confirmaron que el “karyomapping” permitía detectar la mutación en el gen *CFTR* e incluso distinguir la monosomía y la disomía uniparental (Handyside et al., 2010; Li et al., 2014).

Una ventaja de los “arrays”-SNP, es la posibilidad de tener la información de genotipos. En el caso de transferencias de múltiples embriones, podemos rastrear qué embriones han implantado utilizando la “huella digital de ADN” de los SNP. Este método ha resultado muy útil en una serie de ensayos clínicos en los que se determinaba el impacto clínico de la biopsia (Scott et al., 2013b) y de la vitrificación de los ovocitos (Forman et al., 2012).

Los “arrays”-SNP también se han utilizado para el estudio de desequilibrios cromosómicos en embriones derivados de pacientes portadores de alteraciones cromosómicas estructurales. Los estudios han demostrado una resolución de segmentos en torno a los 2,3 Mega bases (Mb). Sin embargo, la capacidad de detectar segmentos desequilibrados *de novo* sigue siendo un tema de debate ya que muchos hallazgos pueden representar artefactos de la metodología.

El éxito de las técnicas de fertilización *in vitro* está basado, en parte, en la selección de embriones viables para la transferencia al útero materno. Durante décadas, la selección del embrión más competente para la transferencia ha utilizado principalmente criterios morfológicos, con las mayores tasas de implantación observadas cuando se selecciona la morfología y las características óptimas (Magli et al., 2012; Veeck et al., 1999). Sin embargo, a pesar de que los parámetros morfológicos proporcionan una información valiosa para su selección, este método no deja de ser subjetivo y no permite conocer la constitución cromosómica de los embriones (Munné et al., 2006). El motivo de que muchas mujeres no logran un embarazo, incluso después de la transferencia de embriones de buena calidad y morfológicamente normales, es que estos embriones pueden presentar alteraciones cromosómicas (aneuploidías) (Munné et al., 2000, 1998a, 1998b). Este es precisamente el fundamento del TGP-A: determinar el embrión más competente para la transferencia tras el estudio genético, y por tanto, mejorar las tasas de implantación (Handyside et al., 1990).

La tecnología utilizada para el estudio cromosómico de los embriones ha cambiado a medida que las nuevas técnicas moleculares se han ido desarrollando. La primera técnica utilizada en el TGP de aneuploidías fue la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Camus et al., 1999), aplicada a un único núcleo fijado de una célula (blastómera), y utilizaba sondas específicas centroméricas o teloméricas, marcadas con diferentes fluorocromos. Este método aunque es rápido y sensible, solo nos deja ver de manera simultánea un número limitado de cromosomas, debido al número de fluorocromos combinados disponibles. De hecho, se hace necesario hibridar y deshibridar la misma muestra dos o tres veces para

poder analizar un máximo de 9 a 12 pares de cromosomas, con la consiguiente pérdida de eficiencia tras varias rondas de hibridación. Esta técnica permite la transferencia de los embriones en el mismo ciclo de estimulación, ya que los resultados se obtienen en 37-48 horas.

La primera aplicación del FISH en células únicas utilizó sondas para los cromosomas X e Y (Griffin et al., 1992), por lo que rápidamente se usó para diagnóstico del sexo del embrión en parejas con enfermedades ligadas al sexo (Griffin et al., 1994). En cuanto a la aplicación para el TGP-A, el FISH fue la primera técnica utilizada (Camus et al., 1999). La biopsia de un blastómero procedente de un embrión en estadio de células (día 3), se fijaba sobre un portaobjetos y posteriormente se hibridaba con sondas específicas centroméricas o teloméricas marcadas con diferentes fluorocromos, que hacían necesarias varias rondas de hibridación con las que se perdía eficiencia.

Sin embargo, no se pudo demostrar la mejora en los resultados en cuanto a la tasa de embarazo evolutivo. Las distintas publicaciones mostraban resultados muy discordantes en cuanto a las mejoras en la tasa de embarazo evolutivo y fue una técnica seriamente cuestionada (Hardarson et al., 2008; Mastenbroek et al., 2007).

Las razones de este pobre rendimiento clínico están principalmente en las limitaciones de la técnica. Alguno de los riesgos y limitaciones del TGP mediante FISH se deben a problemas inherentes al procesado de las biopsias obtenidas (fijación, células anucleadas, multinucleación, etc.). La fijación de los núcleos de las células biopsiadas condiciona en gran medida el resultado (Wells et al., 2008). Se estima que un 7% de los embriones biopsiados no tendrá diagnóstico. La técnica, solo permite analizar alteraciones genéticas conocidas previamente, y referidas a un cromosoma específico o una región subcromosómica (Bishop, 2010). Además, hay que tener en cuenta los errores por solapamiento de las señales fluorescentes, fallos de hibridación de las sondas, hibridaciones inespecíficas, y la dificultad de interpretar los resultados de la técnica.

Cuando se utiliza para TGP-A, el inconveniente es no poder analizar los 23 pares de cromosomas debido a la limitación en el número de sondas fluorescentes y la pérdida de eficiencia en caso de realizar rondas sucesivas de hibridación sobre una misma muestra de cromosomas. El número de cromosomas analizados, un total de 9 a 12 del total de los 23 pares de cromosomas del cariotipo humano, se correspondían con los mayoritariamente encontrados en estudios genéticos de restos abortivos (Soler et al., 2017), detectando entre el 81% y el 87% de los embriones anormales. Por último, el análisis de una única célula no permitía detectar el posible mosaicismo presente en el embrión disminuyendo, aún más, la posibilidad de selección del embrión euploide para la transferencia (Gutiérrez-Mateo et al., 2011).

Los avances en las técnicas de genética molecular, permiten dejar atrás la FISH como técnica de diagnóstico y dan paso a las técnicas de “screening” integral de cromosomas (CCS, del inglés Comprehensive Chromosome Screening) o cariotipo completo del embrión.

En un intento de solventar la limitación del número de cromosomas analizados por FISH, se introduce la Hibridación Genómica Comparada (CGH), en el TGP-A, es una técnica que se estableció para el análisis completo del cariotipo humano. Fue descrita por Kallioniemi y

colaboradores, en 1992 para el estudio de marcadores cromosómicos en el ADN tumoral. Mediante esta técnica se puede detectar ganancias o pérdidas de cromosomas enteros o regiones cromosómicas específicas, sin necesidad de tener células en división (Kallioniemi et al., 1992). La cantidad de ADN necesaria para el análisis mediante CGH es alrededor de 1 microgramo, siendo esta cantidad mucho mayor que lo que encontramos en un única célula (5-10 picogramos). Por esta razón, la amplificación del genoma completo (WGA) de la célula biopsiada es esencial para alcanzar la cantidad de ADN requerida (Wells et al., 2008). La técnica de amplificación de genoma completo más adecuada antes de realizar la CGH es la DOP-PCR (Wells et al., 1999) y con una optimización adecuada se puede aplicar con éxito en el análisis de blastómeros de embriones (Wells y Delhanty, 2000). La CGH permite analizar todos los cromosomas, siendo su límite de resolución de 10-20 Mb, por lo que se pueden detectar también alteraciones parciales de los cromosomas. El éxito de diagnóstico mediante esta técnica es aproximadamente del 94% (Gutiérrez-Mateo et al., 2004) y se ha aplicado a TGP consiguiendo un índice de éxito en embarazo de hasta el 57% (Sher et al., 2007; Wells et al., 2002). También se llegó a publicar un protocolo modificado de CGH aplicable a blastómeras, que permite detectar reordenamientos cromosómicos desequilibrados de >4 Mb en tiempo suficiente como para que se pueda realizar la transferencia de los embriones sanos en día 5 (Rius et al., 2011, 2010).

Sin embargo, el tiempo requerido para obtener resultados era superior a 72 horas lo que obligaba congelar los embriones a la espera de los resultados, con la reducción en las tasas de embarazo que la congelación suponía.

La nueva técnica que se incorpora, los "arrays"-CGH (Hellani et al., 2008; Wells et al., 2008), no solo permiten la detección integral de todo el componente cromosómico en una sola célula del embrión, sino que el análisis mediante aCGH de BACs (cromosoma artificial bacteriano) está totalmente automatizado. Todo el procedimiento se puede realizar en menos de 24 horas, permitiendo la transferencia en fresco en el día 5 del desarrollo del embrionario.

El estudio de validación publicado por Gutiérrez-Mateo y colaboradores se realizó mediante el análisis por "array"-CGH de blastómeros biopsiados en día 3, proveniente de embriones no transferidos. Se compararon los resultados con los obtenidos con el diagnóstico mediante la técnica de FISH. Los autores describieron que el aCGH detectaba un 42% más de alteraciones cromosómicas, en comparación con un panel de 12 sondas de FISH, de forma que el éxito de diagnóstico mediante "array"-CGH es del 89% (Gutiérrez-Mateo et al., 2011).

El "array"-CGH es una tecnología genómica basada en la hibridación competitiva de una muestra y un control, marcados diferencialmente sobre un soporte físico o plataforma de "array" CGH que contiene segmentos de ADN de pequeño tamaño cuya localización en el genoma y cuya secuencia son conocidas. Estos segmentos de ADN pueden ser oligonucleótidos o BACs. En ambas plataformas, el principio es el mismo y la diferencia radica en la longitud de los fragmentos de ADN impresos en el cristal. Los BACs tienen una longitud de entre 75-200 Kilo bases (Kb) y los oligonucleótidos una longitud de 25-85 pares de bases.

El "array"-CGH, proporcionado una mayor precisión en la evaluación de embriones viables (Harper y Sengupta, 2012). Es una técnica empleada, tanto para el estudio "screening" completo de los cromosomas, como para casos de alteraciones estructurales (translocaciones recíprocas, Robertsonianas, inversiones) (Munné, 2012). Esta técnica, aunque mejora la selección del embrión euploide para la transferencia, se aplican en el análisis de una única célula del embrión (blastómero), por lo que no detectan la posible presencia de mosaicismo en el embrión.

La tecnología del "array"-CGH se ha aplicado con éxito en el análisis de corpúsculo polar (Alfarawati et al., 2011; Fishel et al., 2010; Geraedts et al., 2011), en embriones en estadio de división (Alfarawati et al., 2011; Fiorentino et al., 2011; Geraedts et al., 2011; Gutiérrez-Mateo et al., 2011) y en embriones en estadio de blastocisto (Alfarawati et al., 2011), con una precisión que varía desde el 95% en biopsia de blastómero (Gutiérrez-Mateo et al., 2011) hasta el 98% en biopsia de blastocisto (Alfarawati et al., 2011).

En la práctica clínica se han introducido otras técnicas de "screening" de aneuploidías, basadas también en el estudio completo de los cromosomas, que están siendo empleadas para el diagnóstico preimplantacional, como es el "array"-SNPs, (Handyside et al., 2010), el Kayolite-Bobs o la PCR cuantitativa (qPCR), del inglés quantitative Polymerase Chain Reaction) (Chen et al., 2014). Estudios preclínicos han demostrado una precisión del 99% para el estudio de aneuploidías en 24 cromosomas mediante el análisis con qPCR (Treff et al., 2012) y también se ha logrado una mejora en las tasas de implantación y nacimiento de descendientes vivos cuando se utiliza en ciclos de FIV (Scott et al., 2013a).

Tras la publicación en 2013, de Scott y colaboradores (Scott et al., 2013b) donde concluyen que la biopsia en el estadio de división embrionaria (día 3 de cultivo) reduce notablemente el potencial de implantación del embrión, comparada con la biopsia de trofoectodermo que no produce un impacto medible y puede usarse de manera segura, la mayoría de los ciclos de TGP en la actualidad, se llevan a cabo tras la biopsia de trofoectodermo. A pesar de todos estos avances recientes, unidos al desarrollo de las técnicas de cultivo en fecundación *in vitro* con la incorporación del medio único (Paternot et al., 2010) o las mejoras en la vitrificación embrionaria (Saito et al., 2000; Yokota et al., 2001, 2000), que han permitido incrementar el número de embriones que evolucionan a estadio de blastocisto y su vitrificación con altas tasa de supervivencia, solo una pequeña minoría de los embriones transferidos se implantan y dan lugar a embarazos evolutivos.

En el año 2014, Munné S. y colaboradores, publican la secuenciación completa de biopsias de embrión mediante la tecnología PGM (del inglés, Personal Genome Machine), con la se pudo secuenciar el 97% del genoma y se pudo observar que un promedio de 20 genes funcionales por embrión, estaban afectados aunque solo 1/20 eran genes de función conocida. Se encontraron 3.000 variantes de *novo* por embrión, aunque solo 30 de ellas se correspondían con efectos negativos conocidos.

La incorporación al TGP de una nueva tecnología, la secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés Next Generation Sequencing), que se ha convertido en un importante instrumento junto con la biopsia de trofoectodermo, no solo tiene la ventaja de estudiar la dotación cromosómica completa del embrión para la detección de aneuploidías, sino que

por primera vez, se hace posible la cuantificación del mosaicismo, además de permitir el análisis de forma simultánea de enfermedades monogénicas, translocaciones y la cuantificación del genoma mitocondrial (ADNmt) (Stigliani et al., 2013), en unas pocas células biopsiadas del embrión sin necesidad de utilizar distintas tecnologías.

Con la llegada de la nueva era genómica, a partir de la finalización del proyecto de genoma humano, los estudios genéticos han cambiado gradualmente sus estrategias pasando del análisis de unos pocos *loci* al análisis del genoma completo, lo cual exige una tecnología de alto rendimiento y bajo coste. Desde el año 2005, se desarrollaron y comercializaron las nuevas tecnologías de secuenciación masiva paralela (MPS). Estas tecnologías MPS eran, en principio, totalmente diferentes del método Sanger, y por esta razón pasaron a denominarse secuenciación de próxima generación (NGS).

Los últimos avances en genética y genómica han afectado significativa y positivamente a las ciencias biomédicas. El desarrollo emergente de nuevas tecnologías como la secuenciación masiva permite generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación y en un corto período de tiempo (Shendurey Ji, 2008). Hoy en día, existen multitud de equipos de secuenciación masiva y todos ellos suponen un coste muy inferior al coste por secuenciación Sanger (Sanger et al., 1977). Podríamos decir que esta es una de las mayores diferencias y más relevantes que encontramos entre la secuenciación Sanger y la secuenciación masiva.

Existen diversas plataformas de secuenciación masiva, cada una con sus particularidades, pero todas ellas tienen en común que la detección del ácido nucleico no es aplicable a una única molécula, por lo que se requiere amplificar previamente el fragmento que se va a secuenciar para poder obtener lecturas secuenciadas del mismo. Este proceso puede darse mediante una PCR en emulsión o una PCR puente. Los dos sistemas de secuenciación masiva más utilizados hoy en día para hacer el diagnóstico genético son el sistema de "Illumina" y el sistema "Ion Torrent de ThermoFisher".

El rápido desarrollo de secuenciación masiva ha generado un interés creciente en la determinación de si se podría aplicar de forma fiable al Diagnóstico Genético Preimplantacional, ya que es una tecnología de alto rendimiento que permite el análisis, de forma simultánea, de un elevado número de muestras y distintas regiones del genoma, y disminuye el tiempo de secuenciación y reduce los costes (Tan et al., 2014).

La mayoría de las plataformas de secuenciación masiva que se utilizan actualmente requieren la pre-amplificación del ADN a partir de la muestra biopsiada en estadio de división o en estadio de blastocisto. Uno de los primeros ejemplos de secuenciación masiva en célula única fue el desarrollado por Zhang y colaboradores, para la amplificación de genoma completo usó un sistema basado en PCR (Genomeplex) y posterior secuenciación mediante Hiseq2000 (Illumina). Utilizaron un algoritmo interno para el análisis y detección de variaciones de número de copias (CNV) y aneuploidías mayores de 1Mb (Zhang et al., 2013). Para ello, analizaron blastómeros y muestras de trofoectodermo teniendo como resultado una sensibilidad del 99,63% y una especificidad del 97,71%.

El grupo de Dagan Wells en Oxford validó un protocolo basado en el sistema de secuenciación masiva mediante Ion Torrent para TGP-A con un coste menor que el "array"-

CGH, con análisis de biopsias de día 5 y día 6 sin necesidad de criopreservar el blastocisto. La especificidad y sensibilidad alcanzaron el 100%. El método fue aplicado clínicamente en dos ciclos de FIV, selección de embriones euploides y nacimiento de dos niños en ambos casos (Wells et al., 2014).

Fiorentino y colaboradores adaptaron el flujo de trabajo del secuenciador HiSeq2000 de Illumina para análisis de blastómeros, previamente amplificados con Sureplex. Validaron el método con 190 blastómeros obtenidos después de PGT-A con “array”-CGH, y obtuvieron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99,98%. El protocolo, además, detectó aneuploidías parciales de hasta 14 Mb de tamaño (Fiorentino et al., 2014).

En el año 2013, Yin y colaboradores, mostraron que el NGS se puede utilizar para el análisis de anomalías cromosómicas. Analizaron biopsias de trofoectodermo de pacientes portadores de translocaciones e inversiones usando NGS y “array”-SNP. Validaron además los resultados usando qPCR y la sensibilidad y especificidad que obtuvieron fueron del 95% y 96% respectivamente. En cuanto al análisis de aneuploidías con NGS tanto la especificidad como sensibilidad fueron del 100% (Yin et al., 2013).

Utilizando la plataforma de secuenciación masiva de Ion Torrent, Bono y colaboradores, analizaron 145 productos de WGA obtenidos de embriones en estadio de división y en estadio de blastocisto derivados de 33 parejas portadoras de alteraciones cromosómicas estructurales. Para la detección de los desequilibrios cromosómicos el método presentó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99,75%. El menor tamaño cromosómico detectado fue de 5Mb (Bono et al., 2015)

En 2015, Lukaszuk y colaboradores, publicaron un estudio prospectivo donde se realizó PGT-A mediante secuenciación masiva de blastómeros biopsiados en día 3 en pacientes con fallo de implantación. Se realizó la transferencia de embriones en día 5 y se compararon las tasas de embarazo clínico con un grupo control donde no se realizó PGT-A. La conclusión fue una tasa de embarazo dos veces mayor en el grupo de blastómeros con PGT-A en comparación con el grupo control y con resultados estadísticamente significativos (Łukaszuk et al., 2015).

Deleye y colaboradores compararon las tecnologías de secuenciación masiva de Illumina y de Ion torrent con “array”-CGH analizando anomalías cromosómicas numéricas y estructurales en biopsias de trofoectodermo. Los resultados del NGS y “array”-CGH fueron concordantes, y la sensibilidad y especificidad de ambos fueron del 100%. La anomalía cromosómica más pequeña detectada fue de 4,5Mb y también mostraron que el NGS presentaba una relación señal/ruido incrementada para tamaños de hasta 3Mb (Deleye et al., 2015).

En cuanto al estudio de las triploidías mediante secuenciación masiva, varios estudios confirman que se pueden detectar mediante esta tecnología. La triploidía es una anomalía cromosómica rara que afecta al 2-3% de los embarazos y se asocia con múltiples anomalías, y abortos espontáneos. Maxwell y colaboradores validaron un protocolo interno mediante secuenciación masiva para la detección de triploidías 69,XXY y 69,XXY que no podían ser identificadas mediante “array”-CGH (Maxwell et al., 2016).

El mosaicismo es uno de los aspectos importantes en el análisis de los embriones preimplantación, y puede detectarse cuando analizamos varias células de un embrión, como ocurre en el análisis de trofoectodermo. Los nuevos métodos de “screening” cromosómico como el “array”-CGH, la qPCR y el “array”-SNP pueden detectar embriones tanto euploides como aneuploides, pero no pueden detectar con fiabilidad el mosaicismo. Sin embargo, con la secuenciación masiva podemos solventar esa limitación. Maxwell y colaboradores, validaron un protocolo de secuenciación masiva para detectar mosaicismo, comparando el resultado de NGS y “array”-CGH de embriones euploides que habían dado lugar a abortos espontáneos. Como resultado encontraron un 36,9% de mosaicismo (Maxwell et al., 2016). En este estudio y en el realizado por Munné y colaboradores, mostraban que el 9% de todos los blastocistos transferidos que dan lugar a embarazo eran embriones mosaicos (Munné et al., 2017).

En varios artículos publicados se presentan resultados que permiten identificar los embriones con las mejores posibilidades de producir un embarazo viable, lo que conduce a mejores tasas de éxito de la FIV y un menor riesgo de aborto involuntario (Tan et al., 2014; Treff et al., 2013; Wells et al., 2014).

El estudio de TGP de enfermedades monogénicas mediante secuenciación masiva es actualmente un campo en estudio. La primera validación mediante NGS en enfermedades monogénicas la realizaron Treff y colaboradores en el año 2013 para el estudio de fibrosis quística y el síndrome de Walker-Warburg (Treff et al., 2013). En otro estudio Yan y colaboradores, realizaron el estudio de análisis de ligamiento mediante secuenciación masiva en dos parejas, una portadora de exostosis múltiple hereditaria y la otra portadora de displasia ectodérmica hipohidrótica ligada al cromosoma X. Los resultados se compararon con secuenciación Sanger, “array”-CGH y análisis de STRs. En ambos casos se consiguió el nacimiento de un descendiente sano (Yan et al., 2015).

Además del estudio de enfermedades monogénicas y de alteraciones cromosómicas en los embriones preimplantación, Peters y colaboradores, realizaron un estudio donde se detectaban mutaciones *de novo* en el genoma del embrión, mediante una tecnología de NGS de lectura de fragmentos largos y una plataforma de tecnología nanoarray (Complete Genomics). Estas mutaciones *de novo* que recientemente se han relacionado con la aparición de autismo, discapacidad intelectual grave y encefalopatías epilépticas, pasarían desapercibidas en los estudios dirigidos de TGP y estudios de portadores de enfermedades en los padres (Peters et al., 2015).

Las ventajas de la NGS sobre otras tecnologías son innumerables: el diagnóstico de trastornos hereditarios, tanto enfermedades monogénicas como anomalías cromosómicas, se puede combinar fácilmente con el “screening” de aneuploidías. Además, el coste de NGS disminuye rápidamente si se adopta un enfoque de alto rendimiento, y el mosaicismo cromosómico en el blastocisto se puede detectar con mayor sensibilidad que las pruebas basadas en una matriz, como por ejemplo el “array”-CGH. Aunque no existen ensayos clínicos sobre el uso de NGS para aberraciones cromosómicas estructurales en anillo y cromosoma marcador, la NGS parece tener la eficiencia y el potencial para detectarlos.

Por otro lado, surgen estudios que permiten un análisis más profundo del genoma del embrión. Esto conlleva el riesgo de encontrar variantes de significado desconocido, o incluso variantes con efectos conocidos que, sin embargo, los posibles padres no necesariamente querrían saber (Hens et al., 2013).

II.2.2. Etapas del Proceso del Test Genético Preimplantacional.

Un programa de Test Genético Preimplantacional (TGP o DGP) es un procedimiento complejo que consta de varias fases y está sustentado por dos especialidades, la Reproducción y la Genética. En el proceso interviene un gran equipo multidisciplinar de profesionales: ginecólogos, enfermeros, embriólogos, genetistas, etc.... que trabajan en continua comunicación y siempre bajo unos estrictos controles de calidad, para asegurar el correcto funcionamiento de cada uno de ellos.

Distintas sociedades científicas como la Sociedad americana de Medicina Reproductiva (ASRM), la Sociedad Internacional sobre DGP (PGDIS) o el Consorcio para DGP de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) han editado guías o normas básicas para regularizar y estandarizar cada uno de los procedimientos y técnicas empleadas en el TGP. Además, anualmente y a través de la "United Kingdom National External Quality Assessment Services" (UKNEQAS), se ofrecen evaluaciones (control de calidad externo) para cada uno de los diagnósticos que se realizan de manera rutinaria en el laboratorio de TGP.

II.2.2.1. Consulta de asesoramiento genético y reproductivo.

El asesoramiento genético es el proceso de ayudar a las personas a comprender y adaptarse a las implicaciones médicas, psicológicas y familiares de las contribuciones genéticas a la enfermedad.

Es un proceso comunicativo mediante el cual un profesional especializado en genética proporciona información y apoyo al paciente y sus familiares respecto de la condición genética, la herencia de la enfermedad, el riesgo de recurrencia y las implicaciones para el individuo y su familia. El objetivo es facilitar al paciente la toma de decisiones de acuerdo con sus valores y creencias y actuar en concordancia con la decisión tomada. En este caso, el asesoramiento está dirigido a parejas que se encuentran en su etapa reproductiva.

En el caso particular del asesoramiento reproductivo, este consiste en trasladar el concepto del asesoramiento a aquellas parejas que deseen descendencia y/o estén gestantes en el momento de la consulta. El genetista reconstruirá la historia de ambas ramas familiares mediante un árbol genealógico para analizar el tipo de herencia, detectar portadores, y determinar la idoneidad del DGP.

Es en la Consulta de Asesoramiento Genético donde se valora la indicación por parte del genetista, y con ello los pasos a seguir.

En principio las indicaciones para realizar un Test Genético Preimplantacional de monogénica, serían las mismas que las indicaciones para el Diagnóstico Prenatal. Sin embargo el potencial del TGP-M ha ampliado el rango de indicaciones.

II.2.2.2. Enfermedades monogénicas

Las enfermedades monogénicas, también conocidas como mendelianas, son aquellas causadas por la alteración en la secuencia de ADN de un solo gen. De manera individual, la prevalencia de estas enfermedades es muy baja pero en su conjunto tienen un importante impacto en la sociedad. Tienen una prevalencia de 2 casos sobre 100 en la población general. Clínicamente tienen mucha importancia y en los países desarrollados son la causa de hasta un 20% de mortalidad infantil. Algunas se diagnostican en el nacimiento, y otras debutan en la etapa adulta.

Presentan un patrón de herencia claro, ya que están causadas por mutaciones en un único gen. Suelen transmitirse a la descendencia siguiendo un patrón de herencia mendeliano, que puede rastrearse en la familia afectada. En estos casos, la mutación tiene un fuerte impacto en el fenotipo, es decir el riesgo de desarrollar la enfermedad será alto, y además será igual para todas las familias que presenten esa mutación.

Se entiende por Enfermedad Rara aquella enfermedad cuya incidencia es menor a 5 casos por cada 10.000 individuos. En la actualidad, Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han descrito alrededor de 7.000 enfermedades raras distintas que afectan al 7% de la población mundial. Esto significa 3 millones de españoles y 27 millones de europeos. Además, una proporción significativa sigue sin haberse caracterizado de forma molecular. Estas enfermedades suelen afectar a las capacidades físicas, habilidades mentales, y a las cualidades sensoriales o de comportamiento. Muchas son crónicas, degenerativas e incapacitantes.

En los últimos 20 años, el TGP-M se ha empleado en el diagnóstico de diversas enfermedades que conforman una lista cada vez más amplia. Sin embargo, también las metodologías empleadas en el diagnóstico de estas enfermedades son muy variadas y, en ocasiones, complejas. La tasa de embrión diagnosticado y eficiencia diagnóstica de cada protocolo es diversa y no existen protocolos estandarizados, ni siquiera cuando el objeto del diagnóstico es la misma enfermedad o la misma mutación.

El TGP de enfermedades monogénicas (TGP-M) permite detectar en los embriones alteraciones génicas causantes de enfermedades genéticas graves con el fin de prevenir embarazos de feto afecto.

Este concepto de TGP está avalado por distintas sociedades científicas: Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM), la Sociedad Internacional sobre DGP (PGDIS) o el Consorcio para PGD de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE). Estas sociedades han realizado unas guías para la correcta práctica del TGP cuyas indicaciones coinciden en que los TGP deben cumplir unos criterios genéticos mínimos:

- La enfermedad debe de ser hereditaria crónica, severa y/o progresiva que genere un grado de discapacidad sensorial, motora o intelectual y que disponga de un tratamiento curativo o comprometa seriamente la calidad de vida.
- Disponer de un informe genético donde se especifique el estatus genético de la mujer, pareja o familia consultante en relación a la enfermedad que se va a consultar.

- Que exista riesgo genético conocido de transmisión del fenotipo alterado a la descendencia.

Los patrones de herencia de las enfermedades monogénicas o mendelianas, se definen según dos criterios:

- a) Localización del gen: podemos distinguir entre herencia autosómica cuando el gen responsable se localiza en cualquiera de los autosomas, y no habrá diferencia entre hombres y mujeres. Por el contrario, si el gen está localizado en los cromosomas sexuales, estaremos frente a una herencia ligada al sexo.
- b) La relación entre los alelos: hace referencia a la relación entre alelo mutado y alelo normal (funcional), que puede ser dominante o recesiva. Para determinar cuál es esta relación, se tienen en cuenta los individuos heterocigotos (que presentan alelo mutado y normal). Si el individuo heterocigoto presenta la enfermedad, se tratará de una herencia dominante, mientras que si está sano, se tratará de una herencia recesiva.

II.2.2.2.1. Herencia Autosómica Dominante

La herencia autosómica dominante afecta a 7 de cada 1.000 individuos. Su principal característica es que, debido a su carácter dominante, se encuentran individuos afectados en todas las generaciones. Afecta a ambos sexos por igual (mutaciones en autosomas) por lo que hombres y mujeres tienen la misma probabilidad de transmitirla a sus hijos de ambos sexos. Si en una rama familiar desaparece la mutación, ya no se transmitirá más dentro de la descendencia de la misma. La probabilidad de transmisión de un individuo afecto a sus hijos es del 50%. El riesgo de recurrencia, es decir la probabilidad de que teniendo un hijo afecto el siguiente también lo sea, es también del 50% (Figura 2).

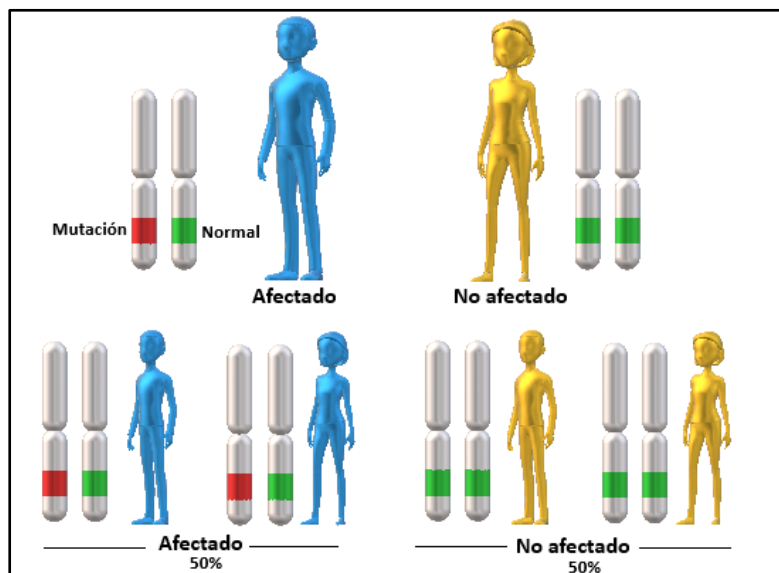


Figura 2. Modo de herencia autosómica dominante

II.2.2.2. Herencia Autosómica Recesiva.

La herencia autosómica recesiva afecta alrededor de 2-3 individuos de cada 1.000. Su principal característica, es que la enfermedad no aparece en todas las generaciones. Debido a su carácter recesivo, los individuos enfermos presentan las dos copias del gen mutadas. Se manifiesta tanto en hombres como en mujeres, teniendo ambos el mismo riesgo o probabilidad de transmitirla a sus hijos. La probabilidad de encontrar en la población dos heterocigotos para este tipo de enfermedades poco frecuentes es muy rara. Sin embargo, esta probabilidad es mayor en los emparejamiento consanguíneos, incrementando el riesgo de enfermedades de herencia autosómica recesiva (Figura 3).

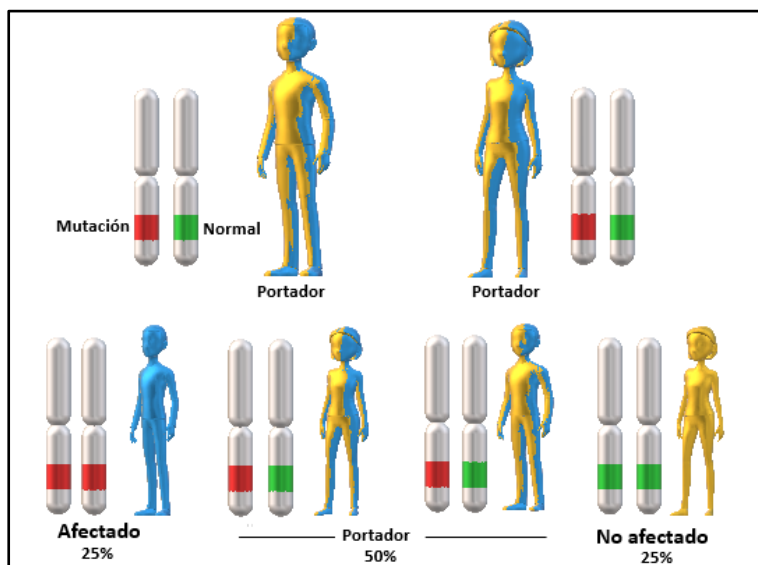


Figura 3. Modo de herencia autosómica Recesiva

II.2.2.3. Herencia Ligada a los cromosomas sexuales.

Los cromosomas sexuales son los identificados como X e Y. Las mujeres presentan dos copias de X y los hombres contienen una copia de X más una copia de Y. Los cromosomas sexuales no solo contienen los genes que determinan el sexo, sino que también contienen otros genes que influyen sobre ciertos caracteres hereditarios no relacionados con el sexo.

Los genes de la región específica de X van a presentar una herencia ligada al cromosoma X o herencia ligada al sexo. Los hombres transmiten el cromosoma Y a todos sus hijos y el cromosoma X a todas sus hijas, mientras que las mujeres pueden transmitir cualquiera de sus cromosomas X a sus hijas o a sus hijos.

Las mujeres al presentar dos copias del cromosoma X, podrán ser homocigotas o heterocigotas para un gen con varios alelos en X. Por el contrario, los hombres al tener una única copia del cromosoma X son considerados hemocigotos y expresarán la condición indistintamente de que esta sea recesiva o dominante. Es por ello, que existe un mayor número de hombres afectados en las enfermedades ligadas al cromosoma X.

- Herencia ligada al cromosoma X recesiva: se caracteriza por la afectación mayoritaria de la enfermedad en varones, y la transmisión vía materna, nunca

paterna. Las genealogías típicas de este tipo de herencia presentan generaciones con hombres afectados, separadas por una generación no afectada. La mayoría de los casos, las mujeres son portadoras, y es raro encontrar mujeres homocigotas (enfermas). Cada hijo varón nacido de una mujer portadora tiene un 50% de probabilidades de heredar el gen defectuoso y por tanto de desarrollar la enfermedad. Cada una de las hijas tendrá un 50% de probabilidades de heredar el gen defectuoso y ser portadora de la enfermedad. Las portadoras generalmente no presentan síntomas de la enfermedad, pero pueden tener un hijo afectado (Figura 4).

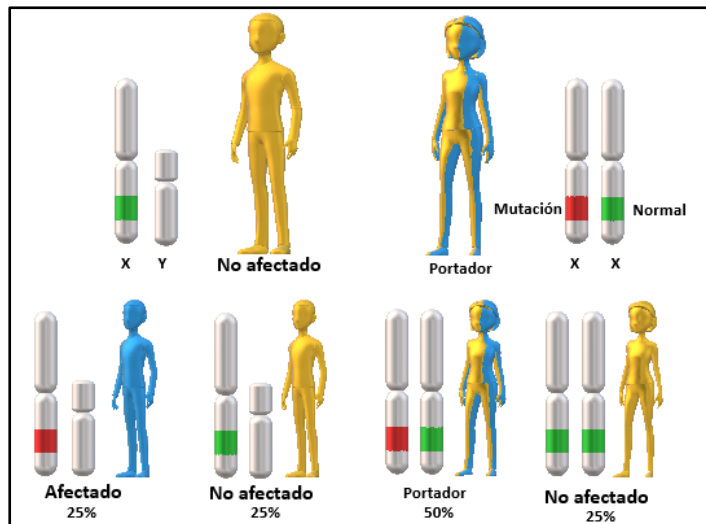


Figura 4. Modo de herencia ligada al cromosoma X recesiva.

- Herencia ligada al cromosoma X dominante: los caracteres dominantes ligados al cromosoma X son poco frecuentes ya que las mutaciones dominantes en el cromosoma X resultan letales tanto en homocigosis como en hemocigosis. Su principal característica es que todas las hijas de un varón afectado manifiestan la enfermedad y todos los hijos son sanos. Tanto los hijos como las hijas de una madre afectada tienen un 50% de probabilidades de estar afectados, aunque la manifestación de la enfermedad es generalmente más leve en mujeres que en varones.

II.2.2.3. Anomalías cromosómicas.

Entendemos como anomalías cromosómicas aquellas alteraciones que conllevan tanto alteraciones en la estructura de los cromosomas (anomalías estructurales) como alteraciones en el número de los mismos (anomalías numéricas).

Las alteraciones cromosómicas numéricas pueden ser de nivel "sómico" (aneuploidías), de nivel ploídico (euploidías aberrantes) o presentarse en mosaicismo (mixoploidías). Las alteraciones estructurales pueden ser estables (deleción, duplicación, translocación, inserción, inversión e isocromosoma) o inestables (anillo, dicéntrico, acéntrico, trirradio y cuadrirradio).

Las anomalías cromosómicas están presentes en al menos el 10% de los espermatozoides y en el 25% de los óvulos maduros. Estas anomalías cromosómicas, ganancias o pérdidas de segmentos o cromosomas completos, son comunes en humanos y se observan en 1/380 nacidos vivos (Traversa et al., 2010). Entre el 15 y el 20% de todos los embarazos conocidos terminan en aborto espontáneo. Se han observado desequilibrios cromosómicos en embriones preimplantación principalmente en forma de aneuploidías y translocaciones que pueden conducir a la muerte del embrión o el desarrollo de un embrión afecto (Voullaire et al., 2000; Wells y Delhanty, 2000). La incidencia de anomalías cromosómicas en embriones se incrementa con la edad materna avanzada (Fragouli et al., 2006b; Kuliev et al., 2003; Pellestor et al., 2003). Las principales causas de abortos espontáneos y fallos repetidos de implantación son estas anomalías cromosómicas numéricas y estructurales (Hodes-Wertz et al., 2012; Kim et al., 2010; Munné et al., 2000; Raziel et al., 2002; Tulay, 2017; Verlinsky et al., 2005). Estas observaciones indican que las anomalías cromosómicas son responsables de la pérdida de una proporción muy elevada de la totalidad de las concepciones humanas.

II.2.2.3.1. Anomalías cromosómicas estructurales.

Las anomalías cromosómicas estructurales se producen por rotura del cromosoma con reunificación posterior en una configuración diferente. Pueden ser equilibradas o desequilibradas. En las configuraciones equilibradas el complemento cromosómico está completo, sin pérdidas ni ganancias de material genético. En consecuencia, estas alteraciones en equilibrio son por lo general inocuas, con la excepción de los casos en los que uno de los puntos de rotura daña a un gen funcional importante. Pueden ser causadas por una reparación anormal del ADN, ruptura cromosómica, fusión céntrica seguida de una mala segregación de ese cromosoma o por la formación de isocromosomas o eliminación terminal acompañada de una duplicación del resto del cromosoma (Vanneste et al., 2009).

Las alteraciones cromosómicas estructurales equilibradas son comunes en humanos y presentan una frecuencia de portadores en torno al 0,1-0,2% (Ogilvie et al., 2001), pudiendo llegar al 5% en individuos infértiles que están bajo ciclos de fecundación in vitro (FIV). Las anomalías cromosómicas pueden surgir en tres etapas durante el desarrollo humano: la gametogénesis, la fecundación o la embriogénesis. El análisis cromosómico en gametos y embriones humanos se puede realizar para tratar problemas de infertilidad.

Entre los varios tipos de alteraciones cromosómicas estructurales se encuentran las translocaciones Robertsonianas, las translocaciones recíprocas y las inversiones.

II.2.2.3.1.1. Translocaciones Robertsonianas

La translocación Robertsoniana es una de las translocaciones estructurales equilibradas más comunes en los humanos. Este tipo de reordenamiento se ha descrito únicamente entre los cromosomas denominados acrocéntricos: 13, 14, 21, 22 y 15. En este tipo de alteración estructural, los brazos cortos de los cromosomas se pierden y los brazos largos de dos cromosomas distintos se fusionan en la región centromérica (fusión céntrica). La pérdida de los brazos cortos no es deletérea, ya que contienen mayoritariamente genes

para el ARN ribosómico que, a su vez, están presentes en múltiples copias en el resto de cromosomas acrocéntricos. Como resultado de la fusión, el número total de cromosomas se reduce a 45. Como no hay pérdida ni ganancia significativa de material genético, esta alteración se considera funcionalmente equilibrada y sin consecuencias médicas para la persona afectada. La incidencia global de las translocaciones Robertsonianas en la población general es de 1/900 nacidos vivos, 1,8% en parejas con abortos recurrente y 2–3% en hombres infértiles (Fryns y Van Buggenhout, 1998; Nielsen y Wohlert, 1991; Therman et al., 1989; Traversa et al., 2010).

La translocación Robertsoniana más frecuente es la que incluye los cromosomas 13 y 14 (Anton et al., 2004). Las translocaciones entre los cromosomas 14 y 21 son menos comunes, y otras posibles combinaciones son poco frecuentes.

Estudios previos han demostrado que la segregación cromosómica en hombres y mujeres portadoras de translocaciones Robertsonianas producen predominantemente gametos normales o equilibrados (segregación alterna). Además, la frecuencia de gametos normales/equilibrados es mucho más alta en hombres que en mujeres (Guttenbach et al., 1997; Munné et al., 2000). Los estudios han demostrado que las mujeres portadoras de una translocación Robertsoniana entre los cromosomas 13 y 21 o 14 y 21, tienen un riesgo cercano al 10% de tener un descendiente con síndrome de Down, mientras que en los varones el riesgo es del 1 al 3%.

Las translocaciones Robertsonianas pueden ocurrir *de novo* en aproximadamente el 50% de los casos, o ser transmitida por los progenitores. Como consecuencia de este tipo de translocaciones la fertilidad se puede ver afectada, de forma que se observan distintos grados de oligoastenoteratozoospermias, y/o el desarrollo del embarazo, debido a una posible alteración de la gametogénesis y/o a la producción de gametos con una combinación no equilibrada. Un cigoto no equilibrado puede presentar una monosomía o una trisomía.

II.2.2.3.1.2. Translocaciones recíprocas

Las translocaciones recíprocas son reorganizaciones cromosómicas que se producen cuando dos fragmentos terminales de dos cromosomas no homólogos se rompen e intercambian posiciones, lo que puede conducir a embarazo de fetos con anomalías. Los portadores de estas translocaciones tienen pocas probabilidades de producir gametos normales o equilibrados y la proporción de formas desequilibradas pueden variar de un 23% a un 81%.

Con la excepción de la translocación recíproca más común t(11;22)(q23.2;q11.2) (Iselius et al., 1983) cualquier punto de cualquier cromosoma puede estar involucrado en este tipo de reordenamiento, lo que hace que la mayoría de las translocaciones sean únicas y específicas de una familia.

La mayoría de las translocaciones recíprocas suelen ser *de novo*, 1 de cada 700 nacimientos es portador de una translocación recíproca equilibrada (Nielsen y Wohlert, 1991) y su frecuencia es seis veces superior en la población de individuos infértiles (De y Dao, 1991).

Así, aproximadamente el 3% de las parejas con antecedentes de infertilidad presentan una translocación recíproca (Fryns y Van Buggenhout, 1998; Meza-Espinoza et al., 2008)

Los individuos portadores de estas translocaciones equilibradas presentan un fenotipo normal. Sin embargo, tienen altas tasas de gametos desequilibrados después de la segregación meiótica que pueden estar asociados con aborto espontáneo, infertilidad y descendientes con discapacidad física y/o mental.

Los hombres y las mujeres portadoras de translocaciones producen la misma cantidad de gametos equilibrados/desequilibrados (Lledó et al., 2010; Munné, 2005), pero con una distribución diferente en los modos de segregación. Los hombres producen un mayor número de segregaciones adyacentes-2 y las mujeres producen más segregaciones 3:1 (Ogilvie y Scriven, 2002; Scriven et al., 2013). En ambos casos, el resultado es la generación de gametos desequilibrados con respecto a los cromosomas implicados en la translocación.

II.2.2.3.1.3. Inversiones

Las inversiones son alteraciones cromosómicas estructurales que se producen por la rotura en dos puntos que afectan a un único cromosoma, y en el que el segmento tiene una posición invertida. Si el segmento invertido afecta al centrómero se denominan *pericéntricas*. Si solo afecta a un brazo se denominan *paracéntricas*. Estas reorganizaciones cromosómicas pueden estar también relacionadas con infertilidad, abortos de repetición y descendencia cromosómicamente desequilibrada. El riesgo de descendencia desequilibrada para los portadores de inversión que se producen a través de un recombinante, se estima en el 5% para los hombres y 10% para las mujeres (Sutherland et al., 1976).

Las inversiones son las reorganizaciones cromosómicas de menor incidencia en la población, entre el 1-2% para las pericéntricas (Kaiser, 1984) y entre el 0,002-0,049% para las paracéntricas (Ferguson-Smith y Yates, 1984). Estas frecuencias son entre 3 y 20 veces superiores en la población infértil (Mau-Holzmann, 2005).

En la mayoría de los casos, las regiones de heterocromatina están implicadas en este reordenamiento. En tal caso, se consideran polimorfismos sin consecuencias fenotípicas como por ejemplo 1qh, 9qh y 16qh. La inversión más común que no incluye regiones de heterocromatina es la que involucra al cromosoma 2 (McKinlay Gardner y Sutherland, 1996). Esta inversión pericéntrica ha sido asociada con abortos de repetición, anomalías congénitas y retraso mental (Kleczkowska et al., 1987).

II.2.2.3.1.4. Inserciones

Son una forma de translocación no recíproca que ocurre cuando un segmento de un cromosoma se inserta en otro diferente, bien en su orientación original o invertido con respecto al centrómero. La inserción simple implica tres roturas donde las dos primeras eliminan la parte del cromosoma y el segmento se reinserta dentro del tercer punto de

rotura. Las inserciones, especialmente las de menor tamaño, pueden transmitirse de una generación a otra sin ser detectadas. Las inserciones son uno de los reordenamientos con riesgo reproductivo alto. Aproximadamente el 32% de los hombres y el 36% de las mujeres portadoras tienen descendencia cromosómicamente anormal (Van Hemel y Eussen, 2000).

II.2.2.3.1.5. Deleciones

Consisten en la pérdida de una parte de un cromosoma y se traduce en una monosomía para ese segmento del cromosoma. Una deleción muy grande es habitualmente incompatible con la supervivencia a término y, en general, cualquier deleción que produzca la pérdida de más del 2% del genoma haploide total tendrá un resultado letal.

Los individuos portadores de reordenamientos cromosómicos tienen la opción de buscar un embarazo de manera natural, sin ayuda médica, y su fin es tener un hijo cromosómicamente normal. Algunos de estos portadores pueden haber tenido un hijo anormal debido a anomalías cromosómicas, y algunos de estos portadores, especialmente portadores de translocación, pueden haber experimentado abortos espontáneos repetidos.

Por lo tanto, estos pacientes pueden optar por buscar diferentes opciones para evitar tales experiencias. Estas parejas pueden optar por la donación de gametos, el diagnóstico prenatal o el test genético preimplantacional.

II.2.2.3.2. Anomalías cromosómicas numéricas.

Las anomalías cromosómicas numéricas constituyen las alteraciones genéticas más frecuentes de la población en general. Consisten en la pérdida o la ganancia de uno o más cromosomas, referida como aneuploidía, o la adición de uno o más complementos haploides, conocida como poliploidía. La pérdida de un solo cromosoma produce una monosomía. La ganancia de uno o dos cromosomas homólogos se denomina trisomía o tetrasomía, respectivamente. Su incidencia se incrementa con el aumento de la edad materna. Las más frecuentes son: síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21), síndrome de Edwards (trisomía del cromosoma 18), síndrome de Patau (trisomía del cromosoma 13).

La aneuploidía es el principal factor genético que afecta el éxito reproductivo en humanos. Una gran cantidad de embriones que son morfológicamente normales no implantan o derivan en abortos espontáneos al principio del embarazo debido a que la dotación cromosómica no es diploide. Numerosos estudios han analizado los cromosomas de los gametos humanos y de los embriones preimplantación, y demuestran que la aneuploidía puede surgir durante la meiosis o después de la fertilización. La mayoría de los errores meióticos se derivan del ovocito. Existe una alta prevalencia de anomalías cromosómicas de origen materno y un aumento del número de aneuploidías correlacionado con la edad de la madre (Fishel et al., 2010; Fragouli et al., 2010; Kuliev et al., 2003).

Desde las aplicaciones iniciales del TGP para el estudio de enfermedades monogénicas y ligadas a los cromosomas sexuales, las indicaciones se han ampliado para el estudio de aneuploidías en los embriones antes de su implantación.

La aneuploidía cromosómica es, en su mayor parte, adversa para el desarrollo y se han observado para todos los cromosomas en abortos espontáneos. Es muy común y ocurre en alrededor del 4% de los embarazos clínicamente reconocidos. Sin embargo, se estima que el 60% de las concepciones son aneuploides, pero se abortan espontáneamente, incluso antes de que el embarazo se haya reconocido clínicamente (Hassold et al., 1993).

El TGP-A se aplica en pacientes de edad materna avanzada, con abortos de repetición, con fallos repetidos de implantación e infertilidad masculina. A diferencia de las alteraciones descritas en los apartados previos, estos grupos de pacientes no presentan un trastorno genético y poseen un cariotipo normal. La pérdida de un cromosoma (monosomía) es mucho más perjudicial que la ganancia de un cromosoma (trisomía). Las anomalías cromosómicas numéricas son las principales encontradas en los estudios de abortos espontáneos, siendo las más frecuentes las trisomías autosómicas (26,8%) y las poliploidías (9,8%), seguidas por la monosomía para el cromosoma X (8,6%) que se presenta con mayor frecuencia en las pérdidas gestacionales del primer trimestre (Hassold et al., 1996).

La afectación de los autosomas suele estar asociada a errores en la meiosis I materna (Nicolaidis y Petersen, 1998). En cuanto al origen de las trisomías en los cromosomas sexuales, las principales causas son la no-disyunción durante la meiosis paterna o las divisiones post-cigóticas (Jacobs y Hassold, 1995). En cuanto al origen de las triploidías, la mayor parte son de origen paterno, debido a la fecundación de un ovocito por más de un espermatozoide o también debido a la fecundación de un ovocito por un espermatozoide diploide, frecuentes en varones con oligozoospermia (Egozcue et al., 2002).

El objetivo principal de TGP-A es analizar los embriones obtenidos mediante FIV para detectar aneuploidías que surgen espontáneamente en la gametogénesis humana, más prevalentes en la meiosis femenina o en el desarrollo embrionario temprano (Hassold et al., 2007; Wells y Delhanty, 2001).

Los criterios de selección morfológicos del embrión no muestran una correlación estrecha con la euploidía. Embriones de buena calidad morfológica pueden presentar alteraciones cromosómicas que interfieran en su implantación, y al contrario, embriones clasificados como euploides pueden no presentar una buena morfología o incluso detenerse en su desarrollo.

La aneuploidía es una característica común en embriones preimplantacionales y causa bajas tasas de éxito y altos índices de aborto espontáneo en los tratamientos de reproducción asistida (Menasha et al., 2005; Spandorfer et al., 2004). Aunque los embriones con monosomías autosómicas son letales, los embriones con algunas trisomías (13, 18 y 21) tienen elevadas posibilidades de supervivencia con el riesgo de desarrollar trastornos genéticos (Munné et al., 2003), y algunas trisomías (15, 16 y 22) pueden causar detención del desarrollo embrionario o fallos de implantación (Iwarsson et al., 1999; Macklon et al., 2002). Por lo tanto, la selección de un embrión con un complemento cromosómico normal

ayuda a mejorar las tasas de implantación y aumenta las posibilidades de nacimiento de un descendiente sano.

II.2.2.3.2.1. Edad Materna avanzada

La edad tiene cada vez más importancia en las Técnicas de Reproducción Asistida debido al retraso de la maternidad de muchas mujeres. Se considera edad reproductiva avanzada a partir de los 37 años. Se conoce que a medida que aumenta la edad de la madre la tasa de implantación disminuye. Varios factores podrían estar implicados en este descenso, de los cuales los dos más aceptados son la disminución de la receptividad del útero y el envejecimiento de los ovocitos (Meldrum, 1993), aunque también se han descrito elevadas tasas de embarazo en mujeres de edad avanzada receptoras de ovocitos de donantes jóvenes (Abdalla et al., 1993; Sauer et al., 1996).

Existen muchas evidencias de la implicación ovárica en los problemas de fertilidad de mujeres de ≥ 37 años, especialmente de la elevada incidencia de aneuploidías en sus ovocitos (Fragouli et al., 2006a; Nicolaidis y Petersen, 1998; Pellestor et al., 2005, 2003). Se estima que el 20% de los ovocitos humanos son aneuploides, pudiendo llegar al 70% en mujeres de edad materna avanzada (Hassold y Hunt, 2001).

Diversas teorías se han postulado para tratar de explicar el porqué del aumento de las aneuploidías con el aumento de la edad de la mujer: dotación de ovocitos limitada, debilitamiento de la cohesión centromérica y pérdida de cohesinas, hipótesis de “doble golpe”, cambios a nivel de los mecanismo reguladores de la división celular, etc.... Sin embargo, ninguna es capaz de explicar por sí sola este incremento, por lo que quizás sea una combinación de varios mecanismos (Danylevska et al., 2014).

Las pacientes de edad avanzada presentan una alta incidencia de aneuploidías ovocitarias que implica un riesgo mayor de aneuploidías en la descendencia, en concreto para los cromosomas 13, 18 y 21 (Hook et al., 1988), y de abortos espontáneos (Fritz et al., 2001).

En la mayoría de los estudios prospectivos randomizados publicados referidos a edad materna avanzada y en los que se utiliza la técnica de FISH para el análisis de los embriones no encontraron mejora en la tasa de gestación evolutiva o recién nacido vivo tras TGP-A (Debrock et al., 2010; Hardarson et al., 2008; Mastenbroek et al., 2007; Staessen et al., 2004). Sin embargo, en otros casos se encontró mejora con TGP-A en cuanto a la tasa de implantación o de embarazo a término (Schoolcraft et al., 2009; Staessen et al., 2004) y a la tasa de gestación (Werlin et al., 2003).

El uso de los “arrays” de CGH (aCGH) en TGP-A para el análisis de los 24 cromosomas ha permitido mejorar los resultados clínicos respecto al análisis mediante FISH, tanto en pacientes infértiles menores de 40 años como en pacientes a partir de 40 años. Así se ha obtenido una mejora de un 20% en las tasas de gestación e implantación.

II.2.2.3.2.2. Aborto de repetición

La definición de aborto de repetición se ha debatido durante mucho tiempo y difiere entre las sociedades internacionales. Para la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología y el Real Colegio de Obstetras y Ginecólogos (RCOG), se refiere a tres pérdidas

consecutivas de embarazos, incluidas las no visualizadas. Sin embargo, según la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva se define como dos o más pérdidas clínicas del embarazo (documentadas mediante ecografía o examen histopatológico), pero no necesariamente consecutivas.

El aborto de repetición es un importante problema de salud reproductiva, ya que afecta al 2% -5% de las parejas y en el 50% de los casos no existe una causa aparente (Li et al., 2002). La gran mayoría de las pérdidas tempranas del embarazo (50% -60%) son consecuencia de anomalías cromosómicas, que pueden ser de origen parental o surgir *de novo* en el embrión de padres con cromosomas normales (Sugiura-Ogasawara et al., 2012; Werner et al., 2012).

Con respecto al uso del TGP en pacientes con aborto de repetición, cabe mencionar que solo se ha publicado un estudio prospectivo randomizado (Werlin et al., 2003) utilizando la técnica de FISH para el análisis cromosómico. En ese estudio se comparó la tasa de gestación entre un grupo de aborto de repetición, y un grupo control y se concluyó que existía una elevada incidencia de aneuploidías en este grupo y una mejora en la tasa de embarazo del grupo de TGP frente al grupo control (63,6% vs. 37,5%).

En los estudios realizados hasta el momento, no está del todo claro que se pueda reducir la tasa de aborto únicamente mediante una selección cromosómica (Munné et al., 2005; Rubio et al., 2005; Werlin et al., 2003), ya que otros factores como factores uterinos, Síndrome antifosfolípido, trombofilias, factores endocrinos, factores ambientales y psicológicos podrían estar también implicados.

II.2.2.3.2.3. Fallo repetido de implantación

Podemos definir fallo repetido de implantación como aquellos casos de parejas con tres o más intentos de FIV-sin éxito, o con transferencia de 10 o más embriones de buena calidad sin conseguir gestación (Pgd y Steering, 2002).

La incidencia de pérdida del embarazo después de la implantación natural es alta (se estima en torno al 25% - 40%) (Zinaman et al., 1996). Del número total de embarazos que fracasan, el 75% representa un fallo de implantación y, por lo tanto, no se reconoce clínicamente como embarazo (Norwitz et al., 2001).

Pueden existir varias causas para el fallo de implantación y están poco definidas. Entre ellas, se pueden mencionar elevada incidencia de aneuploidías, factores endometriales, patologías uterinas, factores embrionarios o incluso una inadecuada técnica de transferencia embrionaria (Donoso et al., 2007).

En cuanto a los problemas relacionados con el embrión o la incidencia de aneuploidías, no existen muchos estudios prospectivos randomizados en pacientes con fallo repetido de implantación y análisis de los 24 cromosomas. Algunos de los estudios con TGP refieren hasta el 67% de los embriones aneuploides en pacientes con fallo de implantación (Pehlivan et al., 2003), así como un porcentaje de ciclos con transferencia embrionaria del 79,2%, una tasa de gestación por transferencia del 57,0%, una tasa de implantación del 50,9% y una tasa de niño en casa del 43,1%(Rodrigo et al., 2014).

II.2.3.2.4. Factor masculino

El factor masculino participa en la etiología de la esterilidad en un elevado porcentaje de los casos (30-50%) y es uno de los desencadenantes de un alto grado de aneuploidías en el embrión. El TGP se recomienda a pacientes con azoospermia, obstructiva o no obstructiva. En los embriones derivados de estos pacientes se ha detectado un elevado número de alteración cromosómicas (Rubio et al., 2005). También para pacientes con teratozoospermia severa que presentan un número incrementado de aneuploidías en sus espermatozoides (Calogero et al., 2003). Sin embargo, no existen muchos estudios que demuestren un efecto positivo del TGP sobre la tasa de implantación y embarazos para estas indicaciones.

En el caso de pacientes con FISH de espermatozoides alterados o con resultado previo de meiosis alterada, el TGP se aplica de una manera más habitual (Sánchez-Castro et al., 2009).

II.2.2.4. Ciclo de fecundación *in vitro*.

El procedimiento del DGP requiere de un tratamiento de fecundación *in vitro* mediante estimulación ovárica controlada con FSH (Hormona folículo estimulante) y LH (Hormona luteinizante) que permite obtener múltiples ovocitos. La estimulación ovárica ha de ser algo mayor que para un ciclo de FIV, puesto que necesitamos un mínimo número de ovocitos para completar un ciclo de DGP con ciertas garantías.

El siguiente paso es la recuperación de los ovocitos mediante punción transvaginal ecoguiada (día 0). Los ovocitos maduros recuperados (MII: meiocitos en metafase II), tras ser decumulados, son inseminados mediante la técnica ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) para evitar la contaminación de ADN de otros espermatozoides o de células de la granulosa adheridas a la zona pelúcida. Hasta el día 3 de desarrollo embrionario el ciclo de PGD es como un ciclo de FIV convencional.

En condiciones *in vitro*, después de la fecundación, el cigoto humano se divide aproximadamente cada 24 horas durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. De esta manera, la biopsia se puede realizar en diferentes estadios que se denominan biopsia de corpúsculo polar (día 0), biopsia de blastómeros (día 3) y biopsia de blastocistos (día 5/6).

II.2.2.5. Biopsia embrionaria.

La biopsia embrionaria es necesaria para la obtención de las células embrionarias. La biopsia embrionaria se realiza siempre en los laboratorios de fecundación *in vitro* incluidos en los Centros de Reproducción Asistida, y es allí donde se entuba el material biopsiado para su posterior procesamiento y análisis genético, tanto por PCR como por "array"-CGH o secuenciación masiva.

La biopsia de los embriones es un paso muy importante del test genético preimplantacional que permite tomar una muestra del material celular del embrión, sin perjudicar su evolución y posterior implantación.

El proceso de biopsia implica dos pasos, abrir la ZP y extraer la célula. Para la apertura de la ZP pueden utilizar tres diferente métodos, el mecánico con una fina aguja, el químico con

ácido de tyrodes y mediante la técnica del Laser, para luego extraer la célula (Blastómero) o células del trofoectodermo mediante aspiración. Las diferentes técnicas de biopsia, aparecen extensamente explicados en una revisión de De Vos and Van Steirteghem (2001).

En los primeros años, la etapa mayoritariamente utilizada para realizar la biopsia es en día 3 de cultivo, cuando los embriones cuentan con 6-8 células. Desde que en 2013, Scott y colaboradores, demostraron una reducción relativa en la tasa de implantación del 39% en los embriones biopsiados en día 3 respecto a los embriones biopsiados en día 5, la técnica de biopsia utilizada actualmente se realiza el día 5 o 6 de cultivo embrionario, cuando el embrión se encuentra en estadio de blastocisto (Scott et al., 2013b).

La biopsia del embrión en estadio de blastocisto: En esta fase, el embrión se ha diferenciado en trofoectodermo, que originará más tarde la placenta, y en masa celular interna, que originará el feto. Una de las mayores ventajas que da la biopsia en estadio de blastocisto radica en poder extraer 5-10 células, lo que permite obtener una mayor cantidad de material genético gracias al mayor número de células. Esto mejoraría teóricamente la sensibilidad y especificidad del DGP, y se asocia con menores tasas de mosaicismo y la reducción de los errores de diagnóstico.

La biopsia de 5 a 10 células del trofoectodermo de un blastocisto de 100 o 150 células corresponde a una menor proporción de pérdida masa celular (3,3% a 10%) que la biopsia de uno o dos blastómeros de un embrión de 6 a 8 células, que reduce el contenido celular en un 12.5% a 33% (De Vos et al., 2009). Se han descrito tasas de implantación tras TGP significativamente superiores tras la biopsia de blastocisto que tras la biopsia en día 3 (Harton et al., 2013).

La técnica de biopsia que se utiliza en este caso es la de láser. Existen dos procedimientos:

- a) Se deja el embrión en cultivo hasta el día 3 post inseminación donde se realiza el “hatching” y, posteriormente, la biopsia de trofoectodermo mediante láser en día 5/6 (blastocisto).
- b) Se realiza el “hatching” el mismo día 5/6 (blastocisto) previo a la biopsia del trofoectodermo mediante láser.
- c) En este caso, aunque se tienen más células para el diagnóstico, se estima que sólo entre el 40-60% de los embriones de día 3 pueden llegar a blastocisto. Además tras la biopsia, es necesario proceder a vitrificar cada embrión a la espera de los resultados genéticos.

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas
Biopsia Corpúsculo polar	Etapa más temprana en la que las células se pueden obtener. Basado en la premisa de que la composición cromosómica de CP refleja la del ovocito	Maximiza el tiempo para el análisis genético en el caso de la transferencia de embriones frescos. Potencialmente menos invasivo.	Asume que la aneuploidía embrionaria es el resultado de la no disyunción en la meiosis materna, aunque, de hecho, esto solo puede representar el 66%, y deja un tercio de las aneuploidías sin detectar. Puede que no sea rentable: se

		Sin efecto aparente sobre las tasas de fertilización o la evolución de embriones	toman muestras de 2 CP por ovocito, y no todos llegarán a embriones
Biopsia de blastómeros	Biopsia 3 días después de la fertilización, en la etapa de 6 a 10 células La biopsia de blastómeros se ve facilitada por la presencia de medio libre de Ca/Mg, que interrumpe las uniones celulares.	Toma de muestras del propio embrión, por lo tanto, más representativo de su composición cromosómica que la biopsia de CP	Requiere la eliminación de una proporción significativa de las células del embrión. Puede tener un impacto adverso en la viabilidad del desarrollo y las tasas de implantación. Las células biopsiadas pueden no ser representativas de todo el embrión, dado que hasta el 29% de los embriones preimplantacionales son mosaicos
Biopsia de trofoectodermo	Agujero realizado en la zona pelúcida en el día 3, luego cultivado a la etapa de blastocisto. Algunas células de trofoectodermo salen a través del orificio en la zona pelúcida y se biopsian para el diagnóstico, dejando la masa celular interna intacta.	Sin impacto adverso sobre el potencial de implantación. Permite tener más células para el análisis. Mayor eficacia asociada con el cultivo hasta los días 5 a 6, ya que muchos embriones anormales no alcanzan la etapa de blastocisto	Es la última etapa en la que se realiza la biopsia limitando el tiempo de análisis genético antes de la transferencia de embriones frescos. En consecuencia, los laboratorios vitrifican los embriones después de la biopsia. Aun así, esta estrategia de vitrificación puede dar lugar a mayores tasas de embarazo. La composición cromosómica del trofoectodermo puede no ser representativa de la masa celular interna en hasta el 4% de los casos

(Kane et al., 2016)

II.2.2.6. Análisis genético.

En las células biopsiadas, representativas del resto del embrión, se va a realizar el estudio y diagnóstico de las alteraciones cromosómicas o genéticas de los embriones. En principio, cualquier enfermedad causada por una mutación en un gen conocido puede ser diagnosticada en célula única o en el trofoectodermo. Las células biopsiadas se procesan mediante una técnica que permite una amplificación completa del ADN (WGA o MDA) hasta producir una cantidad suficiente para ser analizado con las técnicas disponibles.

Los resultados del estudio genético pueden estar disponibles en uno o dos días con transferencia de embriones en el ciclo en fresco, o los embriones después de la biopsia se pueden vitrificar a la espera de los resultados del estudio genético. En este caso, se programará posteriormente su transferencia en un ciclo de transferencia de embriones congelados (TEC).

II.2.2.6.1. Análisis genético de enfermedades monogénicas.

Para la realización de los estudios genéticos de enfermedades monogénicas mediante PCR clásica, previo a la realización del ciclo de fecundación in vitro y una vez aceptado el caso para su estudio, se debe realizar un estudio previo que lleva por nombre "Estudio de informatividad".

En esta fase previa, se realizan pruebas de caracterización genética de las enfermedades a diagnosticar en los padres portadores así como en otros miembros de la familia, con el fin de disponer del máximo de información previo a la aplicación del DGP.

Para poder realizar un diagnóstico genético, se debe conocer el gen causante de la enfermedad y su localización exacta en el genoma. Esto permitirá abordar el estudio de una manera directa, estudiando la mutación, o indirectamente estudiando los STRs o microsatélites cuyos alelos están ligados o no a la mutación, lo que permite establecer el haplotipo que segrega con la mutación responsable de la enfermedad

Con el estudio de informatividad se pretende establecer, por tanto, cuál es el haplotipo asociado a la mutación, por lo que será necesario incluir en el análisis tanto a la pareja consultante como a sus progenitores. Este proceso se basa en la ley de la segregación genética que se refiere a la observación de que cada individuo posee dos genes para una característica particular pero solo transmite uno de ellos: la descendencia hereda un gen paterno y un gen materno. En los estudios de informatividad a partir de los individuos afectados, se infiere el haplotipo que contiene la mutación y que se ha ido heredando en sucesivas generaciones, para posteriormente ser capaces de analizar si el embrión ha heredado el haplotipo que contiene la mutación o no (Figura 5).

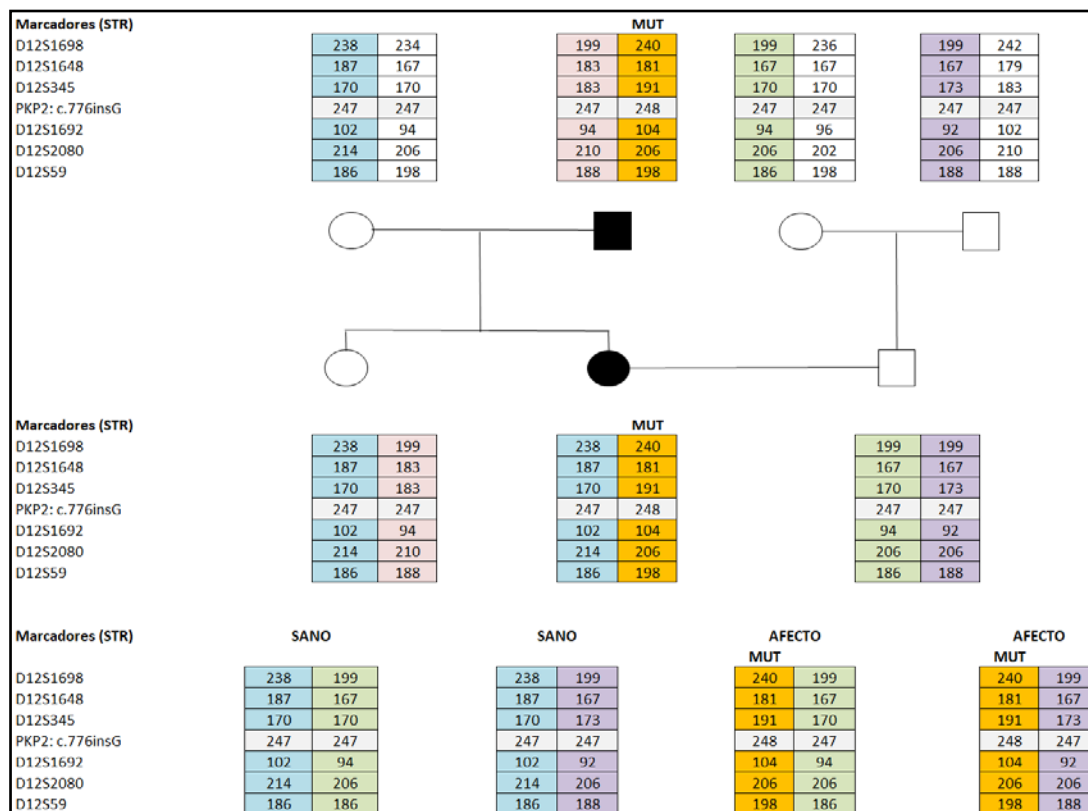


Figura 5. Representación de un árbol genealógico de familia (dos generaciones) portadora de Displasia arritmogénica del ventrículo derecho, enfermedad autosómica dominante. Se muestra el tamaño de los alelos para cada uno de los marcadores STRs estudiados en los familiares. El haplotipo que segrega con la mutación aparece en color naranja (MUT). En la parte inferior se representan los posible haplotipos que podrán estar presentes en los embriones.

En ciertas enfermedades monogénicas, no es posible realizar el estudio directo de la mutación y la única manera de abordar el estudio es mediante el análisis de STRs para determinar el haplotipo que segrega con la enfermedad, *estudio indirecto*. En estos casos es de obligado cumplimiento realizar el estudio de informatividad con al menos 3 familiares afectados. Esta opción abre la posibilidad de aplicar un mismo estudio a diferentes parejas que cursan con mutaciones privadas para una enfermedad genética, como puede ser la Neurofibromatosis tipo 1, sin tener que diseñar el estudio de la mutación en cada caso. Aunque esto no significa que utilicemos los mismos marcadores para cada pareja, ya que dependerá del estudio previo de informatividad.

En otros casos, además del análisis de STRs, es posible realizar el *estudio directo* de la mutación. Como por ejemplo una delección, inserción o la expansión de un triplete, donde los fragmentos a analizar difieren en tamaño y se pueden detectar mediante electroforesis capilar o análisis de fragmentos (Sermon et al., 1998). O el caso de las mutaciones puntuales donde la minisequenciación o SNaPshot permite la identificación de muchas mutaciones específicas (Fiorentino, 2003).

Una vez finalizado el estudio de informatividad, los pacientes pueden comenzar con el ciclo de FIV para realización del Test Genético Preimplantacional. El TGP informará únicamente de la alteración que se está analizando, por lo que cualquier otra variante no sometida a análisis o de la que no hayamos sido informados, así como posibles alteraciones cromosómicas, no se determinan.

II.2.2.6.2. Análisis genético de anomalías numéricas y estructurales.

Para el estudio de anomalías numéricas y estructurales mediante las técnicas recientes (“array”-CGH, NGS...), a diferencia del estudio de enfermedades monogénicas, no es necesario realizar un estudio de informatividad en la pareja y sus familiares.

En los casos de anomalías cromosómicas estructurales (translocaciones recíprocas, Robertsonianas, inversiones) siempre es obligatorio disponer del informe del cariotipo convencional de los pacientes con el fin de determinar si es posible abordar el TGP o elegir la técnica más adecuada. La técnica que habitualmente se ha empleado en los últimos años para el TGP para la detección de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales ha sido el “array”-CGH, aunque a partir de 2017, ha sido sustituida por la secuenciación masiva.

Capacidad diagnóstica	aCGH	Array SNP	qPCR	NGS
Análisis de 24 cromosomas	Sí	Sí	Sí	Sí
Dísimia uniparental	No	Sí	Sí	No
Detección de reordenamientos cromosómicos estructurales equilibrados	No	Sí	No	No
Haploidía y poliploidía	Limitado	Sí	Sí	Limitado

Aneuploidías parciales	Sí	Sí	No	Sí
Ventajas	Aplicación clínica generalizada	Detecta una amplia gama de anomalías cromosómicas	Resultados rápidos (~4h)	Mayor resolución. Detección de mosaicismo. Automatización. Mayor rendimiento
Desventajas	Detección limitada de mosaicos; la tasa de aborto post-TGP es ~ 10% después de aCGH en comparación con ~4% después de NGS (predominantemente debido a mosaicos)	Relativamente caro por muestra	Solo se analizan unos pocos loci por cromosoma, lo que resulta en una resolución significativamente menor.	Coste elevado del equipo

(Kane et al., 2016)

II.2.2.6.3. Mosaicismo Cromosómico.

El mosaicismo cromosómico es la presencia de 2 o más líneas celulares con una constitución genética diferente, es decir células con diferente componente cromosómico en un embrión. Algunas células son diploides normales y otras aneuploides en el mismo embrión, o incluso que diferentes células tienen diferentes tipos de aneuploidías (van Echten-Arends et al., 2011). Es un fenómeno frecuente en embriones derivados de ciclos de fecundación in vitro FIV (Figura 6).

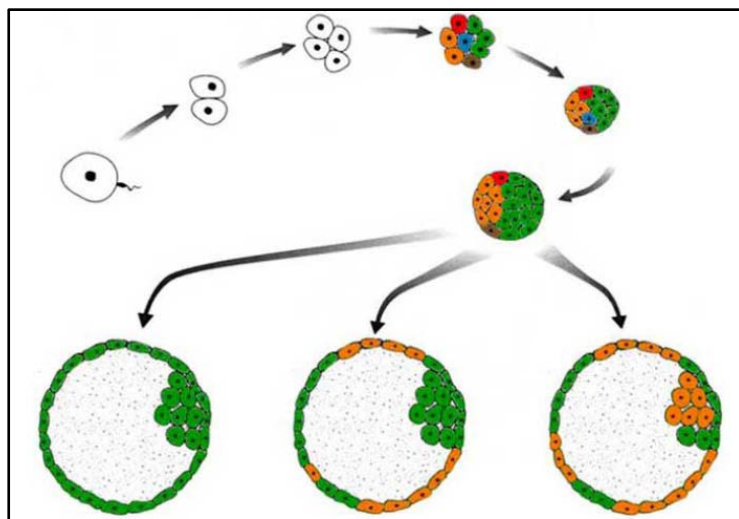


Figura 6. Representación del mosaicismo embrionario. (Robberecht et al., 2010)

Ocurre durante el desarrollo embrionario humano temprano, afectando, al menos, al 30% de los embriones en la etapa de blastocisto. El mosaicismo se ha relacionado con enfermedades genéticas, abortos espontáneos y muerte embrionaria temprana en periodo preimplantatorio (Hassold y Hunt, 2001). Las aneuploidías pueden encontrarse en todas las células presentes del embrión por un error en la meiosis o sólo en algunas, en forma de mosaico. El mosaicismo se debe fundamentalmente a errores de segregación cromosómica

post-cigótica, durante las primeras divisiones mitóticas y antes de cualquier evento de diferenciación celular. A diferencia de las aneuploidías de origen meiótico, la aparición del mosaicismo es totalmente independiente de la edad materna (Munné et al., 2002).

El origen del mosaicismo puede deberse a diferentes mecanismos, que llevan a la ganancia y/o pérdida de cromosomas:

- No disyunción mitótica.
- Retraso en anafase: pérdida de un cromosoma mediante la formación de micronúcleos causada por el retraso en la migración del cromosoma durante la anafase.
- Endorreduplicación.

Tanto el retraso en la anafase como la endorreduplicación parecen ser los dos mecanismos responsables de la mayoría de errores cromosómicos durante el desarrollo embrionario (Taylor et al., 2014).

La extensión del mosaicismo embrionario dependerá del momento en el que se produzca el error mitótico, es decir de la división embrionaria en la que haya tenido lugar la aneuploidía, lo que conllevará a la presencia de distintos porcentajes de cada línea celular.

En cuanto a los beneficios clínicos de realizar PGT-A, el debate se centraba inicialmente en la existencia de mosaicismo desde estadios embrionarios tempranos y la limitación que representaba el análisis de una única célula como representación de la dotación cromosómica de todo el embrión. Varios estudios han demostrado que el resultado del complemento cromosómico de un blastómero en día 3 de desarrollo embrionario es altamente predictivo del estatus cromosómico del embrión en estadio de blastocisto o día 5 de desarrollo (Daphnis et al., 2008; Mir et al., 2010).

La frecuencia de mosaicismo embrionario determinada mediante FISH varía mucho (del 30-90%) en la literatura (Munné et al., 1994; Taylor et al., 2014). Las razones de estas variaciones en el porcentaje de mosaicismo se centran en técnicas de fijación inadecuadas, criterios insuficientes para definir el mosaicismo, muestras procedentes de embriones detenidos, etc...que puede dar lugar a altas tasas de mosaicismo que no son representativas. En estudios con FISH en los que se utilizaron métodos apropiados se estableció una tasa de mosaicismo en torno al 30% tanto en estadio de división como en blastocisto (Bielanska, 2002; Fragouli et al., 2011).

El uso de tecnologías como el "array"-CGH, la qPCR y el "array"-SNP podían detectar a veces el mosaicismo cuando el porcentaje de células aneuploide se encontraba entre el 40%-60%. La tasa de mosaicismo en biopsias de blastocisto con el uso del "array"-CGH se estima en 4,8% -32% y puede variar según los protocolos de array-CGH utilizados (Capalbo et al., 2013b; Fragouli et al., 2011; Greco et al., 2015)

La llegada de la secuenciación masiva permite la detección del mosaicismo con una mayor sensibilidad. Un estudio indicó que el 21% de biopsias de blastocisto contienen una mezcla de células euploides y aneuploides, y que un 10% adicional son mosaicos para dos o más

líneas aneuploides diferentes. En contraste, un estudio presentado en 2015 por Greco et al. determinó una tasa de mosaicismo en biopsias de blastocisto y análisis mediante “array”-CGH del 4,8% (Greco et al., 2015).

Con el incremento estudios que reportan la presencia de mosaicismo mediante el análisis con NGS se plantea la cuestión de si el resultado obtenido en la biopsia del trofoectodermo es indicativo del complemento cromosómico del embrión.

Aparte de las implicaciones que pueda tener la presencia del mosaicismo para el desarrollo del embrión y el nacimiento de niños sanos, se ha hipotetizado que la presencia de mosaicismo es más común en el trofoectodermo que en la masa celular interna, incluso que la presencia de células aneuploides es más común en el trofoectodermo que en la masa celular interna.

En 2016, Garrisi y colaboradores, realizaron varias biopsias en 43 embriones diagnosticados mediante NGS como mosaico. Las rebiopsias de trofoectodermo y masa celular interna (MCI) diagnosticaron cinco embriones (11,6%) como normales en todas las muestras rebiopsiadas y 18 con MCI normal (41,8%). Las biopsias de trofoectodermo que presentaban un mosaicismo complejo, sin embargo, fueron consistentes con el resultado de la MCI el 83% de las veces (Garrisi et al., 2016). Del mismo modo, Maxwell y colaboradores, realizaron múltiples rebiopsias de trofoectodermo en 14 embriones aneuploides / mosaico con el uso de NGS y el mosaicismo se confirmó en el 48,3% (Maxwell et al., 2016).

Las investigaciones publicadas hasta la fecha sugieren que la transferencia de embriones que han sido clasificados como mosaico presentan menores tasas de implantación y mayores tasas de aborto, pero que hasta un 40% de ellos pueden dar lugar a embarazos viables y el nacimiento de descendencia sana (Fragouli et al., 2017; Greco et al., 2015; Munné et al., 2017). El resultado clínico de la transferencia de embriones mosaico puede depender del tipo de aneuploidía y cromosoma implicado y del porcentaje de células anormales, que variará en según la división mitótica en la que se haya originado la aneuploidía. En un reciente estudio publicado en 2018 por Kushnir y colaboradores, concluyen, que el grado de mosaicismo en trofoectodermo es un mal predictor de embarazo y de aborto espontáneo. Además, indican que la eficacia clínica del TGP no es total como prueba de detección rutinaria y que no se debe ofrecer hasta que no se establezca una eficacia, seguridad y rentabilidad (Kushnir et al., 2018).

A pesar del énfasis en los aspectos técnicos y en los procedimientos del TGP, sorprendentemente, sociedades como la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) o la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) no han definido nada en relación a los análisis y resultados que están arrojando los estudios en muestras de trofoectodermo.

El PGDIS y COGEN han sido las únicas sociedades científicas que han definido una serie de recomendaciones o directrices acerca de la transferencia de embriones mosaico, sobre cómo se deben emitir informes de laboratorio y cómo los médicos deben interpretar estos informes.

II.2.3. Fiabilidad del Test genético Preimplantacional: error de diagnóstico.

Son muchos los procesos que están involucrados en el éxito de un tratamiento de fecundación *in vitro* y diagnóstico genético preimplantacional, y de su correcta ejecución depende la transferencia de embriones libres de enfermedades monogénicas o anomalías cromosómicas.

El desarrollo de un embarazo o el nacimiento de un descendiente afecto no implican necesariamente un diagnóstico preimplantacional erróneo. Este es el caso de la transferencia de un embrión con información de diagnóstico limitada que resulta en un embarazo afectado o el de la evolución de un embarazo afectado con un trastorno diferente al que se aplicó una prueba. En este sentido, algunos diagnósticos erróneos son, de hecho, riesgos calculados con resultados no deseados.

Por otro lado, el hallazgo de un error después de la transferencia de embriones que no conduce a un embarazo evolutivo constituye un diagnóstico erróneo a pesar de no tener consecuencias físicas para el paciente involucrado.

De una manera estricta, el diagnóstico erróneo solo debe aplicarse cuando ha fallado un procedimiento técnico, es inexacto o ha sido interpretado de una manera incorrecta, pudiendo ser específicos de la muestra, de la célula/s o de la técnica. Muchos de los errores son independientes de la técnica o el tipo de muestra, y se deben por ejemplo a errores humanos: un etiquetado incorrecto de las muestras, una mala identificación, etc... Todos ellos deberían considerarse evitables y ser los primeros en eliminarse.

Podemos encontrarnos ante dos tipos de errores, un error adverso y uno benigno.

- Error diagnóstico adverso: provocan un resultado grave para el paciente en el que se realiza el estudio. Por ejemplo, el nacimiento de un niño afecto. Las consecuencias pueden ser drásticas tanto para los pacientes como para el profesional que realiza el diagnóstico.
- Error diagnóstico benigno: pueden considerarse “casi errores”. Por ejemplo, el nacimiento de un niño no afectado portador de una mutación, cuando se asumía que el embrión transferido estaba libre de la mutación estudiada.

Periódicamente y como una medida de garantía de calidad, se pueden realizar pruebas confirmatorias en embriones no transferidos para tratar de identificar un diagnóstico erróneo (Thornhill et al., 2005). En cualquier caso, se debe analizar la causa raíz del error, identificar posibles cambios en el proceso y realizar un plan de acciones correctivas y preventivas.

Las posibles causas de diagnósticos erróneos en el TGP basado en PCR pueden deberse a factores humanos, a dificultades técnicas y a la calidad innata de las muestras biopsiadas.

- ADO (Allele Drop-out): es un fenómeno exclusivo de la amplificación de una sola célula y puede tener como consecuencia el diagnóstico erróneo del embrión. Consiste en el fallo de amplificación de uno de los alelos de un marcador concreto, interpretando como homocigoto un embrión heterocigoto (Figura 7). Este hecho

adquiere una especial relevancia en el caso de las enfermedades monogénicas dominantes si el alelo que no se amplifica es el portador de la mutación. La mayoría de las publicaciones describen para la PCR una eficiencia de amplificación en torno al 80% (pudiendo llegar al 90-95%) y unas tasas de ADO del 10% (rango 0-40%).

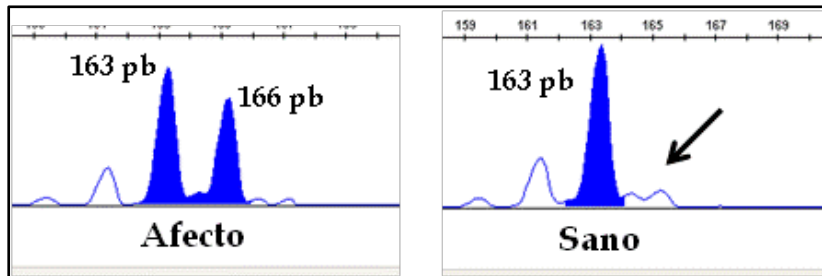


Figura 7. Allele drop-out. La flecha indica la pérdida de uno de los alelos.

- Contaminación: las células del cúmulo o las células espermáticas pueden estar implicadas en los problemas de contaminación si no se realizan los procedimientos correctos durante las etapas de la fertilización embrionaria y la biopsia. El ICSI debe realizarse en todos los diagnósticos de PCR para evitar la contaminación paterna y materna. La contaminación de estas fuentes no está causada por el paso de PCR en sí. Otras fuentes de contaminación incluyen la contaminación del operador o la contaminación por amplicones de las PCRs.
- La disomía uniparental es también una posible causa teórica, y provocar la identificación de un embrión heterocigótico como homocigótico cuando se analiza la mutación sola. La PCR multiplex indica a menudo patrones aparentemente haploides en blastómeros, que también podrían deberse a disomía uniparental.

El FISH tiene una serie de limitaciones reconocidas que pueden conducir a una interpretación incorrecta de los resultados y un resultado potencialmente adverso.

- Problemas inherentes al procesado de las biopsias obtenidas (fijación, células anucleadas, multinucleación, etc.). Se estima que un 7% de los embriones biopsiados no tendrá diagnóstico. Para realizar con eficiencia cualquiera de los métodos de fijación se necesita gran entrenamiento y habilidad por parte del personal.
- Problemas para analizar los 23 pares de cromosomas debido a la limitación en el número de sondas fluorescentes y la pérdida de eficiencia encaso de realizar rondas sucesivas de hibridación sobre una misma muestra de cromosomas.
- Algunas sondas pueden tener hibridaciones cruzadas e hibridar en otros cromosomas.
- Difícil interpretación de los resultados por presencia de señales grandes o difusas, solapamiento de señales y fallos de hibridación.
- Presencia de mosaicismo cromosómico.

Es difícil establecer una tasa general de error diagnóstico, siendo las estimaciones internas de cada laboratorio más fiables. Sin embargo, se han estimado tasas de error diagnóstico de <1% para los casos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y <5% para los casos de

hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Estas estimaciones deben estar disponibles y comunicarse a los pacientes en el consentimiento informado para TGP (Thornhill et al., 2005).

Según datos publicados por la ESHRE PGD Consortium en el año 2009, la tasa de error diagnóstico fue del 0.16% (24/15158) para PCR y FISH. Según datos publicados por la ESHRE hasta el año 2013, la tasa de error diagnóstico informada fue del 0,1% (13/12790) para los ciclos basados en PCR y del 0,05% 21/40640 para los ciclos basados en FISH, y aún no hay datos sobre las nuevas tecnologías de análisis.

Esta disminución puede ser debida a que en los últimos años se ha visto una mayor implementación de sistemas de acreditación y la creación de los primeros esquemas de evaluación externa de la calidad del TGP llevados a cabo desde el año 2009 en adelante. Sin embargo, como muchas de las transferencias de embriones no tienen un seguimiento posterior, y solo una minoría de centros realiza auditorías mediante el reanálisis de embriones no transferidos/ no criopreservados, los números informados en las recopilaciones de datos pueden no reflejar el verdadero error de diagnóstico en el TGP.

Se han reportado algunas tasas de error para procedimientos de FISH con grandes diferencias. En el año 2004, Baart y colaboradores, obtuvieron una tasa de error de hasta el 50% (Baart et al., 2004) y Magli et al. en 2007, una tasa del 3,7% (Magli et al., 2007). Las tasas de error asociadas con aCGH, calculadas al comparar células biopsiadas con el resto del embrión, han sido más bajas, y se han reportado resultados del 1,8% en blastómeros individuales (Gutiérrez-Mateo et al., 2011).

Con el fin de promover la utilización de métodos de diagnóstico robustos en los laboratorios y evitar diagnósticos erróneos, se han publicado una serie de directrices generales, de acuerdo con los estándares de calidad adecuados:

- Guía para la organización de un centro de DGP (G. Harton et al., 2011).
- Guía de biopsia embrionaria (G. L. Harton et al., 2011c).
- Guía para DGP mediante análisis de PCR (G. L. Harton et al., 2011a).
- Guía para DGP mediante análisis de FISH (G. L. Harton et al., 2011b).
- Guía de buenas prácticas en diagnóstico genético preimplantacional (Bustamante-Aragón et al., 2016)

II.3. Aspectos legales y bioéticos del TGP.

El Test Genético Preimplantacional constituye uno de los mayores avances de los últimos tiempos para la detección de enfermedades causadas por la alteración de genes y plantea numerosos interrogantes desde el punto de vista clínico, bioético y jurídico. De manera inevitable surgen a su alrededor y por parte de la sociedad opciones y posibilidades como la selección del bebé perfecto, la elección de rasgos fenotípicos, la mejora en la raza, etc.

Sin embargo, a pesar de estas cuestiones preocupantes que aparecen en ciertos sectores de la sociedad, el TGP es un elemento valioso englobado en la genética reproductiva y será

posible su aplicación para aquellos padres que quieren garantizar las mejores condiciones de salud para sus hijos.

En los últimos años, las técnicas de reproducción humana asistida se han popularizado y una gran cantidad de personas ha podido tener acceso a ellas. La introducción de estas técnicas hizo necesario un marco legal que estableciera límites para su puesta en práctica. No obstante, la existencia de esta legislación no ha impedido la aparición de controversias sociales, éticas y jurídicas.

El TGP se recomienda para determinadas circunstancias: anomalías cromosómicas numéricas o estructurales, enfermedades ligadas a cromosomas sexuales, enfermedades monogénicas, enfermedades hereditarias de surgimiento tardío, madres con edad avanzada, padres con meiosis masculina alterada, fallos en la implantación, abortos de repetición y con fines terapéuticos a favor de terceros.

España es uno de los países europeos en los que mayor número de tratamientos de reproducción asistida se realizan. Desde un punto de vista histórico, el TGP, como práctica asociada a las TRA, ha sido regulado en España por medio de la siguiente normativa:

- a) La primera ley creada fue la Ley 35/1988, de 22 de noviembre sobre Técnicas de Reproducción Asistida. En esta norma, el TGP se permitía en beneficio del propio embrión, pero no se contemplaba el TGP extensivo.
- b) Más tarde esta norma fue modificada por la Ley 45/2003, de 21 de noviembre. Esta reforma tampoco contempló el TGP extensivo.
- c) En la actualidad, la ley vigente es la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. En ella se mantiene el TGP en beneficio del propio embrión, y se permite el TGP extensivo.

El marco legal de esta última ley se concreta y amplía con el Real Decreto 42/2010 (BOE-A-2010-20138), por el que se regula la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA) y la Ley 14/2007 (BOE-A-2007-12945) que regula los estudios genéticos.

Según establece el artículo 12 en su apartado 1 de la Ley 14/2006, de 26 de mayo, los criterios para que una enfermedad genética sea susceptible de realización de un diagnóstico genético preimplantacional (DGP) son básicamente 3:

- Que sea una enfermedad hereditaria “grave”.
- Que sea “de aparición precoz”.
- Que en el momento de la aplicación de la prueba la ciencia no disponga de medios para su “curación postnatal”.

Estos tres criterios no son excluyentes y se disponen dentro del apartado 12.1. Posteriormente, el apartado 12.2. establece la posibilidad de realizar un TGP en aquellas enfermedades genéticas que, no cumpliendo los criterios establecidos por apartado 12.1., tengan un informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA) previa autorización de la “autoridad correspondiente”. El caso específico de TGP asociado a la detección de un embrión histocompatible con un tercero para fines terapéuticos también necesita la aprobación de la Comisión, mientras que las

enfermedades que cumplan los criterios del apartado 12.1 solo requieren que ésta sea informada.

Sin embargo, aunque la actual Ley es más precisa que las anteriores quedan dudas que dejan sin resolver la cuestión esencial de este apartado que es, en definitiva, qué enfermedades de transmisión genética están regidas por él ¿Qué es enfermedad grave?, ¿Bajo qué criterios y quién decide qué es una enfermedad grave? ¿Cuándo se considera que es de aparición precoz? Etc.

El Grupo de Interés en Genética y Reproducción (GiGR) de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) elaboró una propuesta de enfermedades monogénicas que podrían realizar TGP sin necesidad de solicitar permiso a las autoridades sanitarias correspondientes, ni de informe previo favorable por parte de la CNRHA.

En Octubre del 2014, ASEBIR recibe la solicitud por parte de la CNRHA de elaborar una lista con las principales enfermedades monogénicas susceptibles de diagnóstico mediante TGP contempladas en el apartado 12.1.a de la ley de 14/2006.

Estos grupos de enfermedades incluyen trastornos hereditarios crónicos, severos y/o progresivos que generan un elevado grado de discapacidad sensorial, motora o intelectual para la que no se dispone de un tratamiento curativo o que comprometen seriamente la calidad de vida de las personas afectadas.

- 1. Enfermedades neurológicas hereditarias:** incluye trastornos graves del equilibrio, trastornos de coordinación de la marcha, disartria y/o neuropatología compleja motora o sensitiva, con o sin retraso mental. Ejemplos son enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Huntington, paraplejia espástica hereditaria, síndrome del cromosoma X-frágil, Ataxia de Friederich, Ataxias espinocerebelosas, Ataxia telangectasia, DM Duchenne, DM Becker, DM Steinert, Distrofia facio-escápulo-humeral, miopatía miotubular, atrofia muscular espinal, miastenia grave.
- 2. Osteodisplasias, colagenopatías y enfermedades dérmicas:** incluyen fenotipos que cursan con alteraciones en la génesis o transformación del tejido óseo y/o alteraciones en el crecimiento, forma, tamaño o densidad del tejido óseo. Trastornos del colágeno que afectan a la formación del tejido dérmico. Enfermedades de la piel y tejido subcutáneo. Ejemplos son osteogénesis imperfecta, exostosis múltiple, artrogriposis, displasia esquelética, disostosis, síndrome de Alport, epidermólisis bullosa, síndrome de Ehlers-Danlos, Cutis Laxa, Incontinentia pigmenti.
- 3. Cardiopatías hereditarias:** incluyen fenotipos asociados a trastornos en la formación, desarrollo o funcionamiento de la función cardiaca y los sistemas asociados. Ejemplos son síndrome de Brugada, síndrome QT (largo/corto), síndromes hipertensivos graves, displasias arritmogénicas, enfermedad de Fabry, displasia ventricular, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica, RASopatías, síndrome de Marfan, aneurismas aórticos hereditarios, síndrome de muerte súbita infantil.
- 4. Enfermedades hematológicas hereditarias o trastornos de la coagulación.** Ejemplos son Hemofilia A y B, Talasemias, Síndrome de Wiskott-Aldrich.

5. **Enfermedades hereditarias metabólicas, endocrinas o nutricionales.** Ejemplos son gangliosidosis, adrenoleucodistrofia, enfermedad Gaucher, síndrome de Hunter (mucopolisacaridosis tipo II), síndrome de Hurler (mucopolisacaridosis tipo I), síndrome de Lesch Nyhan, hiperplasia adrenal congénita, fibrosis quística.
6. **Enfermedades renales hereditarias.** Ejemplos son poliquistosis renal autosómica dominante, poliquistosis renal autosómica recesiva, síndrome de Alport.
7. **Oculopatías hereditarias.** Por ejemplo, retinosis pigmentaria.
8. **Enfermedades de cáncer hereditario:** Síndromes hereditarios con una penetrancia superior al 80%, edad de aparición infantil o en las primeras décadas de vida adulta, sin opciones preventivas o terapéuticas, o que estas sean agresivas, mutilantes o puedan comprometer seriamente la calidad de vida de la persona. Ejemplos son anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, carcinoma gástrico difuso hereditario, esclerosis tuberosa, síndrome de Li-Fraumeni, neoplasia endocrina múltiple (tipo I y II), neurofibromatosis (tipo I y II), poliposis adenomatosa familiar, retinoblastoma hereditario, tumor de Wilms familiar, síndrome de Von Hippel-Lindau, xeroderma pigmentosum.

Desde el punto de vista bioético el TGP es una técnica que lleva asociada una fuerte controversia, ya que se utilizan procedimientos de reproducción asistida, se genera un número de embriones superior a un ciclo normal de fecundación in vitro sin TGP y existe una manipulación y selección de embriones, así como el descarte de los no aptos para la transferencia. Si bien, esta controversia se ve acentuada en los casos de selección embrionaria con fines terapéuticos para terceros.

La Ley 14/2007, de 3 de julio (BOE-A-2007-12945) de investigación biomédica tiene como objeto la regulación de los procedimientos en investigación biomédica que impliquen métodos invasivos para asegurar la dignidad e identidad humana y los derechos inherentes a la persona. En esta normativa se contempla al Comité de Bioética como organismo regulador que proporcione mecanismos de fomento, divulgación y coordinación científica. El TGP no se menciona de una manera específica, pero sí se hace alusión al tratamiento de muestras biológicas y su almacenamiento, así como a la donación y utilización de ovocitos, espermatozoides, preembriones, embriones y fetos humanos o de sus células, tejidos u órganos con fines de investigación biomédica y sus posibles aplicaciones clínicas. Esto debe de tenerse en cuenta a la hora de operar con las muestras de un TGP y también con los resultados confidenciales genéticos que deriven de sus resultados.

El impacto sociológico sobre la aplicación de estas técnicas conlleva la adopción de posturas éticas a favor y en contra. El TGP es una técnica en auge que ha sufrido una gran evolución en los últimos años y el debate ético-legal está muy presente. Todas las controversias que puedan surgir, se pueden solventar a través de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA) dedicada a asesorar, orientar actualizar y difundir los conocimientos científico-técnicos de las TRA.

III. Objetivos

III. OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La transferencia de embriones euploides seleccionados mediante el Test Genético Preimplantacional (TGP) de aneuploidías debería conducir a mejorar las tasas de implantación y descendiente nacido en los ciclos de FIV. La aplicación de nuevas tecnologías, en un procedimiento simultáneo que permita estudiar el complemento cromosómico del embrión y el estudio de enfermedades genéticas de origen familiar, debería contribuir de forma decisiva a tal fin.

OBJETIVOS

Para testar la hipótesis planteada se han fijado los siguientes objetivos:

1. Validación del protocolo de Secuenciación Masiva (NGS) aplicado al TGP para “screening” de aneuploidías (TGP-A). Este protocolo implica cumplir con los siguientes hitos:
 - a. Elaboración de un Protocolo Normalizado de Trabajo (PNT) para el seguimiento y la realización de los trabajos de “screening” de aneuploidías.
 - b. Validación del “screening” de aneuploidías en ADN amplificado procedente de blastómeros y determinación de la sensibilidad clínica y analítica, así como de la especificidad clínica y analítica.
 - c. Validación del “screening” de aneuploidías en ADN amplificado procedente de trofoectodermo y determinación de la sensibilidad clínica y analítica, así como de la especificidad clínica y analítica.

2. Validación del protocolo de Secuenciación Masiva (NGS) aplicado al TGP de alteraciones cromosómicas estructurales (TGP-SR):
 - a. Elaboración de un PNT para el seguimiento y la realización de los trabajos de alteraciones cromosómicas estructurales.
 - b. Validación de alteraciones cromosómicas estructurales en ADN amplificado procedente de blastómeros y determinación de la sensibilidad clínica y analítica, así como de la especificidad clínica y analítica.
 - c. Validación de alteraciones cromosómicas estructurales en ADN amplificado procedente de trofoectodermo y determinación de la sensibilidad clínica y analítica, así como de la especificidad clínica y analítica.

3. Desarrollo de un protocolo de análisis estandarizado mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa para TGP para su aplicación a distintas enfermedades monogénicas, con independencia del tipo de mutación y/o herencia.
 - a. Realización de protocolo estandarizado para la búsqueda de marcadores microsatélite tipo STR (“short tandem repeat”) y diseño de cebadores específicos para su amplificación.

- b. Diseño específico de cebadores para la amplificación y detección de mutaciones puntuales, deleciones e inserciones de pequeño tamaño y expansiones de tripletes.
 - c. Selección del método de amplificación de genoma completo (WGA) para su aplicación en el TGP.
 - d. Evaluación del protocolo mediante análisis de diversos parámetros característicos de la amplificación de blastómeros o trofoectodermo: Tasa de eficiencia de amplificación, Tasa de Fallo de Amplificación y Tasa de “Allele Drop-Out”.
4. Establecer las bases moleculares para la validación del Test Genético Preimplantacional de enfermedades monogénicas (TGP-M) mediante NGS y selección de las enfermedades que se incluirán en el panel de validación.

IV. Material y Métodos

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Geniality es un Centro de Diagnóstico Genético especializado en el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) y ubicado en las instalaciones del Parque Científico de Madrid (Campus de Cantoblanco, Madrid) desde su creación en el año 2008. Geniality ofrece sus servicios a Centros de Reproducción Asistida (FIV), tanto del sistema de salud público (SS) como centros privados, en todo el ámbito nacional. Para ello cuenta con la correspondiente Autorización Sanitaria de la Comunidad de Madrid como Centro de Diagnóstico Analítico con Unidad de Genética (ref. CS12872) y desarrolla su actividad bajo el cumplimiento de la ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida y la ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

Con todos estos Centros, Geniality cuenta con un acuerdo de colaboración mediante el cual se compromete a dar servicio de DGP a sus pacientes, los cuales firman previamente un Consentimiento Informado (Anexo).

El material con que se cuenta para la realización de esta Tesis, es principalmente el ADN obtenido después de procesar la biopsia embrionaria de los casos de TGP que se realizan en Geniality. (Ver informe del Comité Ético en Anexo)

IV.1. Material

IV.1.1. Validación de NGS en línea celular.

Como paso previo a la validación de la plataforma de NGS aplicada al TGP, se utilizó una línea celular con cariotipo conocido, GM50159, con una patología identificada en el cromosoma 18: 46,XX,dup(18)(q21.2q22.1).

IV.1.2. Validación de NGS en los casos de TGP-A

De los 715 ciclos de TGP-A realizados mediante "array"-CGH en el período 2011-2017, se seleccionaron 19 ciclos de manera aleatoria para realizar la validación mediante NGS. Se analizaron un total de 50 muestras de ADN, amplificado mediante Amplificación de Genoma Completo (WGA), de blastómeros de embriones biopsiados en día 3 y células del trofoectodermo procedentes de embriones biopsiados en día 5/6 de cultivo embrionario. Los 19 ciclos de TGP-A presentaban diferentes tipos de indicaciones: edad materna avanzada, abortos de repetición, factor masculino. La consistencia del análisis obtenido mediante secuenciación masiva (NGS) se evaluó con los resultados diagnósticos, previamente establecidos con "array"-CGH.

IV.1.3. Validación de NGS en los casos de TGP-SR

De los 138 ciclos de TGP-SR correspondientes a 116 parejas portadoras de reordenamientos cromosómicos equilibrados diferentes: translocaciones robertsonianas (27), translocaciones recíprocas (66) e inversiones (26), realizados entre el período 2011-2017, se analizaron 872 embriones, biopsiados en día 3 (781) y día 5/6 (91) de cultivo embrionario.

Para la validación de las alteraciones cromosómicas estructurales, se seleccionaron 33 ciclos de TGP-SR que incluían 26 portadores de diferentes alteraciones cromosómicas estructurales: translocaciones recíprocas (20), translocaciones robertsonianas (2) e inversiones (4) (Tabla 1). La evaluación incluyó el tipo de reordenamiento, los cromosomas implicados, los puntos de rotura y el tamaño en megabases del fragmento translocado. Se analizaron un total de 85 muestras de ADN amplificado, mediante Amplificación de Genoma Completo (WGA), procedente de blastómeros y células del trofoectodermo de embriones biopsiados en día 3 y día 5/6 de cultivo embrionario, respectivamente. La consistencia del análisis obtenido mediante secuenciación masiva (NGS) se evaluó con los resultados diagnósticos, previamente establecidos con “array”-CGH, tanto a nivel de los cromosomas implicados en los desequilibrios como del resto del complemento cromosómico.

Caso	Alteración cromosómica estructural	Cromosoma A		Cromosoma B	
		Segmento centromérico	Segmento translocado	Segmento centromérico	Segmento translocado
1	46,XY,t(3;10)(p25;q23)	184,8	14,4	82	53,4
2	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	16	98,1	15,6	90,8
3	46,XX,t(7;21)(q35;q22.2)	142,8	16	38,6	11,3
4	46,XY,t(4;10)(q28;q22)	124	67,3	71,3	64,1
5	46,XX,inv(3)(p21.3 q26.2)	128,9	43,6 y 27	-	-
6	46,XY,t(2;11)(q23;p15.5)	148,4	94,6	131,7	2,8
7	46,XX,t(1;7)(q12;p11.2)	128	119,2	101,4	57,4
8	46,XX,t(11;22)(q23;q11)	110	24,5	11,8	37,9
9	46,XX,t(3;8)(p21;p23)	145,1	54,4	133,6	12,7
10	46,XY,t(7;21)(q32;p13)	126,9	31,9	44	2,9
11	46,XY t(11;22)(q25;q13)	130,3	4,2	35,9	13,8
12	46,XY,t(15;19)(p13;q12)	96,8	3,5	30,2	33,6
13	46,XY,t(1;7)(q32;p22)	197,5	49,7	151,6	7,2
14	46,XX,t(10;19)(p11.2;p13.1)	96,6	38,8	44	49,8
15	46,XX,t(11;22)(q23.3;q11.2)	115,4	19,1	16,3	33,4
16	46,XX,t(3;10)(q29;p12)	193,8	5,7	107,1	28,3
17	46,XY,t(3;13)(q26.2;q13.3)	169,2	30,3	34,7	79,4
18	46,XX,t(12;15)(p11.1;p11.1)	96,9	95,4	83,3	17
19	46,XY,inv(2)(p12q13)	38,4	75,4 y 129,2	-	-
20	46,XY,t(5;21)(p10;q10)	133,2	47,7	12,3	34,6
21	45,XX,der(13;21)(q10;q10)	16	98,1	12,3	34,6
22	46,XY,inv(7)(p14p21)	139,3	19,5	-	-
23	46,XY,t(2;4)(q21.1;p16.1)	129,6	113,4	180,4	10,9
24	46,XY,t(9;17)(q13;p12)	70	70,3	62,9	15,9
25	46,XY,t(3;4)(q24;q21.2)	144,4	55,1	79,2	112,1
26	46,XX,inv(3)(q13q23)	104,4	95,1	-	-

Tabla 1. Cariotipos de las alteraciones cromosómicas estructurales validadas mediante NGS

IV.1.4. Enfermedades monogénicas mediante PCR clásica

Para la estandarización de un protocolo único para el análisis y estudio de enfermedades monogénicas (TGP-M) mediante PCR clásica, se incluyen 37 ciclos de DGP realizados por 27 parejas portadores de 11 enfermedades monogénicas: Atrofia Muscular Espinal; Hemofilia; Cadasil; Enfermedad de Huntington; Exostosis Múltiple Hereditaria; Fibrosis Quística; Hiperglicinemia no cetósica; Mucopolisacaridosis tipo 1 (Síndrome de Hurler); Neurofibromatosis tipo 1; Paraparesia Espástica Hereditaria; Poliposis Adenomatosa Familiar.

Para el análisis global de los datos obtenidos mediante este protocolo hasta 2018, se incluye el análisis de 366 ciclos de TGP-M realizados en 236 parejas portadoras de 93 enfermedades monogénicas. En este periodo se han analizado un total de 2012 blastómeros de embriones biopsiados en día 3 y 209 muestras de trofoectodermo biopsiadas en día 5.

IV.1.5. Test genético preimplantacional combinado, COMB-TGP.

Para la estandarización de un protocolo único que incluía el análisis de enfermedades monogénicas y anomalías cromosómicas, denominado COMB-TGP, se seleccionaron 5 ciclos de TGP de 4 parejas portadoras de 4 enfermedades monogénicas: fibrosis quística, retinosis pigmentaria, colestasis intrahepática familiar y Von Hippel-Lindau. Conjuntamente se realizó el “screening” de aneuploidías.

Para el análisis global de los datos obtenidos mediante este protocolo hasta 2018, se incluye el análisis de 40 ciclos correspondientes a 31 parejas portadoras de 23 enfermedades monogénicas. Se analizaron 263 embriones, biopsiados en día 3 (182) y día 5/6 (81) de cultivo embrionario.

IV.1.6. TGP en enfermedades monogénicas más frecuentes: Eficiencia de amplificación, tasa de Fallo de Amplificación y tasa de Allele Drop-Out (ADO).

Se seleccionaron 13 enfermedades monogénicas dentro del período 2008-2018, 10 de ellas seleccionadas por el número de ciclos realizados (5-46 ciclos) y 3 por su cercanía al locus, con el objetivo de diseñar un panel de SNPs que permita el análisis conjunto de todas ellas mediante NGS: Adrenoleucodistrofia (ABCD1), Distrofia Miotónica de Steinert (DMPK), Distrofia muscular de Duchenne (DMD), Enfermedad de Huntington (HTT), Esclerosis Tuberosa Tipo 2 (TSC2), Fibrosis Quística (CFTR), Hemofilia A (F8), Miopatía Miotubular (MTM1), Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2 (RET), Neurofibromatosis Tipo 1 (NF1), Poliposis Adenomatosa Familiar (APC), Poliquistosis renal AD (PKD1), X-Frágil (FMR1). (Tabla 2)

Enfermedad monogénica	Número de TGP-M
Adrenoleucodistrofia ligada a X (ABCD1)	1
Distrofia Miotónica de Steinert (DMPK)	42
Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	9
Enfermedad de Huntington (HTT)	46
Esclerosis Tuberosa Tipo 2 (TSC2)	2
Fibrosis Quística (CFTR)	14
Hemofilia A (F8)	10
Miopatía Miotubular (MTM1)	2
Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2 (RET)	5
Neurofibromatosis Tipo 1 (NF1)	16
Poliposis Adenomatosa Familiar (APC)	11
Poliquistosis renal AD (PKD1)	17
X-Frágil (FMR1)	18

Tabla 2. Enfermedades monogénicas más analizadas dentro del período 2008-2018 y número de ciclos de TGP.

Estas enfermedades monogénicas, analizadas mediante PCR, corresponden a 193 ciclos de TGP-M realizados en 89 familias para 103 marcadores tipo STR diferentes, con un total de 3.656 reacciones. En cuanto al estudio de las mutaciones, se realizaron 274 reacciones mediante análisis de fragmentos y 72 reacciones mediante minisequenciación. Los resultados obtenidos en estos ciclos han permitido el análisis de diversos parámetros característicos de la amplificación de blastómeros o trofooctodermo: Eficiencia de Amplificación, tasa de Fallo de Amplificación y tasa de Allele Drop-Out (ADO).

IV.2. Metodología del TGP-A y TGP-SR

IV.2.1. Cultivo de línea celular

La línea celular GM50159 que presenta una patología identificada en el cromosoma 18, 46,XX,dup(18)(q21.1q22.1) está constituida por células B infectadas por virus de Epstein Barr (EBV). Las células GM50159 se mantuvieron en medio RPMI 1640 (GibcoBRL) suplementado con 15% suero fetal bovino no inactivado (FBS), glutamina 2 mM (GibcoBRL) y antibióticos (100 U/ml penicilina; 100 Pg/ml estreptomina) (GibcoBRL). Para evitar cambios en el pH del medio se añadió Hepes (pH 7,2) a una concentración final de 2 mM. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂.

La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se realizaron en las máximas condiciones de esterilidad posibles, trabajando en una campana de flujo laminar.

IV.2.2. Aislamiento de células cultivadas

El aislamiento de células individuales se realizó en una lupa (Olympus IX 70). En una placa Petri se añadieron pequeñas gotas de lavado de 1xPBS (Invitrogen) con 0,1% de PVA (alcohol polivinílico PVA, Sigma-Aldrich). Se transfirieron a la placa Petri tres microlitros de suspensión celular. Con ayuda de una micropipeta, las células se transfirieron a gotas de lavado consecutivas para diluir su concentración hasta obtener un bajo número de células

visibles en la gota. Las células individualizadas se transfieren mediante micropipeta a un tubo de PCR 0,2ml. Se preparan varios tubos con un número diferente de células por tubo: una célula, dos células, cinco células y diez células, que se mantiene congeladas a -20C.

IV.2.3. Extracción de ADN y “array”-CGH de oligos 44K.

La tipificación de la línea celular GM50159 se realizó mediante un “array”-CGH 44K de oligos. Para ello, se procedió primeramente a la extracción de ADN de una alícuota que contenía las células cultivadas. La extracción se realizó usando el sistema MagNaPure Compact I (Roche Applied Science). Es un sistema de extracción basado en el uso de partículas magnéticas que permite el aislamiento rápido y automatizado de ácidos nucleicos. La extracción se realizó a partir de 500 microlitros de células cultivadas resuspendidas en PBS. Estos volúmenes iniciales se eluyeron en 100µl de tampón de elución, obteniéndose rendimientos medios de 100 ng/µl. Una vez obtenido el ADN, se cuantificó para medir su calidad con el espectrofotómetro NanoDrop. Seguidamente se realizó el protocolo de aCGH 44k de oligos siguiendo las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies). Se utilizó el estadístico ADAM-2 (ventana 0,5Mb, A=6) como parámetro de análisis del número de copias de DNA presentes para las diferentes sondas. Se ha aceptado como una alteración en el número de copias del ADN aquellas que tengan un mínimo de cinco sondas consecutivas. La resolución del análisis es, por tanto, de aproximadamente 200 kb para la mayoría de las regiones.

IV.2.4. Lisis celular y amplificación de genoma completo

Para el análisis cromosómico, mediante “array”-CGH y NGS, se utilizó el “kit” “Sureplex Amplification System” (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Así se provocó la lisis y amplificación en los blastómeros, las muestras de trofoectodermo y las células aisladas de la línea celular. El “Sureplex” se basa en la fragmentación aleatoria de ADN genómico y una amplificación posterior por PCR utilizando sitios de unión de cebadores universales.

Las muestras biopsiadas se recogieron en 2,5µl de “washing media” (0,1% de PVA; Poly-vinil alcohol) y fueron lisadas añadiendo 2,5µl de “SurePlex cell extraction buffer” y 5µl de la mezcla “SurePlex Extraction cocktail”. Se incubaron en el termociclador a 78°C durante 10 minutos y posteriormente a 95°C durante 4 minutos. Una vez lisadas, las muestras fueron pre-amplificadas añadiendo 5µl de la mezcla “SurePlex Pre-amplification” e incubadas en el termociclador con el siguiente programa: un ciclo a 95°C durante 2 minutos y 12 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 15°C durante 50 segundos, 25°C durante 40 segundos, 35°C durante 30 segundos, 65°C durante 40 segundos y 75°C durante 40 segundos, bajando a un paso de 4°C. Para finalizar, un paso de amplificación: un ciclo a 95°C durante 2 minutos y 14 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 65°C durante 1 minuto y 75°C durante 1 minuto, con un paso final a 4°C. Es necesario siempre incluir un control de amplificación positivo para confirmar que la amplificación ha funcionado y un control de amplificación negativo para controlar las contaminaciones en la reacción. Como control

positivo de amplificación se utiliza una muestra comercial de ADN genómico (Promega-G1521).

IV.2.5. Gel de electroforesis

La comprobación de la amplificación del genoma mediante “Sureplex Amplification System” se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y 1x TBE (tris/borato/EDTA). En el gel, se cargó una mezcla de 5µl de producto amplificado de cada una de las muestras más 1,2µl de tampón de carga. Además de las muestras, se cargó un marcador de peso molecular y se realizó la electroforesis a 100 voltios durante 20 minutos. La visualización del ADN amplificado se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta. El resultado óptimo de la amplificación muestra un “smear” que va desde 1 kb a 100 pares de bases, presentando una mayor intensidad en torno a los 500 pares de bases.

IV.2.6. “Array”-CGH 24 sure v3

Una vez confirmada la amplificación de las muestras en el gel de agarosa, se continuó con el siguiente paso de procesamiento mediante la técnica aCGH y la plataforma 24 sureV3. Durante este proceso, las muestras se marcaron con diferentes fluorocromos y se hibridaron sobre un soporte de cristal o “array”.

La plataforma 24sureV3 contiene 2920 sondas y está diseñada para estudiar aneuploidías de cromosomas enteros. Esta plataforma permite el análisis de muestras en grupo (batch). Cada muestra no tiene que hibridarse con un control en la misma zona, sino que puede compararse con un control puesto en otro “array”. Por cada grupo de muestras analizadas se utilizan dos referencias masculinas y dos referencias femeninas.

IV.2.6.1. Apertura del caso y elaboración de la plantilla de hibridación.

En la plantilla de hibridación se planificó las posiciones de las muestras que se analizaron y se eligió la posición en el “array” (Top o Bottom) y el marcaje (Cy3 o Cy5) de cada muestra o control. Para ello, se utilizó un fichero Excel que nos permitió crear la plantilla de marcaje e hibridación.

En la primera página de esta plantilla se indicó el número de ciclo, número de muestra, tipo de muestra. No es necesario incluir las posiciones de las dos referencias masculinas y las dos referencias femeninas ya que el Excel lo asigna automáticamente en sus posiciones. En la siguiente página se insertaron los códigos de barras de los “arrays” que se utilizaron para hibridar las muestras. La siguiente hoja nos indicó de manera automática la plantilla de hibridación (Figura 8).

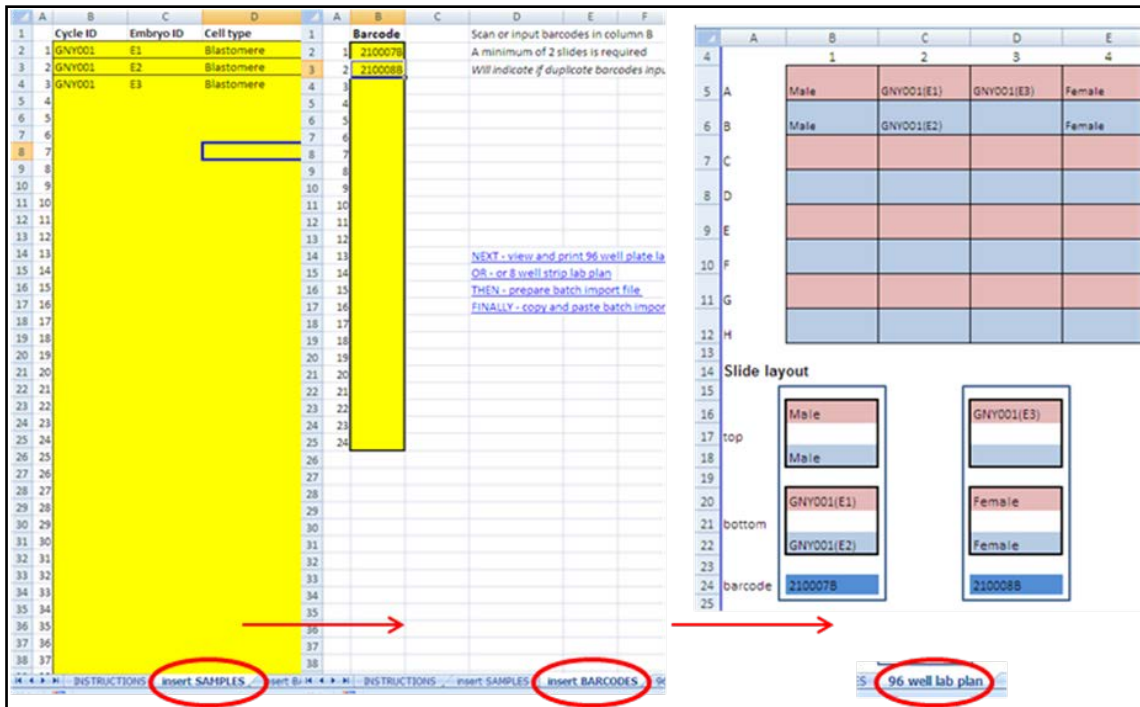


Figura 8. Plantilla realizada con el programa Excel para la anotación de los resultados de la hibridación en “array”.

Además de crear la plantilla de marcaje e hibridación, el fichero Excel nos permitió también crear un archivo con extensión .txt (“batch import”) que usamos después para importar las imágenes de los “arrays” en el “software” de análisis BlueFuse Multi.

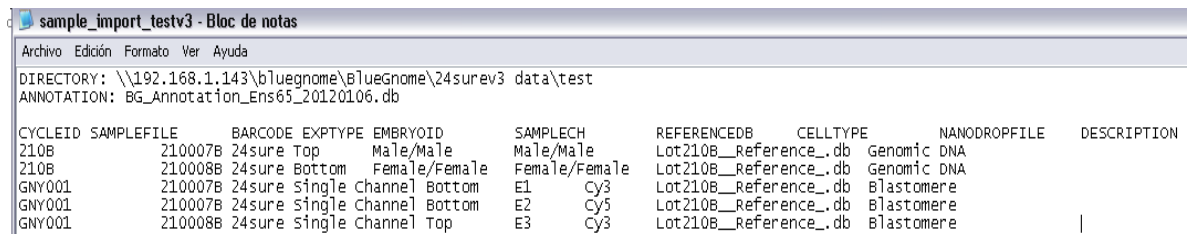


Figura 9: Fichero de importación de imágenes de “arrays” 24sureV3.

IV.2.6.2. Marcaje de las muestras

El marcaje de las muestras amplificadas y las referencias se realizó mediante los fluorocromos Cy3 y Cy5. Se utilizaron 8 µl de cada muestra amplificada y las referencias masculinas y femeninas para el marcaje. Según la plantilla de marcaje e hibridación cada muestra irá marcada con un fluorocromo, Cy3 o Cy5. Los reactivos y volúmenes usados para el marcaje fueron:

“Primer solution”: 5 µl / muestra

“Reaction Buffer”: 5 µl / muestra

“dCTP-labelling mix”: 5 µl / muestra

“Cy3 dCTP o Cy5 dCTP”: 1 µl / muestra

“Klenow enzyme”: 1 µl / muestra

En el marcaje, se combinaron en un tubo de PCR 8 µl de la muestra amplificada y las referencias de ADN masculinas y femeninas con 5 µl de “Primer Solution”. Se desnaturalizó a 94°C durante 5 minutos y se transfirió inmediatamente al hielo (4°C), sin dejar que baje la temperatura, y así se mantuvo durante 5 minutos.

Para las muestras y referencias marcadas con Cy3se añadieron 12 µl de Cy3 “Labelling master mix” a los 13 µl de muestra de ADN/“primer solution” y Referencia/“primer solution”. Para las muestras y referencias marcadas con Cy5se añadieron 12 µl de Cy5 “Labelling master mix” a los 13 µl de muestra de ADN/“primer solution” y Referencia/“primer solution”. Estas mezclas se incubaron en el termociclador a 37°C durante 90 minutos.

IV.2.6.3. Combinación y precipitación de las muestras.

Una vez marcadas las muestras y referencias, se procedió a su combinación y precipitación. Se combinaron las dos referencias masculinas (cada una marcada con un fluorocromo), las dos referencias femeninas y las muestras amplificadas, de dos en dos, según nos indica la plantilla de hibridación. En un tubo de 1,5ml, se añadieron 25 µl de una muestra marcada con Cy3 y 25 µl de otra muestra marcada con Cy5, y a esta mezcla se le añadieron 25 µl de “Human-COT”. La adición de “Human COT” en la mezcla permitirá bloquear las secuencias repetitivas del ADN, particularmente las de los centrómeros y telómeros. Así se conseguirá eliminar el nivel de hibridación cruzada, así como la unión no específica a la plataforma “array”, y con ello se aumentará la sensibilidad y se obtendrán unos mejores resultados.

Una vez combinado, cada uno de los tubos se transfirió al concentrador de vacío para ADN “miVAC”. La centrifugación se realizó durante 20 minutos a 75°C, obteniendo al final del proceso un precipitado de unos 3µl.

IV.2.6.4. Hibridación, lavados y escaneo.

Una vez precipitadas las muestras, se resuspendieron en 21 µl de tampón de hibridación “DS hybridization buffer” a 75°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. En este tiempo se preparó la cámara de hibridación que contiene una mezcla 6ml 2x SSC/50% de formamida. Una vez que las muestras alcanzaron la temperatura ambiente, se añadieron 18 µl de la solución de ADN marcado a cada uno de los “arrays” según indica la plantilla de hibridación (Figura 10), se colocó un cubreobjetos y seguidamente se colocó el “array” en la cámara de hibridación (Figura 10). Ésta se introdujo en un baño a 47°C durante 16 horas.



Figura 10. En la izquierda se muestra la adición 18 μ l de la solución de ADN marcado en el “array” sobre la plantilla de hibridación. A la derecha se muestra la cámara de hibridación con los “arrays”.

Transcurridas las 16 horas de horas de hibridación, se procedió al lavado de los “arrays”, para lo que se utilizaron diferentes soluciones y tiempos. Los “arrays” se pasaron directamente de un lavado a otro, sin dejar que se secan (Tabla 3)

Lavado	Temperatura	Tiempo	Agitación	Tampón
1	Ambiente	10 min	SI	2xSSC/0,05% Tween 20
2	Ambiente	10 min	SI	1x SSC
3	60 °C	5 min	NO	0,1x SSC
4	Ambiente	1 min	SI	0,1x SSC

Tabla 3. Condiciones de cada lavado tras la hibridación en el “array”.

Una vez finalizado el último lavado, los “arrays” se secaron por centrifugación a 170 xg durante 3 minutos.

La visualización de los “array” se realizó con el escáner Genepix® Personal 4100A (Axon Instruments). El escáner usa dos láseres para detectar los fluoróforos Cy3 y Cy5 respectivamente a 535nm y 632nm (verde y rojo). La resolución por pixel es de 10 μ m. La energía de los fotones esta amplificada y transformada en energía eléctrica vía un tubo fotomultiplicador (PMT=“Photo Multiplicator Tube”). El ajuste de este PMT se puede realizar manualmente.

El escáner está conectado con el software Genepix® Pro que permite ajustar los parámetros del escáner y generar una imagen en un fichero estándar (.TIFF).

El análisis de la imagen se hace gracias al software BlueFuse Multi (Illumina). Este software analiza cada “array” de manera automática, extrae la información de las imágenes TIFF, reconoce y posiciona correctamente la rejilla de puntos/sondas, extrae las medidas luminosas de cada color (rojo y verde), calcula las proporciones verde/rojo, asigna cada elemento del “array” a su posición en el genoma, hace una normalización de los datos, interpreta los resultados como ganancia y pérdida de material genético y/o de cromosomas enteros. Finalmente, BlueFuse Multi proporciona informes, tablas recapitulativas y gráficos log (ratio) sobre todas las sondas del “array” representando a todos los cromosomas.

IV.2.6.5. Lectura e interpretación de los resultados

Después de haber procesado todos los “arrays” mediante el software BlueFuse Multi, aparecen a la izquierda de la pantalla los experimentos importados. Debajo del título “View” se indican una serie de posibles visualizaciones (Figura 11). Las más importantes son:

- **Charts:** Gráfico de los resultados de cada sonda, el logaritmo de la proporción (muestra/control) en el eje de ordenadas y la posición cromosómica en el eje de abscisas. El chart más usado es el “Fused Chart” que permite ver a la vez los resultados con los controles masculinos y femeninos. En los charts, una línea verde representa el estado de la región: ganado, normal, perdido.
- **Report:** El reporte nos interesa principalmente por las medidas de calidad del “array”: “QC measures”. El “array” será de buena calidad según las siguientes condiciones:
 - DLR fused < 0,2
 - SBR > 1,8
 - Spot amplitude > 500
 - % included clones > 75
- **Image:** Permite ver la imagen del “array” escaneado. Seleccionando las sondas estas aparecen de distintos colores que representan el grado de confianza de cada sonda, de más a menos: verde (A), azul claro (B), azul oscuro (C), naranja (D), rojo (E).
- **Table:** Recapitula la información de cada sonda: nombre, posición, log(ratio), confianza, bandera (“flag”) corresponde a los colores de la imagen, implicación de la región en enfermedades,...
- **Caryotype:** Dibujos de los cromosomas con las zonas ganadas en verde y perdidas en rojo.

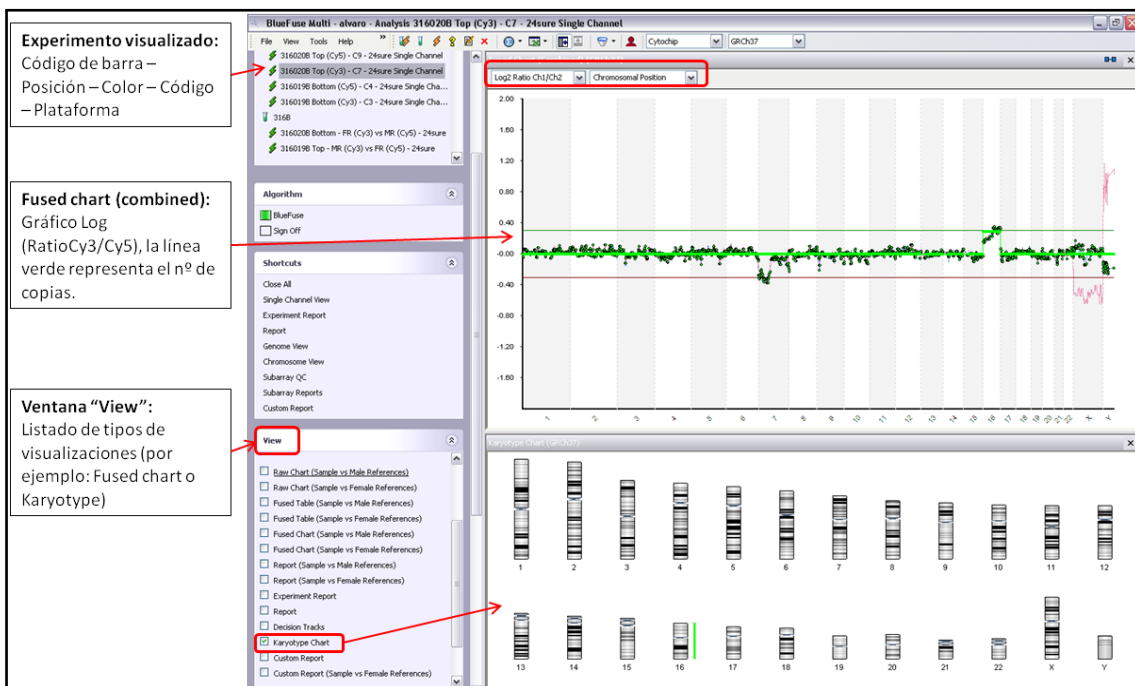


Figura 11. Pantalla principal de visualización de datos con BlueFuse

IV.2.7. "Array"-CGH 24 sure +

La plataforma 24sure+ contiene un mayor número de sondas (4.839) que la plataforma aCGH 24 Surev3. Este "array" tiene una mayor densidad de sondas en zonas pericentroméricas y subteloméricas, y está diseñado para estudiar translocaciones y alteraciones sub-cromosómicas. Los casos de alteraciones cromosómicas estructurales se deben evaluar previamente para confirmar que el "array" es capaz de detectar todos los posibles desequilibrios que puedan originar.

El flujo de trabajo, los volúmenes, temperaturas y tiempos son similares a los que se realizaron con la plataforma 24sure v3. A continuación se detallan las diferencias entre ambos protocolos:

- Las muestras se enfrentaron a una referencia masculina. El número de referencias masculinas fue similar al número de muestras analizadas.
- Cada muestra se marcó con el fluorocromo Cy3 y cada referencia con el fluorocromo Cy5 (Figura 12).
- En el paso de combinación y precipitación, cada muestra se combinó con una referencia masculina.

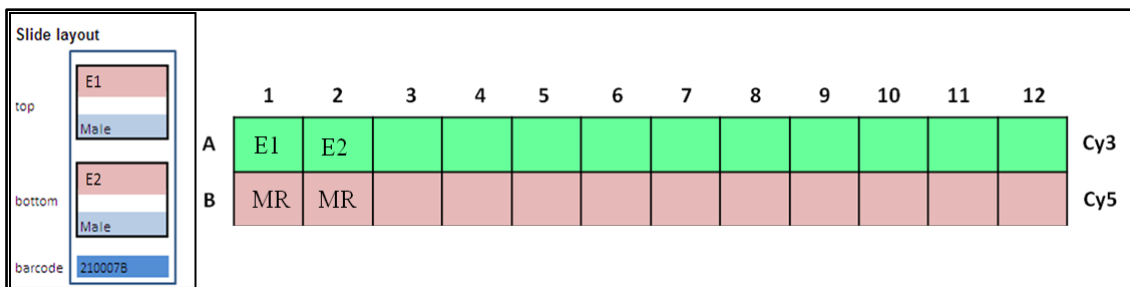


Figura 12. Localización de las muestras en el "array" y tipo de marcaje (Cy3 y Cy5)

IV.2.8. Secuenciación Masiva (NGS)

La tecnología usada para la realización del este estudio fue el Veriseq NGS (Illumina) que permite la detección rápida de variaciones de número de copia (CNV). Realiza aproximadamente 24 millones de secuencias, con una pérdida de 30%-40% lecturas por carrera, y analizando 24 muestras simultáneas, proporciona entre 600.000-900.000 lecturas por muestra.

En el siguiente diagrama se muestra el flujo de trabajo utilizado en la preparación de las librerías y la secuenciación tanto para los casos de "screening" de aneuploidías, como para los casos de alteraciones cromosómicas estructurales (Figura 13).

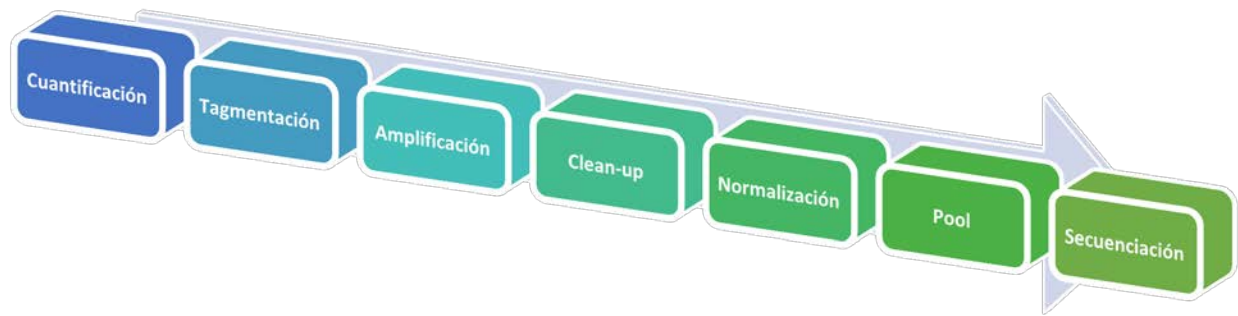


Figura 13. Secuencia de pasos para la realización del protocolo de secuenciación masiva.

Los productos amplificados mediante “Sureplex” se cuantificaron con Qubit dsDNA HS (Life Technologies) que permitió cuantificar ADN de doble cadena y evitando ADN de cadena sencilla, RNA y otros oligonucleótidos que puedan interferir en el proceso de secuenciación.

Se realizó una dilución 1/10 de los productos de ADN amplificados y seguidamente se preparó la solución de trabajo para medir las muestras en el Qubit. Esta solución contiene por cada muestra 199µl de “HS buffer” y 1 µl de “Dye”. Se mezclaron 10 µl de la dilución 1/10 de los productos amplificados y 190µl de la solución de trabajo. Además, para calibrar el Qubit se mezclaron 10 µl de los estándares junto con 190µl de la solución de trabajo. Estas mezclas se mantuvieron durante 2 minutos en oscuridad. Posteriormente, se procedió a la medición de las muestras y los controles de amplificación. En primer lugar, se realizó la lectura de los 2 estándares, que crean una recta patrón, y seguidamente se midieron las muestras. Se anotaron las concentraciones en ng/µl obtenidas para cada una de las muestras y controles. Los criterios de aceptación son los siguientes:

Control negativo: < 2 ng/µl de dsDNA (ADN de doble cadena).

Controlo positivo: ≥ 20 ng/µl de dsDNA

Blastómero: ≈ 35 ng/µl de dsDNA

Trofoectodermo: ≈ 45 ng/µl

A continuación, mediante el software “Bluefuse Workflow Manager” se añadió el número de ciclo, número de muestra, tipo de muestra y las concentraciones obtenidas en la medición. El software indicó la dilución para que cada muestra se ajustara a una concentración final de 0,2 ng/µl. Además, nos indicó los índices (i7 y i5) con los que se marcará cada muestra (Figura 14).

BlueFuse Workflow Manager

Please Enter Sample Information

VeriSeq PGS - MSeq Assay Plate

Table | Plate | Plate Graphic □ indicates invalid samples

	Cycle ID*	Embryo ID*	Cell Type*	1/10 dsDNA (ng/μl)	Dilutions		Index1 (I7)*	Index2 (I5)*	Description
					Volume 1/10 dsDNA (μl)	Added Water (μl)			
A01	GNV4755	E2	Trophectoderm	2.3	5	52	N701	S503	
A02	GNV4755	E4	Trophectoderm	0	5	-5	N702	S503	
A03	GNV4755	E9	Trophectoderm	0	5	-5	N703	S503	
A04	GNV4760	E1	Trophectoderm	0	5	-5	N704	S503	
A05	GNV4760	E3	Trophectoderm	0	5	-5	N705	S503	
A06	GNV4760	E5	Trophectoderm	0	5	-5	N706	S503	
A07	GNV4760	E6	Trophectoderm	0	5	-5	N707	S503	
A08	GNV4760	E7	Trophectoderm	0	5	-5	N708	S503	
A09	GNV4760	E8	Trophectoderm	0	5	-5	N709	S503	
A10	GNV4760	E10	Trophectoderm	0	5	-5	N710	S503	
A11	GNV4756	E2	Trophectoderm	0	5	-5	N711	S503	
A12	GNV4154	E2	Trophectoderm	0	5	-5	N712	S503	
C01	GNV4154	E3	Trophectoderm	0	5	-5	N701	S504	
C02	GNV4777	E1	Trophectoderm	0	5	-5	N702	S504	
C03	GNV4777	E3	Trophectoderm	0	5	-5	N703	S504	
C04	GNV4777	E5	Trophectoderm	0	5	-5	N704	S504	
C05	GNV4777	E6	Trophectoderm	0	5	-5	N705	S504	
C06	GNV4777	E7	Trophectoderm	0	5	-5	N706	S504	
C07	GNV4778	E2	Trophectoderm	0	5	-5	N707	S504	
C08	GNV4778	E3	Trophectoderm	0	5	-5	N708	S504	
C09	GNV4778	E4	Trophectoderm	0	5	-5	N709	S504	
C10	GNV4778	E5	Trophectoderm	0	5	-5	N710	S504	

Cancel Back Save Worklist

Figura 14. Pantalla del “Bluefuse Workflow Manager” donde se indica el número de muestras para analizar, el tipo de muestra, la concentración obtenida, la dilución para ajustar a 0,2 ng/μl y los índices que llevará cada muestra.

Las librerías se prepararon con el “kit” VeriSeq PGS (Illumina). Durante la preparación de las librerías, el ADN de doble cadena se etiqueta (“tag”) mediante la acción de un transposoma. Así se fragmentará y se incorporarán unos adaptadores en los extremos que permitirán la amplificación de esa secuencia por PCR en el siguiente paso. Se amplifican los fragmentos de ADN mediante una PCR de ciclos limitados y además se añaden las secuencias del índice 1 (i7) y el índice 2 (i5). Estas secuencias índices permiten identificar individualmente cada muestra y son necesarias para la secuenciación, así como los adaptadores comunes (P5 y P7) necesarios para la generación de grupos y la secuenciación.

Para el etiquetado, se añadieron 5μl de ADN de doble cadena a una concentración de 0,2ng/μl (1ng total), 5μl de “Amplicon Tagmentation Mixture” (ATM) y 10 μl del tampón de “tagmentación” de ADN (TD). Se colocaron en el termociclador a 55°C durante 5 minutos y un paso final a 10°C. Se añadieron 5μl del tampón de neutralización (NT) inmediatamente, para neutralizar el proceso de etiquetado y se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras el etiquetado, las muestras se amplificaron mediante PCR con ciclos limitados. Se añadieron a cada muestra 5μl de la secuencia índice 1 (i7), 5μl de la secuencia índice 2 (i5) y 15μl de “Nextera PCR Master Mix” (NPM). El programa de amplificación consta de un ciclo a 72°C de 3 minutos, un ciclo a 95°C de 30 segundos, seguido de 12 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, un último ciclo a 72°C durante 5 minutos y un paso final a 4°C.

El producto de PCR se limpió con “AMPure XP beads” (A63881, Beckam Coulter, Brea, CA, USA). Las librerías de ADN se purificaron, se seleccionaron por tamaño y se eliminaron los

índices y fragmentos de librería pequeños. En placas de 96 pocillos profundos se añadieron 45 μl de “AMPure XP beads” y 45 μl del producto de PCR. Se mezclaron con la pipeta multicanal de 15 a 20 veces, se selló la placa con lámina adhesiva y se agitó durante 1 minuto en un agitador de placas. Después, se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Seguidamente, la placa se colocó sobre un soporte magnético (AM10027, Life Technology) durante 2 minutos hasta que el sobrenadante quedó totalmente transparente. Con la placa sobre el soporte magnético y con una pipeta multicanal se eliminó el sobrenadante. Se realizaron a continuación 2 lavados de 30 segundos con 200 μl de etanol al 80% preparado en fresco. Se eliminó todo el etanol y se dejaron secar las partículas durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las librerías purificadas se eluyeron con 50 μl de tampón de resuspensión.

En el siguiente paso, cada una de las librerías se va a normalizar con el fin de asegurar que todas estén representadas de manera equivalente. Se añadieron 20 μl de cada una de las librerías purificadas a una placa de pocillo hondo que contenía 45 μl de una mezcla de tampón y partículas de normalización (LNA1/LNB1). Se agitaron a 1.800rpm durante 30 minutos. Seguidamente, la placa se colocó sobre un soporte magnético y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados de las partículas con el tampón de lavado de normalización y finalmente el ADN se eluyó con NaOH 0,1 N preparado en el momento.

En una nueva placa de PCR, se añadieron 25 μl del tampón de almacenamiento de librerías normalizadas y 25 μl de las librerías eluidas en NaOH 0,1N. En un tubo eppendorf “LoBind”, se añadieron 5 μl de cada una de las librerías. De esta combinación de librerías, se desnaturalizaron 15 μl junto con 85 μl del tampón de hibridación en un ciclo a 96°C durante 3 minutos y un ciclo a 4°C durante 5 minutos. Se diluyeron los 100 μl de librería desnaturalizada en 600 μl de tampón de hibridación y se cargaron en el cartucho de secuenciación según protocolo del fabricante.

Las librerías se secuenciaron con el sistema MiSeq (Illumina), basado en la secuenciación por síntesis. La longitud de las lecturas fue de 36 nucleótidos, además de los dos índices. El software MiSeq Reporter generó los datos de secuenciación. En el software “SAV” se analizaron primeramente los datos obtenidos en la secuenciación: densidad de grupos de secuenciación, porcentaje de grupos que han pasado el filtro, número total de lecturas y lecturas que pasan el filtro, porcentaje de valor Q30, porcentaje de lecturas identificadas por muestra. Posteriormente, el análisis cromosómico de cada una de las muestras se realizó en el BlueFuse Multi (Illumina). Cada cromosoma está dividido en intervalos que cubren aproximadamente 1 Mb de secuencia. Las lecturas filtradas de cada muestra se mapearon en su intervalo correspondiente (bin).

Los datos que se generan tras la secuenciación de cada muestra se transfieren a un archivo definitivo con extensión *.bam*. Estos archivos se importan al software de análisis BlueFuse Multi. Después de haber importado y procesado todas las muestras aparecen a la izquierda de la pantalla los experimentos importados.

Charts: Gráfico de los resultados de cada sonda, el número de copias (CNV) en ordenadas y la posición cromosómica en abscisas. En los charts, una línea verde representa el estado de la región: ganado, normal, perdido (Figura 15).

- **Detalles del experimento:** nos muestra las características del experimento, la muestra analizada, la célula de flujo utilizada, los índices, el archivo *.bam*.
- **Valores de calidad:** Este apartado interesa principalmente por las medidas de calidad del NGS: “QC measures”. El NGS se considera de buena calidad si se ajusta a las siguientes condiciones (Tabla 4)

	Valores Óptimos	Valores Aceptables
Average quality score:	>35	>30
Average alignment score:	>35	>30
Number of total reads:	1.000.000	700.000
Number of reads after filtering:	500.000	250.000
Overall noise (DLR):	0,2	<0,4
Valor de confianza cromosómico	1,0	>0,7

Tabla 4. Valores de calidad óptimos y aceptables establecidos para la secuenciación de muestras.

- **Caryotype:** Imagen de los cromosomas con las zonas ganadas en verde y perdidas en rojo.

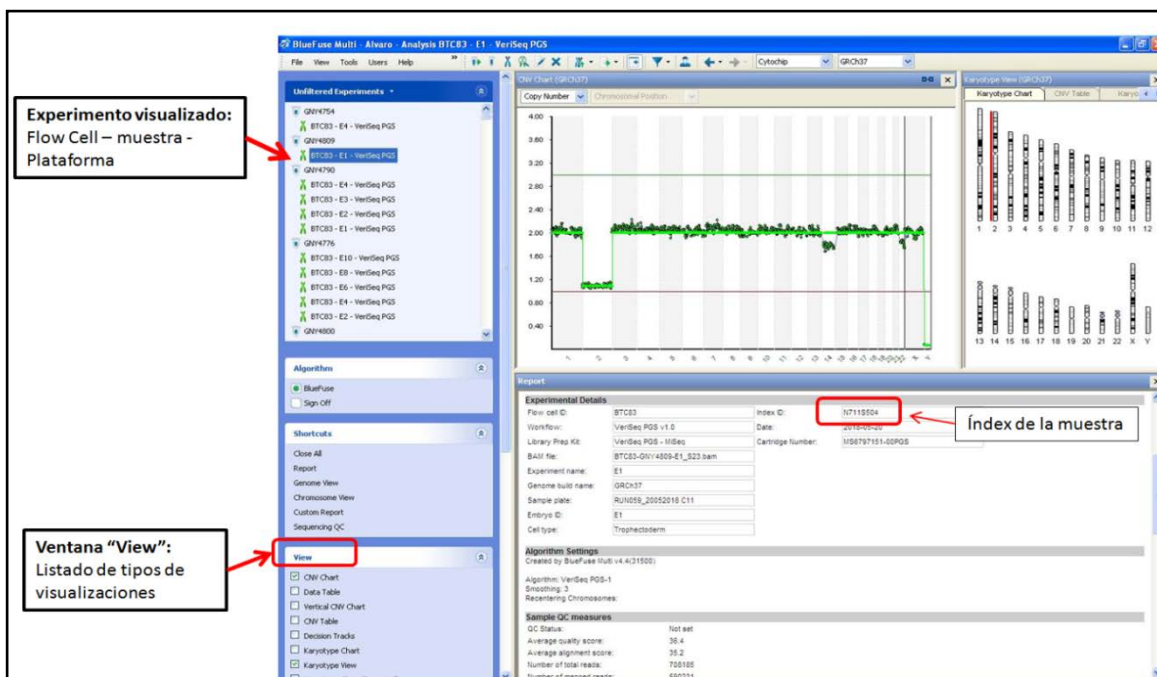


Figura 15. Pantalla principal de visualización de datos con el BlueFuse

IV.2.9. Clasificación cromosómica de embriones analizados por “array”-CGH 24 surev3, “array”-CGH 24 sure+ y NGS

El criterio para la detección y clasificación de las aneuploidías y desequilibrios (duplicaciones o deleciones) para el NGS, se determinó por los valores de variación del número de copias (CNV). Las aneuploidías con valores de CNV por debajo de 1,2 o por encima de 2,8, el software de análisis BlueFuse Multi 4.4, las clasifica como aneuploidías

puras; para valores de CNV comprendidos entre 1,8 y 2,2 se clasificaron como euploides; y los valores comprendidos entre 1,2 y 1,8 o entre 2,2 y 2,8 están por debajo del umbral de detección del software de análisis BlueFuse Multi 4.4 y se interpretaron como mosaicos (Figura 16)

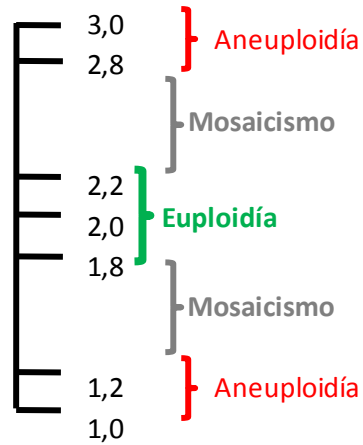


Figura 16. Clasificación de euploidía, aneuploidía, y mosaicismo en función del CNV.

EUPLOIDE O EUPLOIDE/EQUILIBRADO: Una célula cromosómicamente euploide contiene 23 pares de cromosomas sin pérdida ni ganancia de material genético. En biopsias de trofoectodermo, se considerará un embrión euploide cuando presente <30% de células aneuploides, según los límites de resolución de la técnica. Por tanto, los embriones clasificados como euploides tienen un riesgo muy reducido de presentar anomalías cromosómicas.

ANEUPLOIDE: Ganancia y/o pérdida de material genético que afecta a 1 o 2 parejas de cromosomas del embrión. Este es el caso de las biopsias de trofoectodermo en las que, al menos, el 70% de las células analizadas presenten esa anomalía. Los embriones clasificados como aneuploides tienen un riesgo elevado de ser cromosómicamente anormales. Puede tratarse de:

TRISOMÍA (T): Ganancia de una copia extra de un cromosoma o de un fragmento de algún cromosoma.

MONOSOMÍA (M): Pérdida de una copia de un cromosoma o de un fragmento de algún cromosoma.

TETRASOMÍA (TT): Ganancia de 2 copias extras de un cromosoma o de un fragmento de algún cromosoma.

NULISOMÍA (N): Pérdida de las 2 copias de un cromosoma o de un fragmento de algún cromosoma.

ANEUPLOIDE COMPLEJO: Ganancias y/o pérdidas en 3 o más parejas de cromosomas. En biopsias de trofoectodermo cuando se observe en, al menos, el 70% de las células

analizadas. Los embriones diagnosticados como anormales complejos presentan múltiples anomalías y tienen un riesgo elevado de ser cromosómicamente anormales.

MOSAICO: En biopsias de trofoectodermo, cuando se observen ganancias y/o pérdidas de material genético que afecten al 30-70% de las células analizadas. El mosaicismo es la existencia de, al menos, 2 líneas celulares distintas con diferente dotación cromosómica, y puede afectar a embriones normales y anormales.

POLIPLOIDE: Dotación cromosómica completa de más de 2 juegos cromosómicos ($>2n$).

DESEQUILIBRADO: Cualquier combinación en la que exista una ganancia o pérdida de material cromosómico del cromosoma/s implicados en la reorganización.

IV.2.10. Evaluación de la sensibilidad y especificidad para NGS

Con los resultados obtenidos con BlueFuse para las diferentes muestras, se realizó el análisis de concordancia, donde se evaluó la ploidía del embrión, el cariotipo, la ploidía cromosómica y los desequilibrios cromosómicos (duplicaciones o deleciones). Para evaluar la fiabilidad de NGS en la detección de aneuploidías y desequilibrios cromosómicos, se calculó la sensibilidad analítica y clínica; especificidad analítica y clínica; y los valores predictivos positivo y negativo del test.

- La sensibilidad define la probabilidad de que la aneuploidía sea positiva cuando está presente.
- La especificidad define la probabilidad de que la aneuploidía sea negativa cuando no está presente.
- El valor predictivo positivo define la probabilidad de que un embrión es aneuploide cuando el test detecta aneuploidías.
- El valor predictivo negativo define la probabilidad de que un embrión es euploide cuando el test no detecta aneuploidías.

IV.3. METODOLOGÍA TGP-M

El objetivo de este procedimiento es describir el proceso de búsqueda y diseño de cebadores para la amplificación de regiones de ADN que contienen mutaciones y/o marcadores microsatélites del tipo STR ("short tandem repeat"). Se utilizan los criterios estándar para el diseño de cebadores con el fin de unificar y sistematizar las condiciones de PCR y análisis posteriores. El DGP puede ser de tipo directo, en el que se podrá estudiar la mutación causante de la enfermedad, ya sea expansión, deleción, inserción, duplicación o mutación puntual. El DGP también puede ser de tipo indirecto: En este caso, el diagnóstico se basa en el análisis de segregación de los haplotipos heredados, sin necesidad de realizar el estudio de la mutación. En algunos casos, el DGP indirectos es el único recurso para determinar el haplotipo que ha heredado el embrión. Esto es así porque algunas enfermedades monogénicas están causadas por mutaciones que no se pueden diagnosticar en una sola célula, como por ejemplo las deleciones de gran tamaño.

IV.3.1. Estudio de validación e informatividad

Etapa previa al ciclo de DGP en la que se diseñan y se ponen a punto los marcadores que se emplearan posteriormente en el ciclo de DGP y se realiza el estudio de estos marcadores en la familia. Así es posible establecer la segregación y clasificar los marcadores como informativos, semi-informativos y no informativos. Este estudio consta de 2 fases:

Fase I. Estudio de concordancia, en el que se comprueba que los cebadores diseñados amplifican el tamaño y el fragmento deseado.

Fase II. Estudio de Reproducibilidad e informatividad, en el que se comprueba que la reacción es reproducible mediante la amplificación en distintas muestras de ADN de diferentes miembros de la familia y la obtención de la informatividad de los STR.

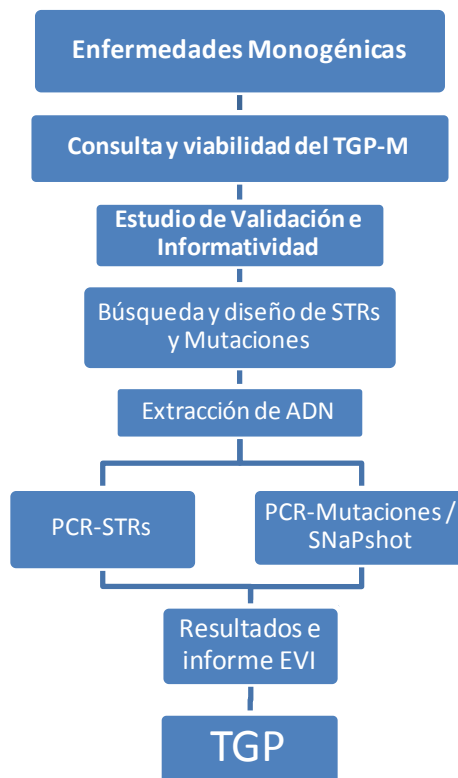


Figura 17. Secuencia de pasos en el TGP-M

IV.3.1.1. Búsqueda y diseño de cebadores para el estudio de STR y mutaciones.

IV.3.1.1.1. Búsqueda de STRs y elaboración del mapa cromosómico

Para el estudio molecular de las muestras se recurrió a los marcadores tipo STRs o microsatélites que son secuencias no codificantes repetidas en tándem en las que la unidad de repetición es de 1-4 pares de bases. Este tipo de marcador permite establecer la

segregación e identificar aquellos alelos que se transmiten conjuntamente con la mutación descrita en el probando. La selección de estos marcadores presenta una serie de premisas:

- Su cercanía al locus (mutación) tiene que ser igual o menor a 3 Megabases (Mb), con el fin de poder detectar posibles fenómenos de recombinación. Se eligen microsatélites “upstream” y “downstream” con respecto al locus y además pueden aparecer marcadores intragénicos.
- Deben presentar un elevado índice de heterocigosidad, por encima del 70%, para tener mayor probabilidad de que sean informativos en las familias.

Independientemente del tipo de enfermedad, la búsqueda de marcadores se realiza de forma estandarizada empleando siempre las mismas bases de datos. El proceso de búsqueda se realiza en 3 pasos:

1. Se examina el informe genético aportado en el que está descrita la enfermedad genética y la mutación causante.
2. Se localiza en la base de datos “Genome Data Viewer del NCBI” (National Center for Biotechnology Information) el gen causante y su localización cromosómica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/>). Se selecciona Homo sapiens (human) como organismo. En “Search in genome” se escribe el nombre del gen, en “Assembly” se selecciona la opción más reciente y en “Tracks Displayed” se seleccionan dos opciones: sequence y STS (Figura 18)

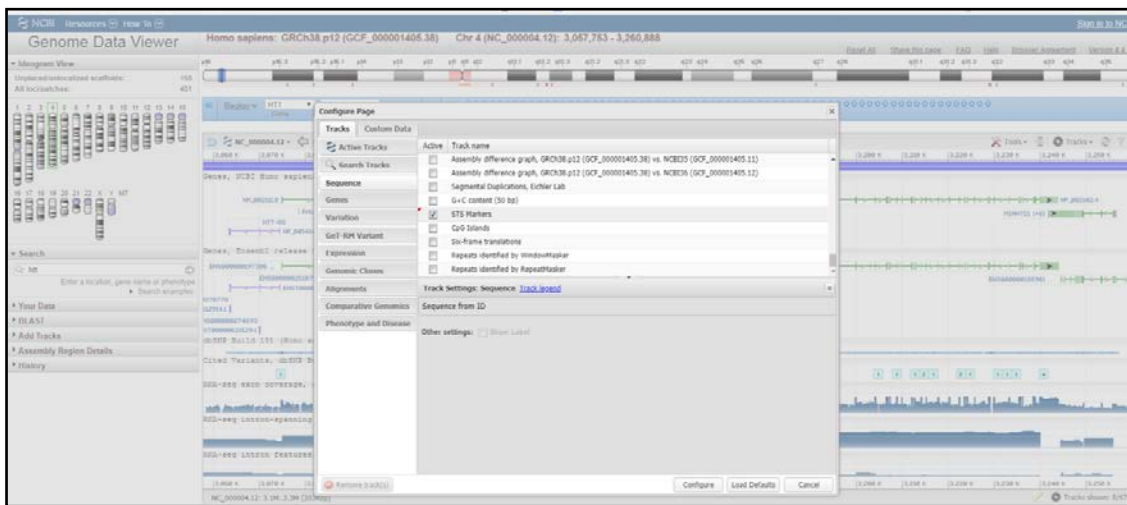


Figura 18. Pantalla principal del “Genome Data Viewer del NCBI”

3. Se buscan todos los STR disponibles dentro del rango establecido de 3Mb con respecto a la mutación (gen). También se tienen en cuenta los posibles STR intragénicos.
4. Para todos los STR localizados de una determinada enfermedad, se realiza un mapa cromosómico que incluye (Figura 19):
 - ✓ El nombre del STR,
 - ✓ El tipo de repetición del STR (dinucleótido, trinucleótido, tetranucleótido)

- ✓ La distancia al gen.
- ✓ El tamaño amplificado, que se anotará cuando se diseñen los cebadores
- ✓ La heterocigosidad (<https://www.biostat.wisc.edu/~kbroman/publications/mfdmaps/>).

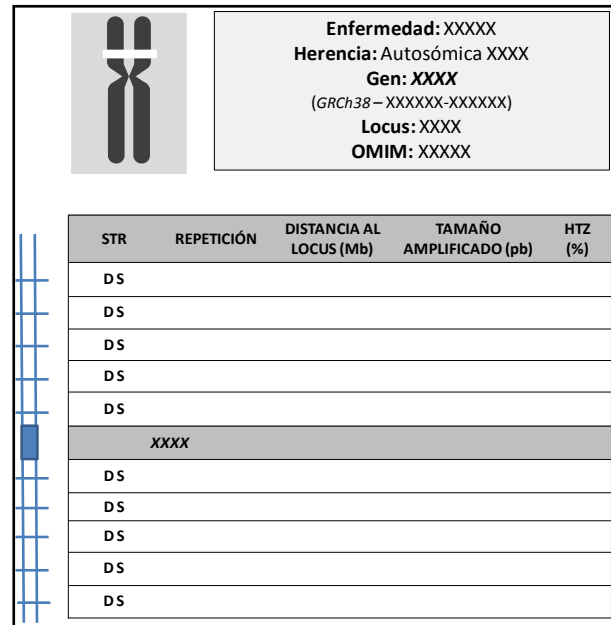


Figura 19. Mapa cromosómico

IV.3.1.1.2. Búsqueda de Mutaciones

Independientemente del tipo de mutación que se decida diseñar, la secuencia se buscará en la base de datos “Ensembl Genome Browser” (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index)

1. El primer paso es examinar el informe genético aportado en el que está descrita la enfermedad genética y la mutación causante.
2. A continuación en la base de datos “Ensembl Genome Browser” se introduce el nombre del gen y se busca la mutación causante. El programa presenta varios transcritos; se selecciona el de mayor tamaño y se busca la mutación en el cDNA y en la secuencia de exones e intrones.

IV.3.1.1.3. Diseño de Cebadores para amplificación de STRs y mutaciones.

Los cebadores que amplifican por PCR, tanto los microsatélites como la región del locus que comprende la mutación, se han diseñado utilizando distintos programas informáticos: “Oligo Calculator”, “Primer 3” (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) y “Primer Blast” (NCBI). El programa “Primer 3” permite diseñar cebadores con una serie de criterios fijos. Las características de los cebadores serán las siguientes (Tabla 5)

Característica	Valor
% CG	<60%
Longitud de los cebadores	18-23
Tª melting	<60º (<1º diferencia entre el cebador “forward” y “reverse”)
Producto amplificado	<250 pb
Anillamientos alternativos	Ausencia

The screenshot shows the Primer3 web interface. It includes fields for 'Sequence Id', 'Targets', and 'Excluded Regions'. Below these are 'Product Size Ranges' with input boxes for 'Number To Return' (25), 'Max Repeat Mispriming' (11.00), 'Pair Max Repeat Mispriming' (24.00), 'Max Template Mispriming' (11.00), and 'Pair Max Template Mispriming' (24.00). The 'General Primer Picking Conditions' section contains numerous sliders and dropdown menus for parameters like 'Primer Size', 'Primer Tm', 'Product Tm', 'Primer GC%', 'Max Self Complementarity', 'Max 3' Self Complementarity', 'Max #N's', 'Max Poly-X', 'Inside Target Penalty', 'Outside Target Penalty', 'First Base Index', 'CG Clamp', 'Concentration of monovalent cations', 'Salt correction formula', 'Concentration of divalent cations', 'Concentration of dNTPs', and 'Annealing Oligo Concentration'. There are also checkboxes for 'Liberal Base', 'Show Debugging Info', and 'Levercase masking'.

Tabla 5. Características del diseño de cebadores y software “Primer3” en el diseño de cebadores.

Con los criterios que hemos indicado, el programa suministra una lista de posibles parejas de cebadores para amplificar el fragmento deseado.

OLIGO	len	tm	gc%	any	3'	rep	seq
Left primer	21	50,62	33,33	4,00	1,00	11,0	TATGATGAGCAGATGTGTATT
Right primer	19	51,27	42,11	3,00	1,00	10,0	CTCACCTTGATTGCTTAGA
PRODUCT SIZE: 174, PAIR ANY COMPL: 4,00, PAIR 3' COMPL: 1,00							

Los criterios de elección son:

- índice “any” (< 6).
- índice “rep” (10 ó 11)
- índice “pair any compl” (≤5)
- índice “pair 3'” (0,00 ó 1,00).

Una vez seleccionada la pareja de cebadores se comprueba que no anillan consigo mismos (“self-complementarity”) o forman bucles (“hairpin”) en la herramienta “Oligo Calculator” (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). La secuencia de ADN junto con los cebadores diseñados se comprueban una última vez para confirmar que no amplifican en otras regiones del genoma no deseadas y que puedan resultar en amplificados no específicos (BLAST). Para ello se utiliza la base de datos <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Este diseño de cebadores se aplica tanto para el estudio de marcadores tipo STRs como para el estudio de una mutación que se va a realizar mediante análisis de fragmentos, es decir: expansiones, deleciones, inserciones y duplicaciones.

Los cebadores se marcan con fluorescencia (6-Fam) en la posición 5' para que el fragmento amplificado pueda ser detectado mediante análisis de fragmentos llevado a cabo en un secuenciador automático tipo *ABI 3130xl*.

El diseño de cebadores para el estudio de las mutaciones puntuales está basado en la reacción de minisequenciación (SNaPshot®, Applied Biosystems), diseñados para anillar una base antes del sitio diana y elongar un solo dideoxinucleótido marcado (ddNTPs), siendo el color de este fluorocromo específico para cada uno de los cuatro posibles nucleótidos a añadir (Figura 20). Presenta algunas diferencias con respecto al diseño de los STRs, si bien, se utilizan los mismos programas, estándares y características anteriormente mencionadas. Las variantes que presenta el diseño son:

- La amplificación por PCR de la secuencia de ADN que contiene la mutación se realiza mediante la utilización de tres cebadores. Se realizan dos rondas de PCR previas a la minisequenciación que tienen como finalidad aumentar el rendimiento y la sensibilidad de esta reacción. Según el diseño que se realice se pueden obtener dos cebadores "forward" y un "reverse"; o bien un cebador "forward" y dos "reverse".
- Cada mutación presenta un cebador específico para la reacción de minisequenciación o "SNaPshot" que finaliza una base antes de la mutación.

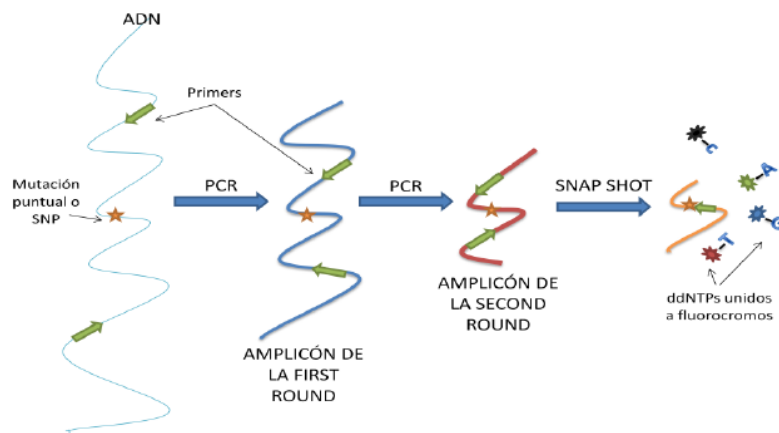


Figura 20. Proceso de amplificación para mutaciones puntuales

Una vez diseñados, se solicitó la síntesis de los cebadores. El cebador "forward" marcado con el fluorocromo 6-fam se purificó mediante "HPLC" y el cebador reverse no marcado, mediante el método "cartridge". La concentración que se solicita de ambos es 0,05 μmol . El proveedor remitió los cebadores liofilizados y a temperatura ambiente. A continuación, se comprobó la cantidad sintetizada de cada uno de ellos, y se resuspendieron en agua libre de nucleasas para obtener una concentración final de 50 pmol/ μl . Se prepararon alícuotas de cada uno y se congelaron a -20°C hasta su uso.

IV.3.1.2. Aislamiento de ADN genómico a partir de sangre periférica

La extracción de ADN se realizó de manera automática con “Auto Mate Express™ Forensic DNA Extraction System” y el “kit” de extracción correspondiente “PrepFiler Express™ extraction kit”. Es un sistema de extracción basado en el uso de partículas magnéticas que permite el aislamiento rápido y automatizado de ácidos nucleicos. La extracción se realizó a partir de 40 µl de sangre periférica extraída con anticoagulante EDTA o Torundas (células bucales). Estos volúmenes iniciales se eluyen en 50 µl de tampón de elución, obteniéndose rendimientos medios de unos 50ng/µl. Una vez obtenido el ADN, se usa 1µl para cuantificar y medir su calidad con el espectrofotómetro NanoDrop.

IV.3.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en termocicladores “Applied Biosystem Vereti™ Thermal Cycler”. El primer paso será realizar el “Estudio de Concordancia”. Mediante PCR cada marcador, mutación mediante análisis de fragmentos y primera ronda de amplificación de mutaciones puntuales se va a testar a dos temperaturas diferentes, con objeto de determinar la temperatura de amplificación óptima y comprobar que el tamaño amplificado corresponde al diseñado.

El volumen final de reacción fue de 10µl por tubo y se utilizó un “kit” comercial, “QIAGEN Multiplex PCR” (Cat no. 206145), que nos permite la amplificación de uno o más marcadores en una única reacción. El “kit” contiene una “Master Mix” que incluye concentraciones pre-optimizadas de “HotStar Taq DNA Polymerase” y MgCl₂, dNTPs y tampón de PCR. También contiene “Q-solution”, cuya función es modificar la curva de “melting” (separación de la doble cadena de ADN) de los amplificados de ADN con el fin de facilitar la amplificación conjunta de todos los fragmentos. La concentración de cebadores que añadimos es de 3µM y aproximadamente 20-30ng de ADN del probando y sus familiares.

PCR - Estudios estándar de informatividad

<i>QIAGEN® Multiplex PCR</i>	5 µl
<i>Q-Solution</i>	2µl
<i>Primer Mix</i>	1 µl (3µM)
<i>H₂O de</i>	1 µl
<i>ADN</i>	1 µl (20-30 ng)
	Vf = 10 µl

Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR realizadas en los estudios de informatividad

El programa de PCR usado para la amplificación de los marcadores STRs, mutación del tipo análisis de fragmentos y amplificación de mutaciones puntuales tiene un paso de desnaturalización a 95°C de 15 minutos, seguido de 30 ciclos (95°C y 30 segundos, la temperatura de anillamiento correspondiente para cada multiplex 90 segundos y 72°C y 60

segundos) y un último paso a 60°C durante 30 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se enfría automáticamente a 4 °C y se mantiene así hasta el momento de su utilización.

El resultado de las amplificaciones de los marcadores tipo STR y las mutaciones del tipo análisis de fragmentos se analizarán en el secuenciador *ABI3130xl*, ya que estos amplificados contienen cebadores marcados con el fluorocromo 6-fam. El secuenciador *ABI3130xl* es un analizador genético de ADN basado en electroforesis capilar y detección inducida por láser. Permite, además de la secuenciación automática de ADN, realizar análisis genético utilizando fluorescencia para detectar los fragmentos generados. Los fragmentos se analizaron con el “GeneMapper Software” (v4.0) que permite un rápido análisis de los resultados, incluida la detección de la posición y del tamaño de cada uno de los alelos.

Por otro lado, para determinar la temperatura óptima de amplificación en el caso de las mutaciones puntuales, se debe hacer una electroforesis con los fragmentos obtenidos en las dos rondas de amplificación ya que los cebadores de estas PCRs no están marcados con fluorescencia y no se pueden analizar con el equipo *ABI3130xl*.

Se realizó una electroforesis en agarosa al 2% cargando 2,5 µl del producto de PCR y 1 µl de tampón de carga. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1mM) a 120 V durante 30 minutos y posterior visualización al ultravioleta. Para estimar el tamaño de la banda amplificada se empleó el marcador de peso molecular “Superladder-low”100 pb (*GenSura*).

IV.3.1.4. Pre-minisequenciación

Tras la comprobación en gel de agarosa de los fragmentos amplificados en primera y segunda ronda de amplificación de las mutaciones puntuales, se purifican 2,5µl del producto de PCR (segunda ronda) con 1µl ExoSAP-IT (USB 78200/01/02/05). El volumen final de 3,5µl se incubó a 37°C durante 15 minutos, con un paso final a 80°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Este paso se denomina pre-minisequenciación y su finalidad es degradar el exceso de cebadores y de nucleótidos para que no interfieran con la reacción de minisequenciación posterior.

IV.3.1.5. Minisequenciación

Para la reacción de minisequenciación usamos 1µl del producto de PCR purificado; 0,1 µl (5 pmol) del cebador específico del SNaPshot diseñado; 2,5 µl de “SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix” (Applied Biosystems) y completamos con 1,4 µl de agua destilada desionizada, alcanzando un volumen final de 5 µl. Finalmente, la reacción sigue con un programa de 10 ciclos (96 °C durante 10 segundos, 50°C durante 5 minutos, 60°C durante 30 segundos).

Los resultados de esta minisequenciación se analizaron en el secuenciador *ABI3130xl* mediante “Gene Mapper Software” (v4.0).

IV.3.1.6. Análisis de fragmentos y mutaciones puntuales

Los productos de PCR de los marcadores STRs y de las mutaciones se analizaron mediante electroforesis capilar utilizando el analizador genético “Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (ABI)”. Todos los productos de ADN genómico obtenidos se diluyeron con agua libre de nucleasas antes del análisis en una dilución 1:120 debido a su alta concentración. Los productos procedentes de los amplificados mediante WGA se diluyeron 1:50. Los productos se mezclaron con formamida y un estándar de tamaño para permitir establecer el tamaño de los picos. Las cantidades usadas para cada uno de los análisis se detallan en la siguiente tabla (Tabla 7).

	STR y Mutaciones (fragmentos)	Mutaciones Puntuales
Formamida	10 µl	10 µl
Estándar de tamaño	0,2 µl de GS500LIZ	0,2 µl de GS120LIZ
Muestra	1 µl	1 µl

Tabla 7 – Mezcla utilizada para analizar las muestras en el secuenciador.

Los productos analizados en el ABI 3130xl se sometieron a electroforesis capilar. Las condiciones de la electroforesis para cada uno de los análisis fueron las recogidas en la siguiente tabla (Tabla 8).

	STR y Mutaciones (fragmentos)	Mutaciones Puntuales
Voltaje de inyección	1,2 Kvoltios	1,2 Kvoltios
Tiempo de inyección	23 segundos	23 segundos
Voltaje de carrera	15,0Kvoltage	15,0Kvoltage
Tiempo de carrera	1.200 segundos	600 segundos

Tabla 8 – Parámetros utilizados para la electroforesis capilar

La separación de los fragmentos se realizó a 60 ° C durante el tiempo indicado para cada una de las muestras utilizando el “Performance Optimized Polymer 7” (POP-7™) y el tampón del analizador genético 1x con EDTA. Los datos se analizaron utilizando el software “Gene Mapper Software” (v4.0).

IV.3.1.7. Análisis de resultados y elaboración de árbol genealógico.

El análisis de los fragmentos de PCR y las mutaciones permitió, para cada familia, obtener el haplotipo o haplotipos de riesgo para su posterior detección en las células embrionarias biopsiadas.

A la hora de estudiar los STRs puede suceder que la pareja comparta los mismos alelos. En tal caso se denominan STRs “no informativos”. Si comparte uno de los alelos se describen como STRs “semi-informativos” y si no comparten ninguno de los dos alelos se les considera STRs “informativos” (Figura21).

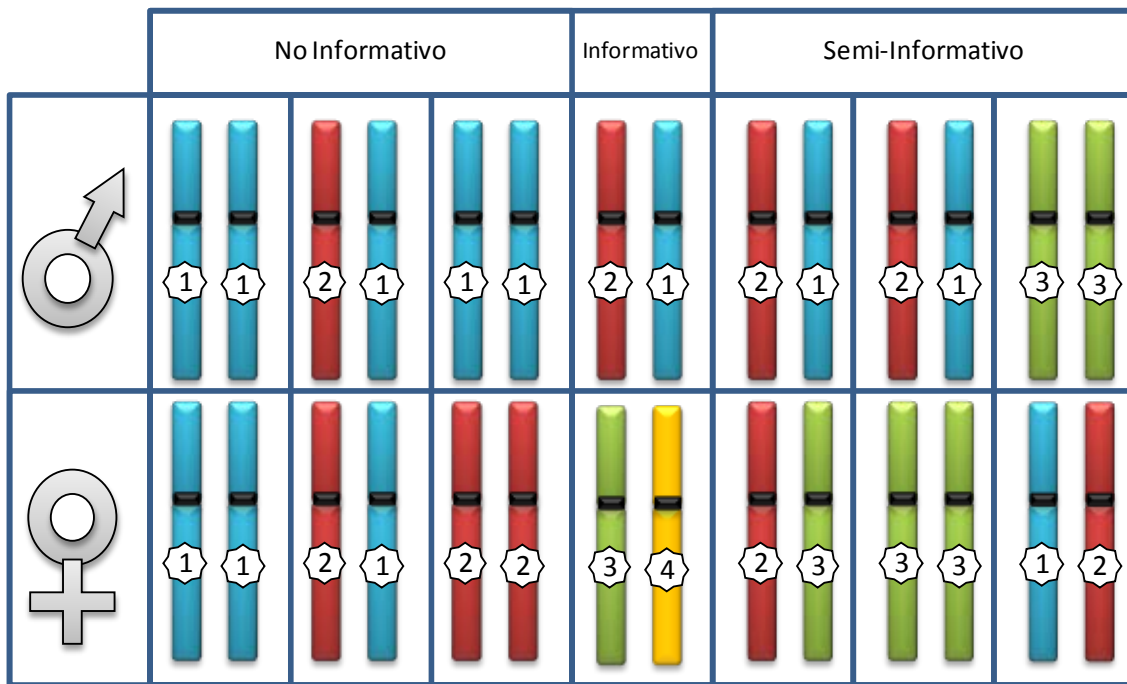


Figura 21. Esquema de los distintos tipos de marcadores que se pueden encontrar en un estudio de segregación llevado a cabo en una pareja que consulta por un TGP-M.

En la fase de estudio de informatividad se escogen aquellos marcadores que nos proporcionen más información sobre el haplotipo ligado a la mutación. Así se puede establecer qué alelos se transmiten conjuntamente con la mutación o mutaciones y utilizarlos posteriormente en el TGP.

Se elaboró un árbol genealógico para cada familia que incluye el resultado de todos los STRs analizados. Esto permitió inferir el posible resultado esperado en el TGP y tener una visión global de los resultados. Para los casos en los que el resultado no permitía tener un diagnóstico fiable en los embriones, se amplió el estudio de informatividad con nuevos marcadores.

En el análisis de los embriones durante el TGP, se utilizaron los STR informativos y semi-informativos. Se define como Eficiencia de amplificación, a la proporción de reacciones en la que uno o más alelos se amplifica correctamente. Se define como Tasa de Fallo de amplificación, a la proporción de reacciones en las que no se detecta amplificación de material genético. Se define como Tasas de "Allele Drop-Out" (ADO) al número de reacciones en las que solo amplifica un alelo dividido por el total de reacciones en las que al menos amplifica un alelo.

Los criterios internos de calidad nos permiten clasificar a los embriones como "Sanos", "Portadores" y "Afectos". Los embriones fueron clasificados como embriones "Sin Diagnóstico Concluyente", cuando presentaban fenómenos de recombinación genética, o una tasa de ADO por encima del 50%. Los embriones fueron clasificados "Sin Diagnóstico", cuando presentaban ausencia de amplificado de material genético.

IV.3.2. TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE ENFERMEDADES MONOGENICAS

IV.3.2.1. Lisis celular y amplificación de genoma completo

Los blastómeros, junto con muestras de trofoectodermo y células aisladas de la línea celular fueron lisados y amplificados con el “kit” “Genomiphi” con modificaciones. La amplificación de ADN está basada en “Multiple displacement amplification” (MDA) que permite realizar ilimitadas pruebas con ADN a partir de muestras de ADN pequeñas o limitadas.

El “GenomiPhi DNA Amplification Kit de GE Healthcare” (Product number 25-6600-31) es un “kit” de amplificación de ADN que permite la obtención de gran cantidad de moléculas de ADN a partir de una cantidad de partida tan pequeña como una sola célula. Utiliza la ADN polimerasa del bacteriófago *Phi29* para amplificar de manera exponencial moldes de ADN de cadena doble o sencilla a través de una PCR. Mediante este protocolo se puede llegar a obtener hasta 7 µg de ADN en aproximadamente 2 horas.

En un primer paso, se realizó una lisis alcalina con el tampón de lisis (ALB) que contiene NaOH 1M y DTT 1M (Dithiothreitol) en acetato sódico (AcNa). Las muestras biopsiadas se recogieron en 2,5µl de “washing media” (0,1% de PVA; Poly-vinil alcohol) y fueron lisadas añadiendo 2,5µl de buffer de lisis alcalino. Las muestras se mantuvieron a -80°C durante 30 minutos. Una vez lisadas, se le añadió 5 µl del “Sample Buffer GenomiPhi” y las muestras se incubaron en el termociclador durante 3 minutos a 95°C. Tras este proceso, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo a 4°C durante 5 minutos (antes de que la temperatura empiece a bajar). Seguidamente, a cada muestra se le añadió 0,8 µl Tricina 0,5M (tampón de neutralización), 8,2 µl “Reaction Buffer GenomiPhi” y 1 µl de la enzima. Las muestras se incubaron en el termociclador dos ciclos de 60 minutos a 30°C y un ciclo final de desactivación de la enzima de 10 minutos a 65°C, bajando a un paso de 4°C.

IV.3.2.2. PCR sobre los productos de MDA (STRs y mutaciones)

En esta fase se lleva a cabo la amplificación por PCR de todos aquellos marcadores tipo STR informativos y semi-informativos seleccionados en la fase del estudio de validación e informatividad. Es decir, partiendo de los productos de MDA se llevarán a cabo las PCR para la obtención de los resultados de los marcadores STRs y las mutaciones.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en termocicladores “Applied Biosystem Vereti™ Thermal Cycler”. Se utilizó el “kit” comercial, “QIAGEN Multiplex PCR” (Cat no. 206145), que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación. Los volúmenes de reactivos utilizados en cada reacción se indican en la siguiente tabla:

PCR –Diagnóstico Genético Preimplantacional

<i>QIAGEN® Multiplex PCR</i>	6,5 µl
<i>Q-Solution</i>	2,6 µl
<i>Primer Mix</i>	1,3 µl (6µM)
<i>H₂O de</i>	1,1 µl
<i>ADN / MDA</i>	1,5 µl
	Vf = 13 µl

Tabla 9. Mezcla de reacción para PCR realizadas en los casos de TGP

El programa de PCR utilizado cuenta con un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 10 ciclos (96°C y 30 segundos, (Tª STR) y 60 segundos y 72 °C y 90 segundos), 30 ciclos (94°C y 30 segundos, (Tª STR) y 60 segundos y 72 °C y 90 segundos), y un último paso a 60 °C durante 15 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se enfría automáticamente a 4 °C y se mantiene así hasta el momento de su utilización.

El resultado de las amplificaciones de los marcadores tipo STR y las mutaciones del tipo análisis de fragmentos se analizaron en el secuenciador *ABI3130xl*.

En los casos del análisis de las mutaciones puntuales, a partir de un determinado volumen del amplificado de esa primera ronda de amplificación, se realiza otra PCR (segunda ronda). Los volúmenes de reactivos utilizados en cada reacción se indican en la siguiente tabla:

PCR – DGP – Segunda ronda mutaciones

<i>QIAGEN® Multiplex PCR</i>	6,5 µl
<i>Q-Solution</i>	2,6 µl
<i>Primer Mix</i>	1,3 µl (4µM)
<i>H₂O de</i>	1,6 µl
<i>ADN primera ronda</i>	1 µl
	Vf = 13 µl

Tabla 10. Mezcla de reacción para segunda PCR en los casos de TGP

Una vez finalizada esta segunda ronda de amplificación, los productos de PCR se purifican con ExoSAP-it y se procede a la reacción de minisequenciación o “SNaPshot”. Los volúmenes y los tiempos de PCR son similares a los realizados en la puesta a punto del protocolo. El resultado de la minisequenciación se analizará en el secuenciador *ABI3130xl*.

IV.3.3. Test Genético Preimplantacional combinado: enfermedades monogénicas y screening de aneuploidías o alteraciones cromosómicas estructurales.

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) de enfermedades monogénicas permite analizar una alteración genética en los embriones de parejas portadoras de enfermedades genéticas graves y seleccionar embriones sanos para la transferencia al útero materno. Sin embargo, este análisis no permite conocer la dotación cromosómica del embrión, ya que no se dispone de información de las aneuploidías cromosómicas, y no se puede asegurar su estado de euploidia.

La utilización de las técnicas de CCS, como el “array”-CGH y posteriormente el NGS, permite el desarrollo de la técnica denominada Combo-TGP. Así se puede combinar el análisis de los 23 pares de cromosomas y el estudio de una enfermedad monogénica utilizando una única muestra. Se aplica tanto para los casos de portadores de alteraciones cromosómicas que además presentan una enfermedad monogénica, como para aquellos casos con indicación de edad materna avanzada o factor masculino y así incrementar la eficiencia del diagnóstico y las posibilidades de embarazo.

El punto de partida de este proceso es la amplificación del genoma completo mediante WGA de la muestra biopsia en día 3 de cultivo embrionario (Sureplex) o en día 5/6 (Genomiphi). De este modo, se obtiene una cantidad suficiente de ADN que posibilita el doble análisis (Figura 22).

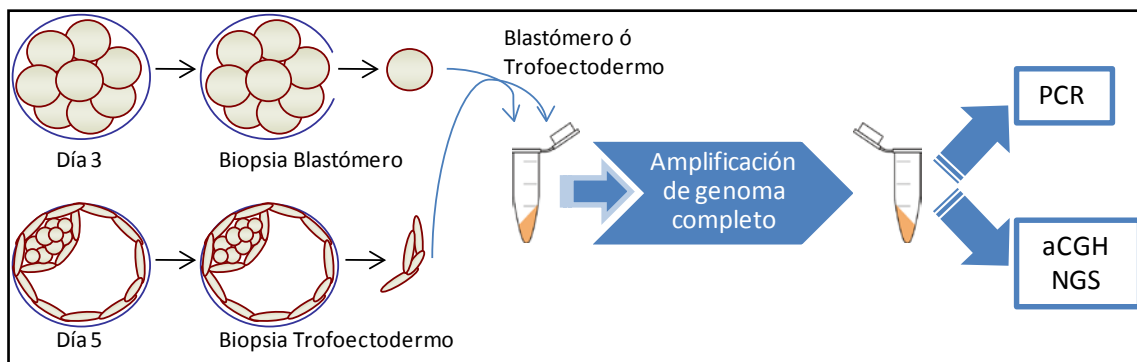


Figura 22. Etapas del proceso del COMB-TGP. Se realiza la biopsia embrionaria, en día 3 de cultivo o en etapa de blastocisto. A continuación se procesa la muestra mediante WGA. Una parte del material se utilizará para el estudio de la enfermedad monogénica y el resto para el análisis de aneuploidías.

V. Resultados

V. RESULTADOS

La secuenciación masiva (NGS) se validó como una técnica para detectar aneuploidía embrionaria en los pacientes de FIV con indicaciones de edad materna avanzada, factor masculino, fallo de implantación (TGP-A) y para detectar desequilibrios cromosómicos en los embriones de pacientes portadores de alteraciones cromosómicas estructurales (TGP-SR).

Los pasos que se siguieron para la validación fueron:

1ª Fase: Resultados de la Validación:

Para la validación del TGP de aneuploidías se llevó a cabo la NGS en células individuales, procedentes de una línea celular con una aneuploidía conocida (GM50159), simulando biopsia de blastómero (1 sola célula) y de trofoectodermo (5-10 células).

Para la validación del TGP de alteraciones cromosómicas estructurales, se utilizaron muestras con desequilibrio cromosómico conocido procedentes del control de calidad externo (UK NEQAS). Estas muestras se amplificaron mediante dos métodos WGA distintos y se analizaron mediante NGS. Con el fin de descartar posibles errores introducidos por el WGA, un embrión que presentaba desequilibrio, diagnosticado previamente mediante "array"-CGH, se desvitrificó y rebiopsió para tomar una nueva muestra de trofoectodermo y analizarla mediante NGS.

A continuación se realizó la validación para TGP de aneuploidías y de alteraciones cromosómicas estructurales, mediante la selección aleatoria y análisis ciego de ADN amplificado procedente de blastómeros y células del trofoectodermo de embriones biopsiados en día 3 y día 5/6 de cultivo embrionario, respectivamente.

2ª Fase: Análisis de los resultados clínicos obtenidos

Se presentan los resultados de los ciclos de TGP-A realizados tras la validación en el periodo noviembre de 2016-2018.

Se presentan los resultados de los ciclos de TGP-SR obtenidos entre el período 2011-2017.

En el estudio de las enfermedades monogénicas, se presenta la estandarización de un protocolo de PCR único, que permite el estudio de cualquier enfermedad monogénica; así como los resultados globales de los ciclos de TGP-M y ciclos de COMB-TGP obtenidos en el periodo 2008-2018.

Por último se presentan los resultados de Exactitud diagnóstica, tasa de Fallo de Amplificación y tasa de Allele Drop-Out (ADO), obtenidos en las 13 enfermedades más frecuentemente analizadas para el TGP-M en nuestro laboratorio, y que serán la base para la realización del TGP-M mediante NGS.

V.1. Primera Fase: Resultados de la Validación:

V.1.1. Tipificación mediante “array”-CGH de oligos y NGS de la línea celular (GM50159).

El cultivo de la línea celular se realizó por la empresa Ampicel y el aislamiento y procesamiento de las células individuales se realizó en Geniality Diagnóstico Genético. Los resultados obtenidos en la tipificación de la línea celular mediante realización de un “array”-CGH 44K de oligos (Human “array” CGH 44K) se presentan en la Tabla 11:

	Obtenido	Intervalo óptimo
Concentración	770,2	>20 ng/ µl
Calidad del DNA (medido a abs 260/280)	1,97	1,6-1,8
Calidad del DNA (medido a abs 260/230)	1,96	>1,8 (>2)
Dispersión DLR (derivada del log de ratio)	0,38	<0,30
Nº Sondas aceptadas análisis Cy5	44.445	Max 45.600
% Sondas aceptadas análisis Cy5	97,47	>90%
Nº Sondas aceptadas análisis Cy3	44.670	Max 45.600
% Sondas aceptadas análisis Cy3	97,96	>90%

Tabla 11. Resultados de la cuantificación y marcaje.

En el “array”-CGH de oligos se detectó un cambio en el cromosoma 18, consistente en una duplicación de 14,93 megabases. El resultado de la duplicación en se muestra en la figura 23.

Nº Alteración	Cromosoma / Tipo de Cambio / #Sondas	Origen	Fin	Tamaño (Mb)
1	chr18 / Ganancia / 185	46675955	61601832	14.93

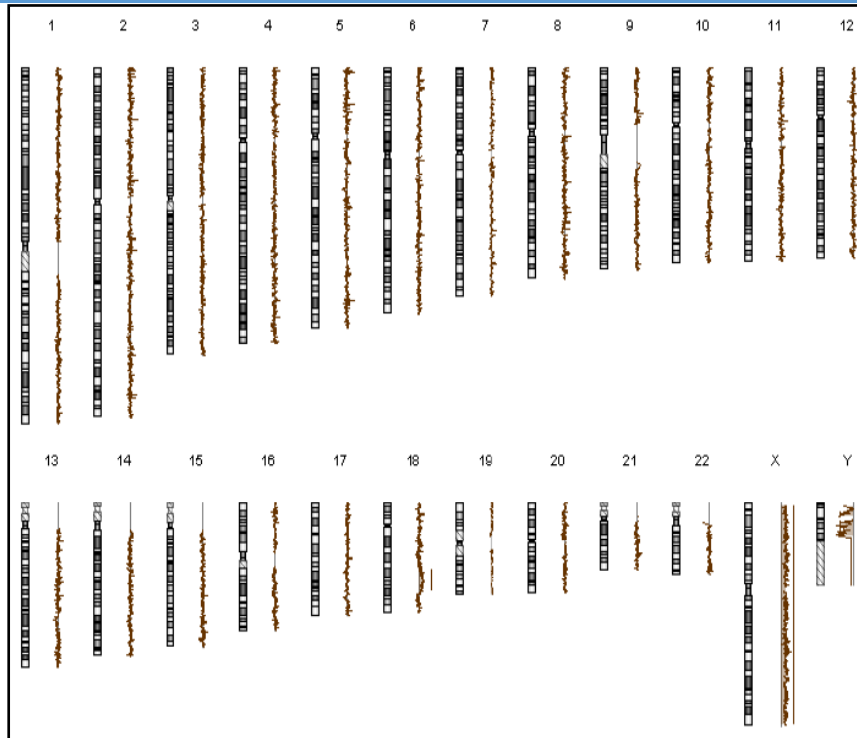


Figura 23. Ejemplo del resultado del análisis de la línea celular GM50159 analizada mediante “array”-CGH 44k de oligos. Se observa una duplicación en el brazo 18q representado por una línea a la derecha del cromosoma.

Una vez confirmada la presencia de la duplicación en el brazo 18q, se lleva a cabo la NGS en células individuales procedentes de la línea celular (GM50159), simulando biopsia de blastómero (1 sola célula) y de trofoectodermo (5-10 células). Para ello se entubaron las células aisladas en distintos tubos de 0,2ml, cada uno de ellos contenía un número distinto de células: una célula, dos células, cinco células y 10 células.

Las células se amplificaron mediante el “kit” “Sureplex” y se comprobó su amplificación en gel de agarosa al 1,5%, previo a su análisis mediante NGS. El resultado óptimo de la amplificación produce un “smear” que va desde 1 kb a 100 pares de bases, y que presenta una mayor intensidad en torno a las 500 pares de bases. El WGA fue exitoso para el 100% de las células analizadas (Figura 24).



Figura 24. Resultado de amplificación de muestras que contienen 1 célula, 2 células, 5 células y 10 células

De las células con resultado de amplificación positivo, se procesaron mediante NGS para la confirmación de los resultados del sexo y la duplicación en el brazo q del cromosoma 18 en cada una de las muestras (Figura 25)

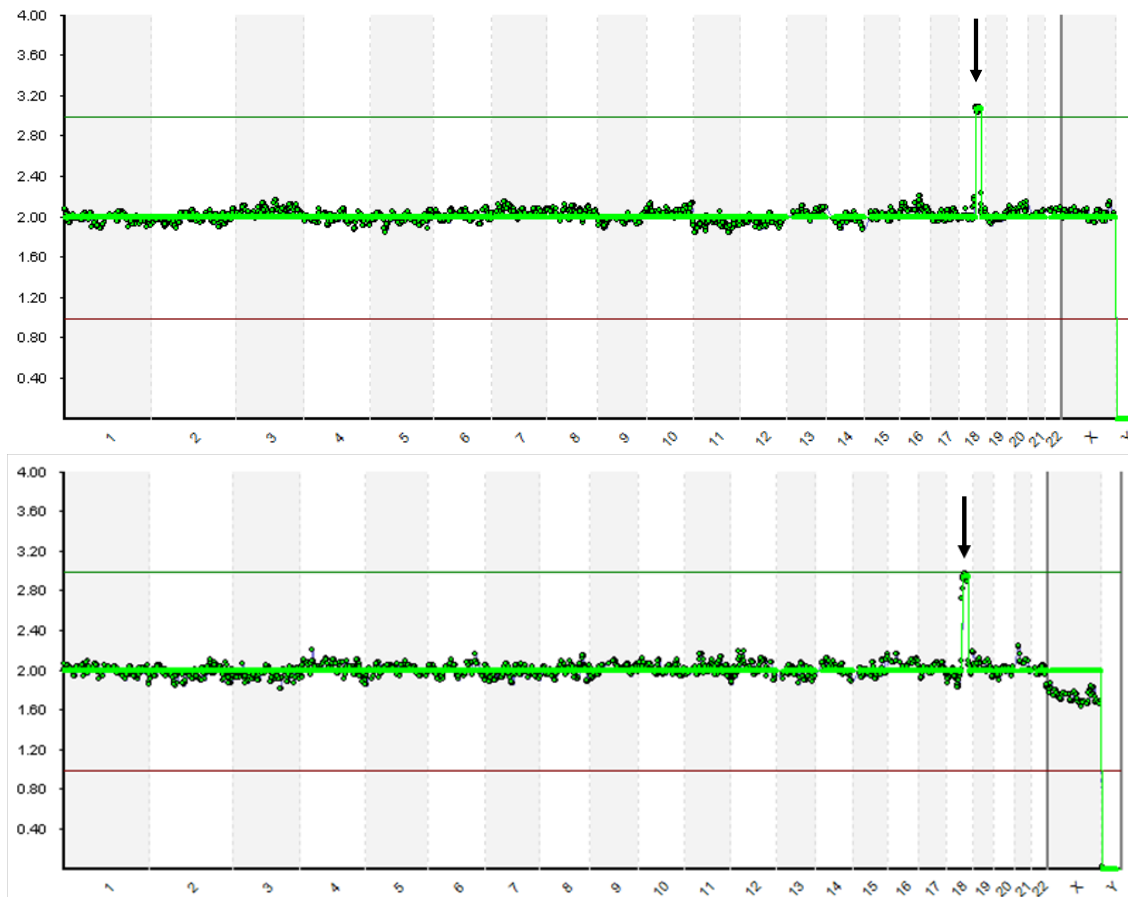


Figura 25. Ejemplo del resultado del análisis mediante NGS de la línea celular GM50159. En la imagen superior se muestra el resultado del análisis de una única célula. En la imagen inferior se muestra el resultado del análisis de 10 células. La flecha negra indican cromosoma desequilibrado. El eje Y de la imagen del NGS indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y el número del cromosoma está representado en el eje X. La alteración incluye una duplicación en el cromosoma 18 (18q21.2q22.1), detectada como un cambio en los puntos hacia la línea verde (ganancia).

V.1.2. Análisis comparativo mediante NGS de muestras amplificadas con “Sureplex” y “Genomiphi”

Con el fin de detectar posibles errores introducidos por el método de amplificación de genoma completo, se analizaron mediante NGS un total de seis muestras con desequilibrio conocido que se amplificaron mediante dos métodos distintos “Sureplex” y “Genomiphi”. No se detectaron artefactos que pudieran alterar el resultado final del diagnóstico. Se obtuvo resultado por secuenciación masiva en todas las muestras incluidas en el experimento 6/6 (100%). El diagnóstico final de la muestra transferible/no transferible obtenido con NGS para ambos tipos de WGA fue concordante 6/6 (100%). Una única muestra con translocación 46,XX,t(4;5)(p15.3;p15.1), presentaba una duplicación del cromosoma 4 (4p16.3→p15.31) y una deleción del cromosoma 5 (5p15.33→p15.1) que fue detectada por NGS con amplificación mediante “Sureplex”. El resultado del NGS obtenido para la muestra amplificada con “Genomiphi” indicaba solamente la deleción del cromosoma 5 (5p15.33→p15.1). Este resultado podría deberse a que el número de lecturas y lecturas filtradas no alcanzó el umbral de calidad aceptado. Sin embargo, el diagnóstico final de la muestra no cambió (Tabla 12).

Muestra	Alteración cromosómica estructural	SUREPLEX - NGS	GENOMIPHI - NGS	Concordancia
Muestra 1	46,XX,ins(6;3)(p11.1;q27q25)	XY, (3q25.2q26.31)x3	XY, (3q25.2q26.31)x3	Sí
Muestra 2	46,XX,t(9;13)(q21.3;q12.1)	XX, (9p24.3q21.31)x3	XX, (9p24.3q21.31)x3	Sí
Muestra 3	45,XX,der(13;21)(q10;q10)	46,XX	46,XX	Sí
Muestra 4	46,XX,t(15;18)(p11.2;q22.1)	XX, (18q22.1q23)x1	XX, (18q22.1q23)x1	Sí
Muestra 5	46,XX,t(4;8)(p16;p23)	46, XY	46, XY	Sí
Muestra 6	46,XX,t(4;5)(p15.3;p15.1)	(4p16.3p15.31)x3 ; (5p15.33p15.1)x1	(5p15.33p15.1)x1	*

Tabla 12. Características de las muestras estudiadas mediante NGS amplificadas con "Sureplex" y "Genomiphi".

V.1.3. Rebiopsia y reanálisis de muestra de trofoectodermo.

Examinamos dos muestras diferentes de trofoectodermo del mismo embrión en un intento de evaluar la precisión del método WGA. Elegimos la muestra de TE con una duplicación del cromosoma 5p15.33 → p11 que fue detectada por NGS (translocación paterna 46, XY, t(5; 21) (p10; q10)). El resultado de la re-biopsia de la muestra de TE indicó la misma duplicación del cromosoma 5p15.33 → p11. (Figura 26)

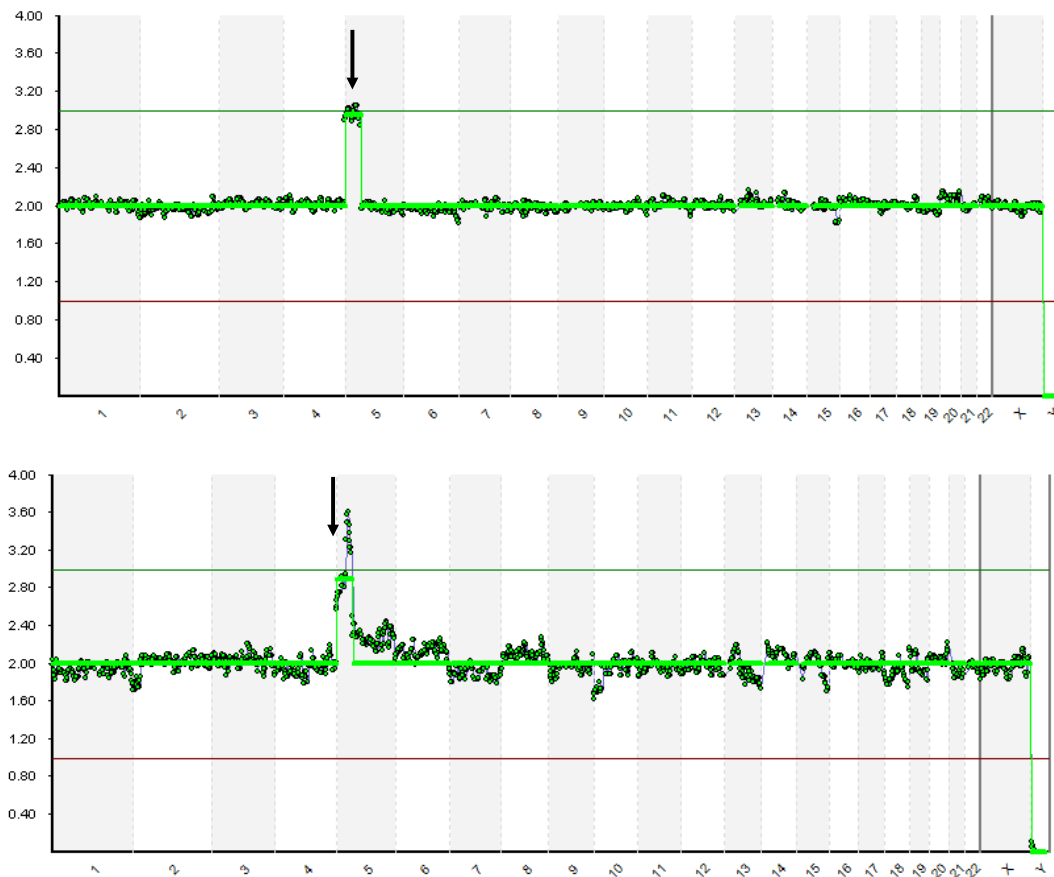


Figura 26. Ejemplo de una muestra de TE (imagen superior) y Re-biopsia (imagen inferior) correspondiente a un embrión cromosómicamente desequilibrado. Embrión derivado de un paciente que portador de una translocación equilibrada 46,XY,t(5;21)(p10;q10). Las flechas negras indican los fragmentos de los cromosomas desequilibrados. El eje Y indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y el eje X el número del cromosoma. El desequilibrio incluye una trisomía parcial del cromosoma 5 (5p15.33 → p11), detectada como un cambio en los puntos específicos hacia la línea verde (ganancia) en las dos muestras.

V.1.4. Validación del NGS para TGP de aneuploidías.

Un total de 50 productos de amplificados correspondientes a 19 ciclos de TGP de aneuploidías, previamente analizados mediante “array”-CGH, se analizaron con el protocolo de secuenciación masiva. En 9 casos, los productos amplificados se correspondían con blastómeros biopsiados en día 3 de cultivo embrionario, y en 10 casos eran células biopsiadas del trofoectodermo (5-10 células por embrión).

Los resultados se compararon con los obtenidos mediante “array”-CGH. (Tabla13).

	Tipo de muestra analizada, N (%) - NGS			Tipo de muestra analizada, N (%) - aCGH		
	BL	TE	Total	BL	TE	Total
Nº de ciclos	9	10	19	9	10	19
Productos WGA	21	29	50	21	29	50
Nº de muestras analizadas	21	29	50	21	29	50
Euploide	6 28,6%	11 37,9%	17 34,0%	6 28,6%	12 41,4%	18 36,0%
Aneuploide	8 38,1%	10 34,5%	18 36,0%	8 38,1%	11 37,9%	19 38,0%
Aneuploide Complejo	7 33,3%	0 0,0%	7 14,0%	7 33,3%	0 0,0%	7 14,0%
Euploide Mosaico	-	7 24,1%	7 14,0%	-	6 20,7%	6 12,0%
Aneuploide Mosaico	-	1 3,4%	1 2,0%	-	0 0,0%	0 0,0%
Nº de cromosomas analizados	504	696	1200	504	696	1200
Euploide	466	670	1136	466	676	1142
Aneuploide	38	26	64	38	20	58
Trisomías	16	5	21 32,8%	16	5	21 36,2%
Monosomías	22	7	29 45,3%	22	7	29 50,0%
Parciales	0	0	0 0,0%	0	0	0 0,0%
Mosaicos	-	14	14 21,9%	*	8	8 13,8%

Tabla 13. Características de las muestras estudiadas. Blastómero (BL). Trofoectodermo (TE)

21 productos de WGA se analizaron en día 3 (blastómero) y 29 se analizaron en día 5-6 de cultivo embrionario (trofoectodermo). Se obtuvo resultado por secuenciación masiva en todas las muestras incluidas en el experimento 50/50 (100%). Algunos ejemplos de resultados de “array”-CGH y NGS, de embriones en día 3 y día 5/día 6, se muestran en la Figura 27 y Figura 28, respectivamente.

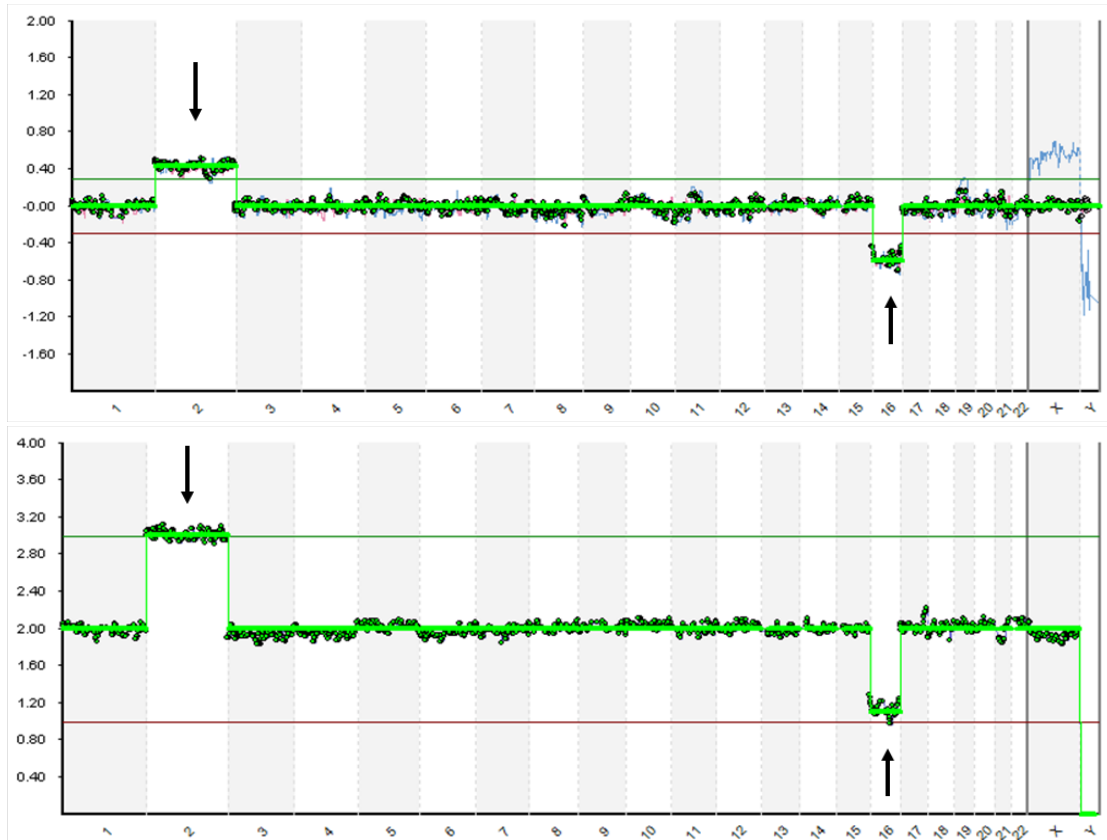


Figura 27. Ejemplo del resultado de una muestra aneuploide analizada mediante “array”-CGH (imagen superior) y NGS (imagen inferior). Embrión biopsiado en día3. Las flechas negras indican las aneuploidías. El eje Y de la imagen del NGS indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y en el “array”-CGH el Log2 ratio. En ambas imágenes en número del cromosoma está representado en el eje X. Las aneuploidías incluyen una trisomía del cromosoma 2, detectada como un cambio en los puntos específicos hacia la línea verde (ganancia), y una monosomía del cromosoma 16, detectada como un cambio en los puntos hacia la línea roja (pérdida).

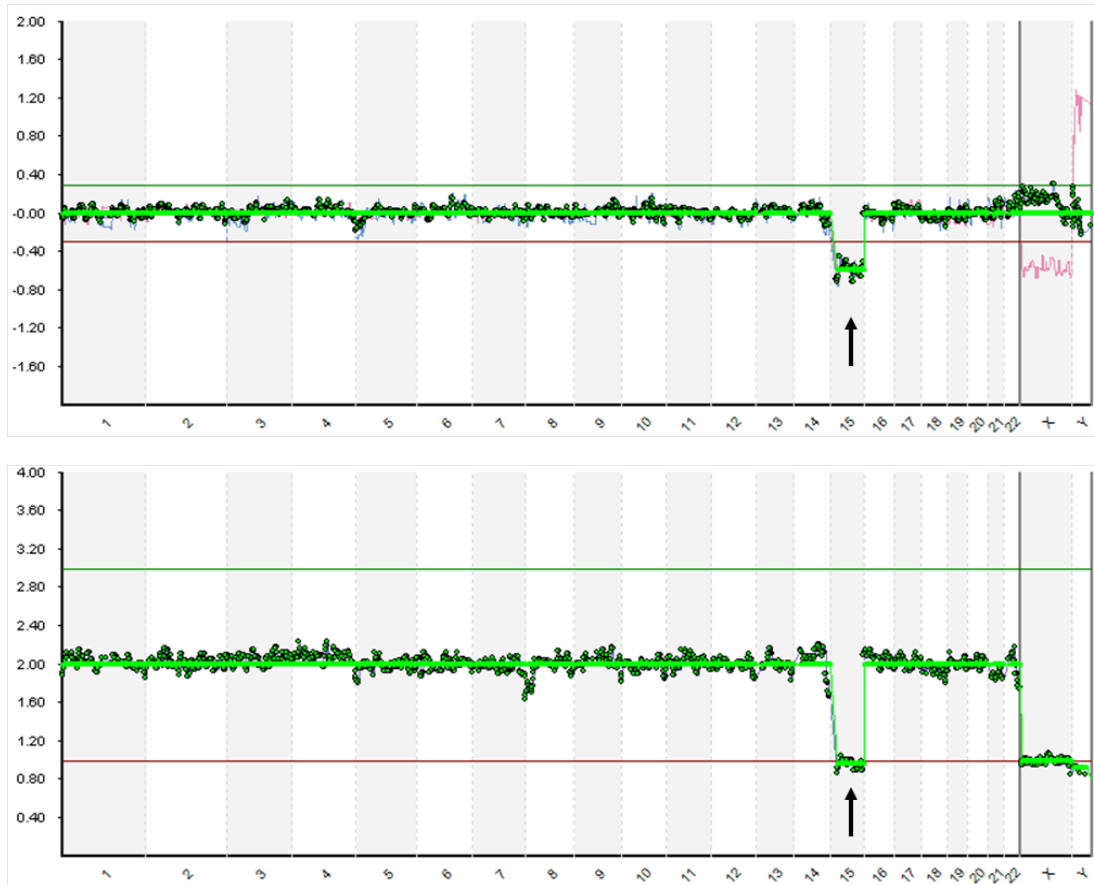


Figura 28. Ejemplo del resultado de una muestra aneuploide analizada mediante “array”-CGH (imagen superior) y NGS (imagen inferior). Embrión biopsiado en día 5. Las flechas negras indican las aneuploidías. El eje Y de la imagen del NGS indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y en el “array”-CGH el Log2 ratio. En ambas imágenes en número del cromosoma está representado en el eje X. La aneuploidía incluye una monosomía del cromosoma 16, detectada como un cambio en los puntos hacia la línea roja (pérdida).

Como queda reflejado en las figuras anteriores, el criterio para la detección y clasificación de las aneuploidías y desequilibrios (duplicaciones o deleciones) para el NGS, se determina por los valores de variación del número de copias (CNV). Las aneuploidías con valores de CNV por debajo de 1.2 o por encima de 2.8, el software de análisis BlueFuse Multi 4.4, las clasifica como aneuploidías puras; los valores de CNV comprendidos entre 1.8 y 2.2 se clasifican como euploides; y valores comprendidos entre 1.2 y 1.8 o entre 2.2 y 2.8 se consideran mosaicos, están por debajo del umbral de detección del software de análisis BlueFuse Multi 4.4, por lo que se hace necesario su asignación manual una vez determinado el porcentaje de mosaicismo (>20% y <80%).

Del total de los ADN amplificados y analizados mediante NGS, se obtuvo un 34% (17/50) de euploides, un 36% (18/50) de aneuploides, un 14% (7/50) de aneuploide complejos, un 14% (7/50) de euploides mosaico y un 2% (1/50) de aneuploides mosaico. En total, de los 1200 cromosomas analizados, 64 mostraban un número de copia aneuploide, incluyendo 21 trisomías (32,8%), 29 monosomías (45,3%) y 14 mosaicos (21,9%). (Tabla13)

En cuanto a la concordancia en el diagnóstico final de embrión APTO/NO APTO obtenido con “array”-CGH y NGS, estos son los resultados obtenidos:

De los 21 embriones analizados en día 3 mediante NGS, el diagnóstico final fue concordante 21/21 (100%). Dentro de este grupo, 6/6 resultaron euploides, 8/8 resultaron aneuploides, y 7/7 resultaron aneuploides complejos.

De los 29 embriones analizados en día 5 mediante NGS, el diagnóstico final fue concordante 28/29 (96%). En este grupo, 11/12 resultaron euploides, 10/11 resultaron aneuploides, 7/6 resultaron euploide mosaico y 1/0 aneuploide mosaico. Un embrión diagnosticado como euploide mediante “array”-CGH pasó a ser euploide mosaico tras su análisis con NGS. Así se dedujo al observar tres cromosomas con monosomías en mosaico que no se detectaron con el “array”-CGH (Figura 29).

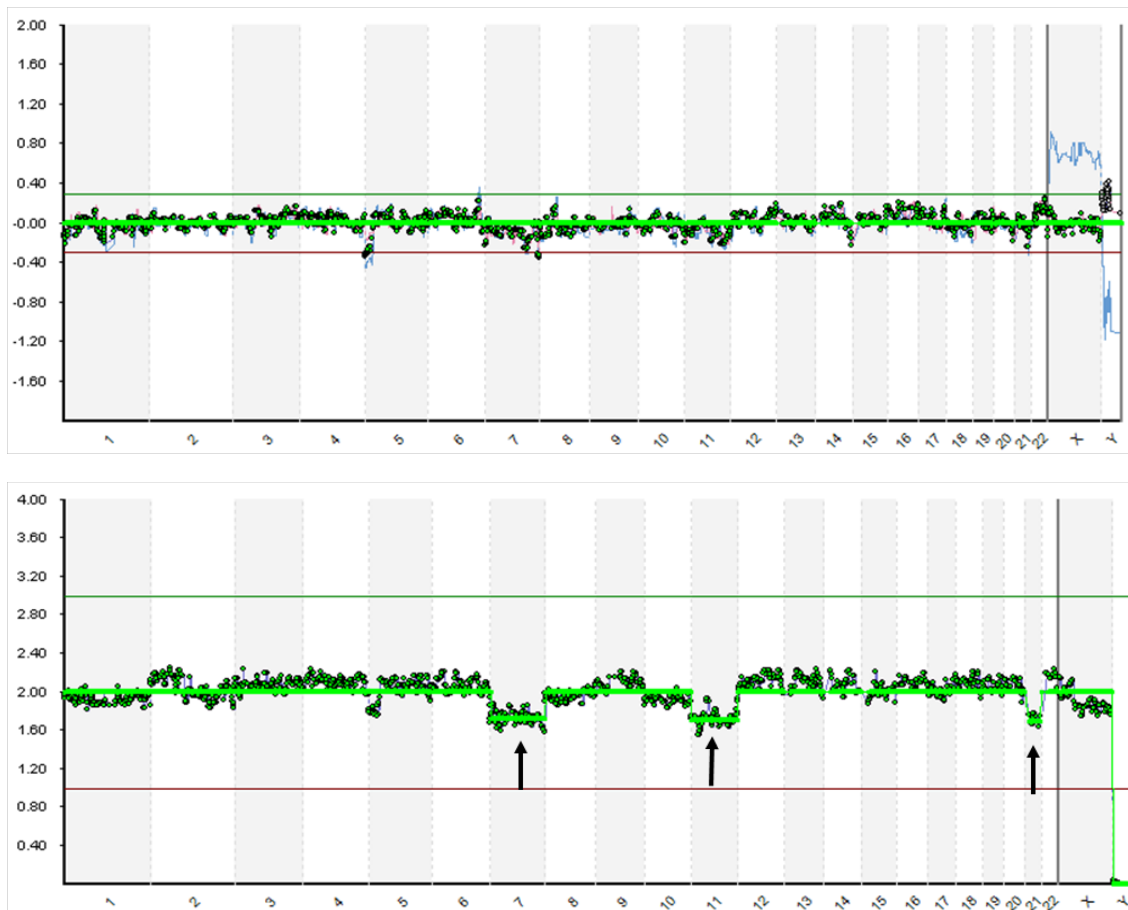


Figura 29. Ejemplo del resultado de una muestra analizada mediante “array”-CGH (imagen superior) y NGS (imagen inferior). Embrión biopsiado en día5. Las flechas negras indican las aneuploidías en mosaico. El eje Y de la imagen del NGS indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y en el “array”-CGH el Log2 ratio. En ambas imágenes en número del cromosoma está representado en el eje X. En el análisis mediante NGS se detectan tres cromosomas en mosaico, monosomía 7 (28%), monosomía 11 (29%) y monosomía 21 (31%) que no se detectaron por el “array”-CGH.

Así, la especificidad del NGS para cromosomas aneuploides fue del 99,47% (CI95% 98,80–99,79%), con una sensibilidad del 100% (CI95% 92,26–99,84%). La especificidad del NGS para embriones aneuploides fue del 99,44% (CI95% 70,62–99,71%), con una sensibilidad del 100% (CI95% 86,66–99,71%). El valor predictivo positivo fue del 96,97% (CI95% 82,49–99,84%) y el valor predictivo negativo fue del 100% (CI95% 77,08–99,46%) para el análisis de “screening” de aneuploidías basado en el protocolo de NGS. En el análisis de los cromosomas sexuales hubo un 100% de concordancia.

V.1.5. Validación del NGS para alteraciones cromosómicas estructurales

Un total de 85 productos de amplificados correspondientes a 33 ciclos de DGP de translocaciones recíprocas, translocaciones Robertsonianas e inversiones previamente caracterizados mediante “array”-CGH, se analizaron a ciegas con el protocolo de secuenciación masiva (Tabla 14).

En 16 casos, los productos correspondían a amplificados de blastómeros biopsiados en día 3 de cultivo embrionario, y 17 casos eran células biopsiadas del trofoectodermo (5-10 células por embrión) (Tabla1).

Los resultados se compararon con el cariotipo convencional y los resultados del “array”-CGH.

29 productos de WGA se analizaron en día 3 (blastómero) y 56 se analizaron en día 5-6 de cultivo embrionario (trofoectodermo). Se obtuvo resultado por secuenciación masiva en todas las muestras incluidas en el experimento 85/85 (100%). Algunos ejemplos de resultados de “array”-CGH y NGS de embriones en día 3 y día 5/día 6 se muestran en la Figura 30 y Figura 31, respectivamente.

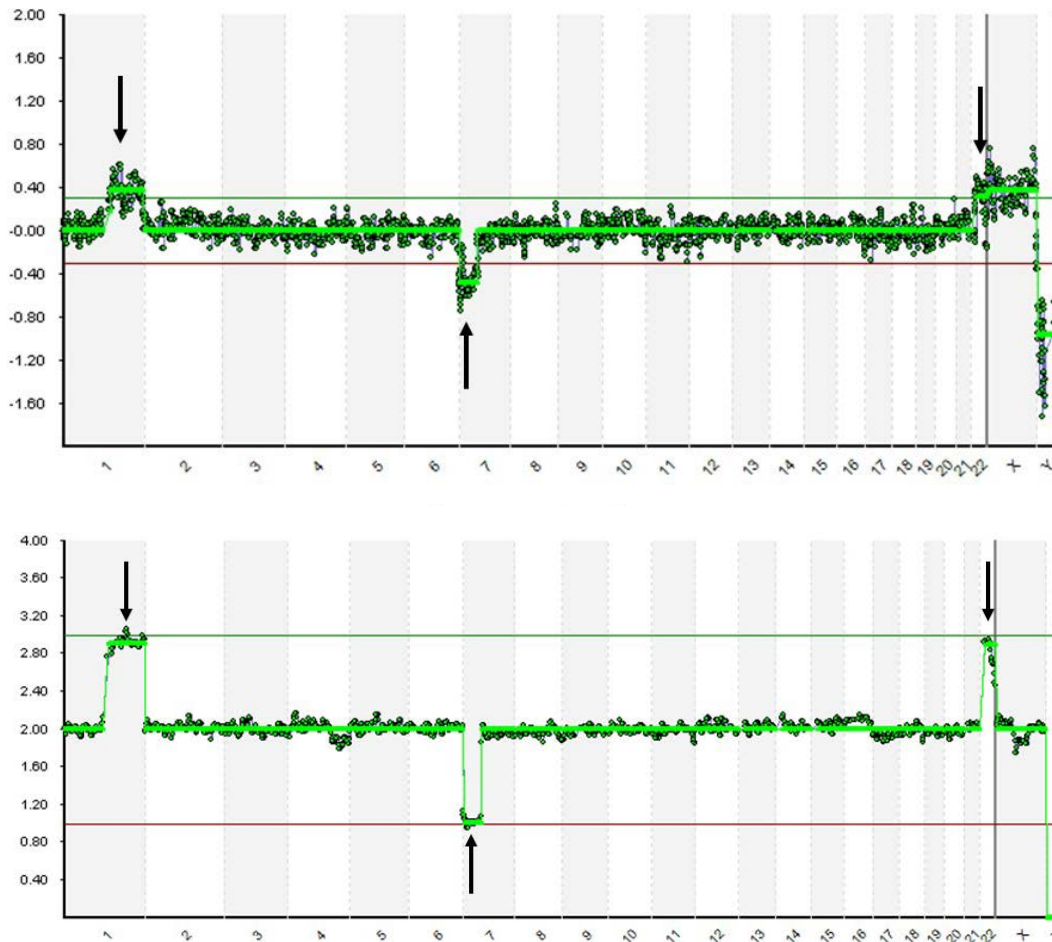


Figura 30. Ejemplo del resultado de una muestra desequilibrada analizada mediante “array”-CGH (imagen superior) y NGS (imagen inferior). Embrión derivado de pacientes con translocación recíproca 46,XX,t(1;7)(q12;p11.2) biopsiado en día 3. Las flechas negras indican aneuploidía y los cromosomas desequilibrados. El eje Y de la imagen del NGS indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y en el “array”-CGH el Log2 ratio. En ambas imágenes en número del cromosoma está representado en el eje X. Los desequilibrios incluyen una trisomía parcial en el cromosoma 1 (1q21.1-q44), detectada como un cambio en los puntos específicos hacia la línea verde (ganancia), y una monosomía parcial del cromosoma 7 (7p22.3-p11.2), detectada como un cambio en los puntos hacia la línea roja (pérdida). Embrión muestra una trisomía 22.

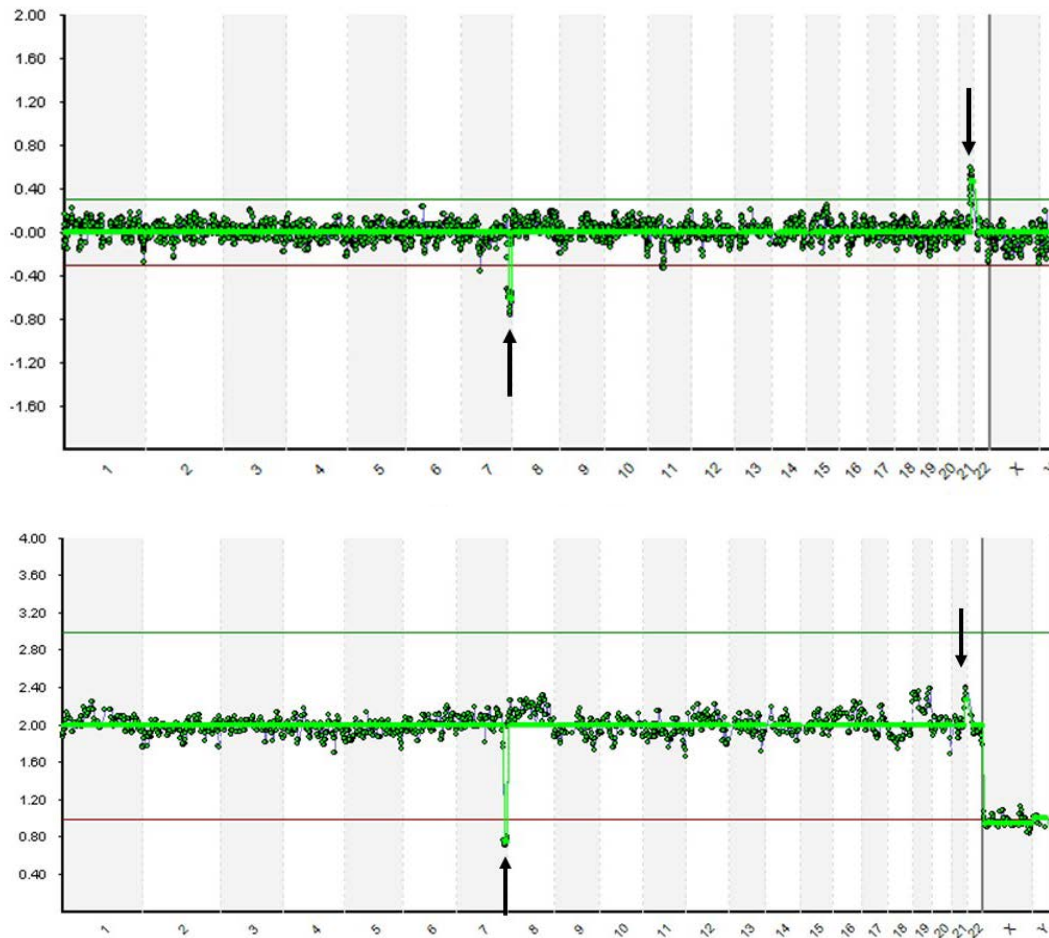


Figura 31. Ejemplo del resultado de una muestra desequilibrada analizada mediante “array”-CGH (imagen superior) y NGS (imagen inferior). Embrión derivado de pacientes con translocación recíproca 46,XX,t(7;21)(q35;q22.2) biopsiado en día 5. Las flechas negras indican cromosomas desequilibrados. El eje Y de la imagen del NGS indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y en el “array”-CGH el Log2 ratio. En ambas imágenes en número del cromosoma está representado en el eje X. Los desequilibrios incluyen una monosomía parcial en el cromosoma 7 (7q36.1-q36.3), detectada como un cambio en los puntos específicos hacia la línea roja (pérdida), y una trisomía parcial del cromosoma 21 (21q22.2-q22.3), detectada como un cambio en los puntos hacia la línea verde (ganancia). El resultado del NGS mostó una CNV de 2.28, lo que indica un fallo en la detección completa de la duplicación del cromosoma 21q22.2 → q22.3 (3 copias).

De los embriones diagnosticados, 29,4% (25/85) eran equilibrados, 31,8% (27/85) eran desequilibrados para la translocación e inversión, 25,9% (22/85) presentaron aneuploidías y eran además desequilibrados, y 12,9% (11/85) eran equilibrados pero eran aneuploides. En total, se observó la translocación en desequilibrio en el 57,6% (49/85) de los embriones analizados; aneuploidías de cromosomas no incluidos en la translocación se observaron en el 38,8% (33/85) de los embriones. Treinta y seis (42,4%) eran embriones equilibrados. En total, se analizaron 2.040 cromosomas, 124 de los cuales tenían un número de copia aneuploides, incluyendo 71 (57,3%) desequilibrados parciales, 13 (10,5%) trisomías y 27 (22,1%) monosomías (Tabla14).

	Tipo de muestra analizada, N (%) - NGS			Tipo de muestra analizada, N (%) - aCGH		
	BL	TE	Total	BL	TE	Total
Nº de ciclos	16	17	33	16	17	33
Productos WGA	29	56	85	29	56	85
Nº de muestras analizadas	29	56	85	29	56	85
Equilibrado + Euploide	3 10,3%	22 39,3%	25 29,4%	3 10,3%	25 44,6%	28 32,9%
Desequilibrado	13 44,8%	14 25,0%	27 31,8%	13 44,8%	16 28,6%	29 34,1%
Desequilibrado + aneuploide	12 41,4%	10 17,9%	22 25,9%	12 41,4%	6 10,7%	18 21,2%
Equilibrado + Aneuploide	1 3,4%	10 17,9%	11 12,9%	1 3,4%	9 16,1%	10 11,8%
Nº de cromosomas analizados	696	1344	2040	696	1344	2040
Euploide	637	1279	1916	637	1288	1925
Aneuploide	59	65	124	59	56	115
Trisomías	2	11	13 10,5%	2	11	13 11,3%
Monosomías	16	11	27 21,8%	16	11	27 23,5%
Desequilibrados	41	30	71 57,3%	41	31	72 62,6%
Mosaicos	-	13	13 10,5%	*	3	3 2,6%

Tabla 14. Características de las muestras estudiadas. Blastómero (BL). Trofoectodermo (TE)

El diagnóstico final de embrión transferible/no transferible obtenido con “array”-CGH y NGS fue concordante (100%) 29/29, en los embriones analizados en día 3. Dentro de este grupo, se obtuvieron los siguientes diagnósticos: equilibrados, 10,3% (3/29); desequilibrados para la translocación, 44,8% (13/29); aneuploides y desequilibrados, 41,4% (12/29); aneuploides y equilibrados, 3,4% (1/29).

De los 56 embriones diagnosticados en día 5, 10 (17,6%) embriones presentaban atípicas ganancias y/ o pérdidas de uno o más cromosomas que estaban por debajo del umbral de detección del “software” de análisis BlueFuse Multi 4.4. Por lo tanto, estos resultados se clasificaron como "mosaico" (Tabla 14). En 3 de los embriones que presentaban cromosomas en mosaico, el cromosoma mosaico fue uno de los cromosomas involucrados en el desequilibrio.

Algunas de las diferencias observadas entre los resultados obtenidos con “array”-CGH y el NGS se observaron en el análisis de las muestras procedentes del trofoectodermo. 25 se diagnosticaron como normales o equilibrados con el “array”-CGH y 22 con el NGS.

Usando los análisis de “array”-CGH y NGS, respectivamente, se detectaron 16 y 14 embriones desequilibrados y 6 y 10 embriones desequilibrados + aneuploides. Las muestras para las que se obtuvieron resultados discordantes correspondían a muestras con cromosomas en mosaico que no se identificaron mediante “array”-CGH. De los 1.344 cromosomas analizados en muestras de trofoectodermo, se detectaron 13 mosaicos mediante NGS y 3 mediante “array”-CGH.

Una única muestra de trofoectodermo, con translocación 46,XX,t(7;21)(q35;q22.2), presentaba una duplicación del cromosoma del cromosoma 21 (21q22.2→q22.3) que se detectó por el “array”-CGH. En el análisis mediante NGS, esta duplicación del cromosoma 21 presentaba valores de CNV de 2.28, no detectándose la duplicación total (3 copias) (Figura 31). El número de lecturas totales y el número de lecturas que pasaron el filtro eran inferiores a los valores de criterios de calidad aceptados. Los parámetros de control usados por el “software” BlueFuse Multi (número total de lecturas, número de lecturas mapeadas, número de lecturas después del filtro, ruido general (DLR)) y la presencia telomérica del punto de rotura podrían explicar el fallo en la detección total de la duplicación. Por el contrario, si se detectó el desequilibrio del cromosoma 7 mediante ambas técnicas.

Se detectaron ganancias o pérdidas por NGS para segmentos cromosómicos mayores a 4Mb. Un ejemplo de cromosoma desequilibrado de 4,1Mb de tamaño se muestra en la Figura 32.

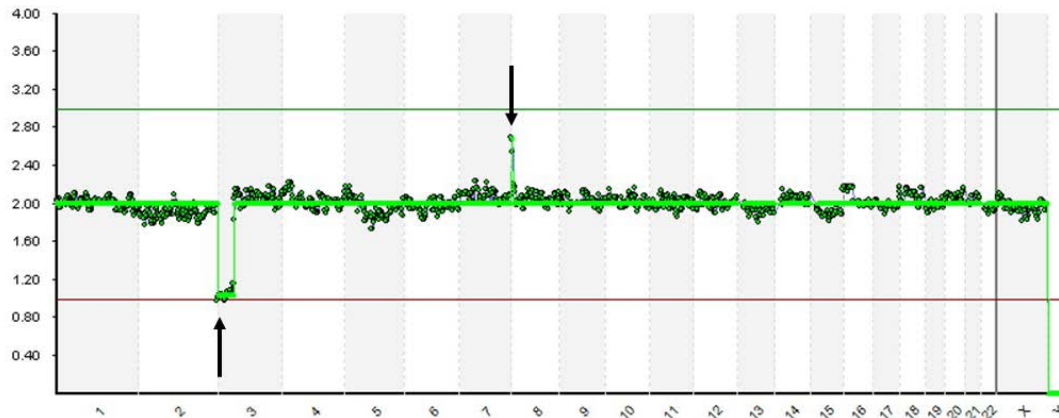


Figura 32. Estimación del límite de detección mediante secuenciación masiva para análisis de cromosomas desequilibrados. Muestra procedente de embrión biopsiado en día 3 de cultivo, procedente de un paciente con cariotipo 46,XX,t(3;8)(p21;p23). Las flechas negras indican los fragmentos de los cromosomas desequilibrados. El eje Y indica el número de copias asignadas (0, 1, 2, 3, o 4) y el eje X el número del cromosoma. Detección de una deleción en el cromosoma 3 (3p26.3-p21.2) y una duplicación de 4,1Mb de tamaño en el cromosoma 8 (8p23.3-p23.2).

Así, la especificidad del NGS para cromosomas desequilibrados/aneuploides fue del 99,53% (CI95% 99,08–99,77%), con una sensibilidad del 100% (CI95% 96,25–99,93%). La especificidad del NGS para embriones equilibrados/aneuploides fue del 89,29% (CI95% 70,63–97,19%), con una sensibilidad del 100% (CI95% 92,50–99,85%). El valor predictivo positivo fue del 95,24% (CI95% 85,83–98,76%) y el valor predictivo negativo fue del 100% (CI95% 83,42–99,63%) para el análisis de alteraciones cromosómicas estructurales basado en el protocolo de NGS. En el análisis de los cromosomas sexuales hubo un 100% de concordancia. (Artículo en revisión, Molecular Human Reproduction, 2018).

V.2. Segunda fase: Análisis de los resultados clínicos obtenidos.

V.2.1. Resultados de los ciclos de TGP-A y TGP-SR realizados mediante NGS tras la validación en el periodo de 2017-2018.

V.2.1.1. Resultados de los ciclos de TGP-A

Se presentan los resultados obtenidos en el TGP para “screening” de aneuploidías entre el período 2017-2018 tras la validación mediante NGS, que incluye a 305 parejas que realizaron 344 de TGP-A. La edad media de las pacientes es de 39 años. Las dos indicaciones mayoritarias que encontramos son la edad materna avanzada con el 56,10% de los ciclos de TGP-A y el factor masculino con el 16,8%.

Se biopsiaron un total de 1542 embriones, 272 correspondientes a blastómeros biopsiados en día 3 de cultivo embrionario, y 1270 embriones a células biopsiadas del trofoectodermo

(5-10 células por embrión). La tasa de amplificación global fue del 97,5% (1504/1542). De los embriones amplificados, 51 presentaban un perfil correspondiente a ADN degradado por lo que no se incluyeron en el análisis mediante NGS.

El número de embriones analizados mediante NGS fue de 1453. De los embriones con diagnóstico, el 31,87% (463/1453) fueron euploides, el 38,47% (559/1453) fueron aneuploides, el 14,45% (210/1453) fueron aneuploides complejo, el 1,03% (15/1453) fueron poliploides, el 9,91% (144/1453) fueron euploide mosaico, el 3,72% (54/1453) fueron aneuploide mosaico y el 0,55% (8/1453) presentaban un perfil de ADN degradado (Figura 33).

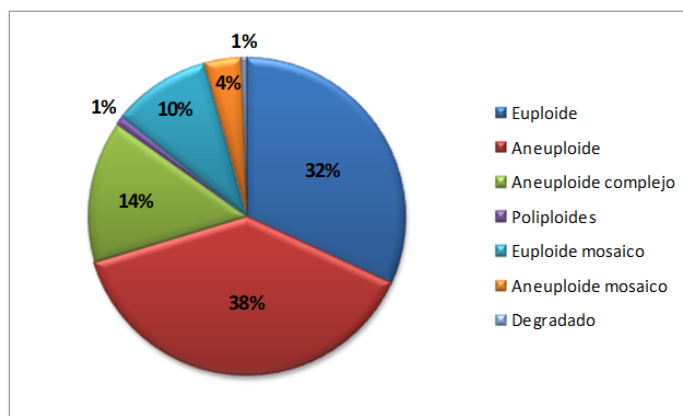


Figura 33. Resultado de embriones analizados mediante NGS tras la validación del TGP-A

Por tanto, el 31,87% de los embriones eran aptos para la transferencia, el 58,22% fueron no aptos y el 9,91% correspondiente a los embriones mosaico se indicó una recomendación.

La transferencia de un embrión clasificado como mosaico, se puede considerar únicamente ante la ausencia de embriones euploides para transferir, siempre previo asesoramiento y aceptación expresa de los pacientes, ya que con los datos actuales se desconoce las implicaciones clínicas que dicha transferencia puede tener. La prioridad de transferencia varía en función del número de cromosomas anormales, el grado de mosaicismo observado y qué cromosomas presentan las aneuploidías (según recomendaciones de las sociedades científicas PGDIS 2016 y COGEN 2017). Se ha descrito que los embriones mosaico tienen menor potencial de implantación, mayor riesgo de aborto y pueden dar lugar a un recién nacido afecto de algún síndrome, pero también pueden dar lugar a embarazos evolutivos y recién nacidos sanos.

De un total de 344 ciclos de TGP-A hubo transferencia en 234 (68%). El número medio de embriones transferibles por ciclo iniciado fue de 1,3.

V.2.1.2. Resultados de los ciclos de TGP-SR

Se presentan los resultados obtenidos en el TGP para las alteraciones cromosómicas estructurales entre el período 2017-2018 tras la validación mediante NGS, que incluye a 47 parejas portadoras de reordenamientos cromosómicos equilibrados diferentes: Translocaciones robertsonianas (8), translocaciones recíprocas (27) en inversiones (12).

De las 47 parejas, 20 reordenamientos eran de origen paterno (3 translocaciones robertsonianas, 12 translocaciones recíprocas y 5 inversiones) y 27 eran de origen materno (5 translocaciones robertsonianas, 15 translocaciones recíprocas y 7 inversiones).

En este período se realizaron un total de 50 TGP-SR: Translocaciones robertsonianas (8), translocaciones recíprocas (30) en inversiones (12).

Se biopsiaron un total de 280 embriones, 71 correspondientes a blastómeros biopsiados en día 3 de cultivo embrionario, y 209 embriones a células biopsiadas del trofoectodermo (5-10 células por embrión). La tasa de amplificación global fue del 95,7%. De los embriones amplificados, 7 presentaban un perfil correspondiente a ADN degradado por lo que no se incluyeron en el análisis mediante NGS

El número de embriones analizados mediante NGS fue de 261. De los embriones con diagnóstico, el 26,8% (70/261) fueron euploides/equilibrados y Aptos para la transferencia (Transferibles), y el 73,2% (191/261) fueron no aptos.

El porcentaje de embriones euploides/equilibrados según el tipo de reordenamiento fue del 18,7% (32/171) para las translocaciones recíprocas, 40% (14/35) para las translocaciones robertsonianas y del 43,6% (24/55) para las inversiones.

En cuanto al origen del reordenamiento, el porcentaje de embriones euploides/equilibrados para los de origen paterno fue del 28,7% (27/94) y del 25,7% (43/167) para los de origen materno.

De un total de 50 ciclos de TGP-SR hubo transferencia en 21 (42%). El número medio de embriones transferibles por ciclo iniciado fue de 0,86. El porcentaje de ciclos con transferencia relacionando el tipo de reordenamiento fue: Translocaciones robertsonianas 12,5% (1/8), translocaciones recíprocas 60% (18/30) y en las inversiones 16,5 (2/12).

V.2.2. Resultados los ciclos del Test Genético Preimplantacional en parejas portadoras de alteraciones cromosómicas estructurales y parejas portadoras de enfermedades monogénicas.

Se presentan los resultados de los ciclos de TGP-SR obtenidos entre el período 2011-2017.

En el estudio de las enfermedades monogénicas, se presenta la estandarización de un protocolo de PCR único, que permite el estudio de cualquier enfermedad monogénica;

Los resultados globales de los ciclos de TGP-M obtenidos en el periodo 2008-2018; Los resultados obtenidos en los ciclos de COMB-TGP.

Por último se presentan los resultados de: Exactitud diagnóstica, tasa de Fallo de Amplificación y tasa de Allele Drop-Out (ADO) obtenidos en las 13 enfermedades más frecuentemente analizadas para el TGP-M en nuestro laboratorio. La interpretación de estos resultados constituirá la base para la realización del TGP-M mediante NGS.

V.2.2.1. Análisis de los resultados obtenidos mediante “array”-CGH en pacientes portadores de alteraciones cromosómicas estructurales en equilibrio en el período 2011-2017

Se presentan los resultados obtenidos en el TGP para las alteraciones cromosómicas estructurales entre el período 2011-2017, que incluye a 116 parejas portadoras de reordenamientos cromosómicos equilibrados diferentes: translocaciones robertsonianas (27), translocaciones recíprocas (66) e inversiones (26). En este período se realizaron un total de 138 TGP-SR y se analizaron 872 embriones, biopsiados en día 3 (781) y día 5/6 (91) de cultivo embrionario.

De las 116 parejas, 65 reordenamientos eran de origen paterno (19 translocaciones robertsonianas, 33 translocaciones recíprocas y 13 inversiones) y 51 eran de origen materno (8 translocaciones robertsonianas, 33 translocaciones recíprocas y 10 inversiones). El número de ciclos de TGP-SR fue de 138 y su distribución según el tipo de reordenamiento y origen se muestran en la Figura 34

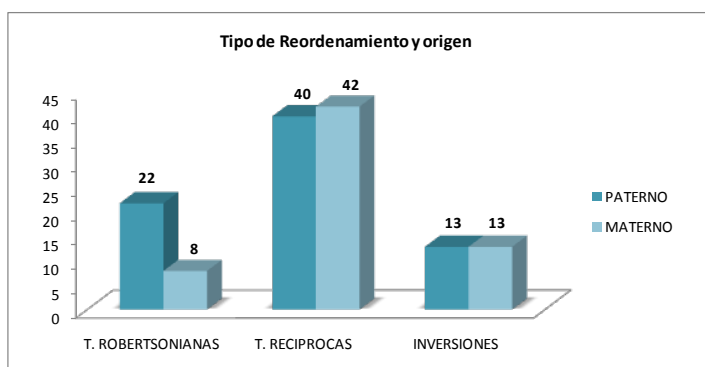


Figura 34. Número de ciclos realizados por indicación y según el origen del reordenamiento.

Se biopsiaron un total de 872 embriones, 781 correspondientes a blastómeros biopsiados en día 3 de cultivo embrionario, y 91 embriones a células biopsiadas del trofoectodermo (5-10 células por embrión). El número de embriones analizados mediante “array”-CGH fue de 804, por lo que la tasa de amplificación fue del 92.2%.

De los embriones con diagnóstico, el 20% (159/804) eran euploides/equilibrados y Aptos para la transferencia (Transferibles), y el 80% (645/804) eran no aptos (Figura 35 y 36).

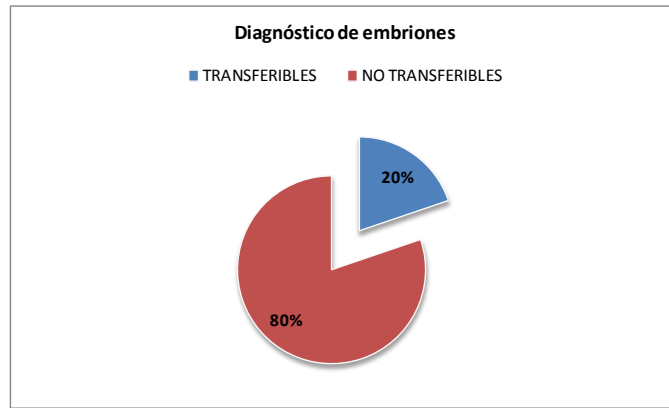


Figura 35. Porcentaje total de embriones transferibles y no transferibles para el estudio de las alteraciones cromosómicas estructurales.

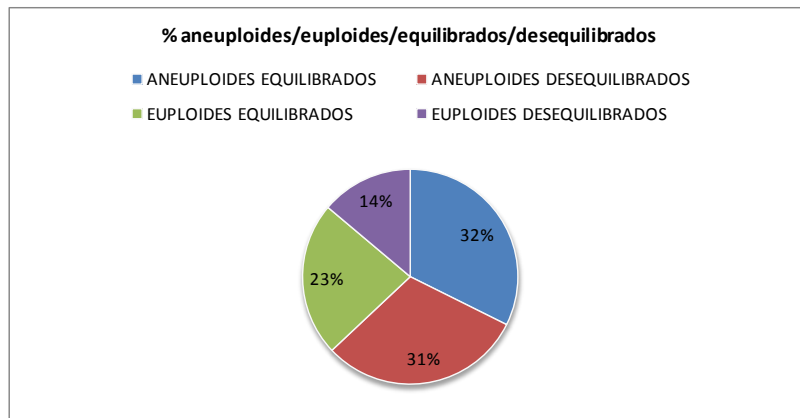


Figura 36. Porcentaje de embriones aneuploides/euploides/equilibrados/desequilibrados para el estudio de las alteraciones cromosómicas estructurales.

El porcentaje de embriones euploides/equilibrados según el tipo de reordenamiento fue del 10,79% (52/482) para las translocaciones recíprocas, 30,18% (51/169) para las translocaciones robertsonianas y del 36,60% (56/153) para las inversiones (Figura 37 y 38).

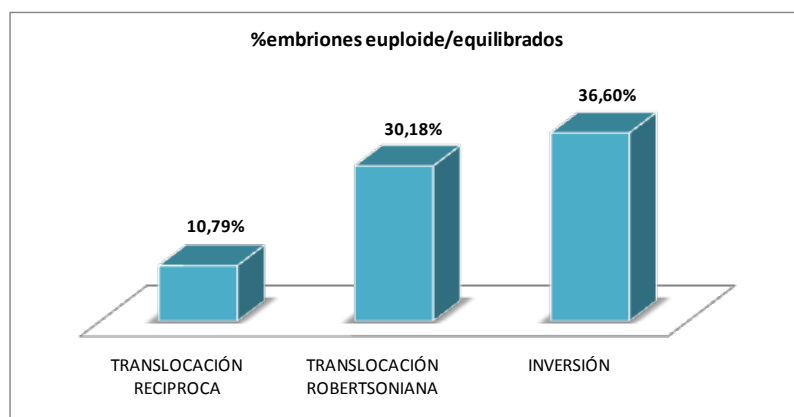


Figura 37. Porcentaje de embriones euploides/equilibrados y transferibles obtenidos en función del tipo de alteración cromosómica estructural.

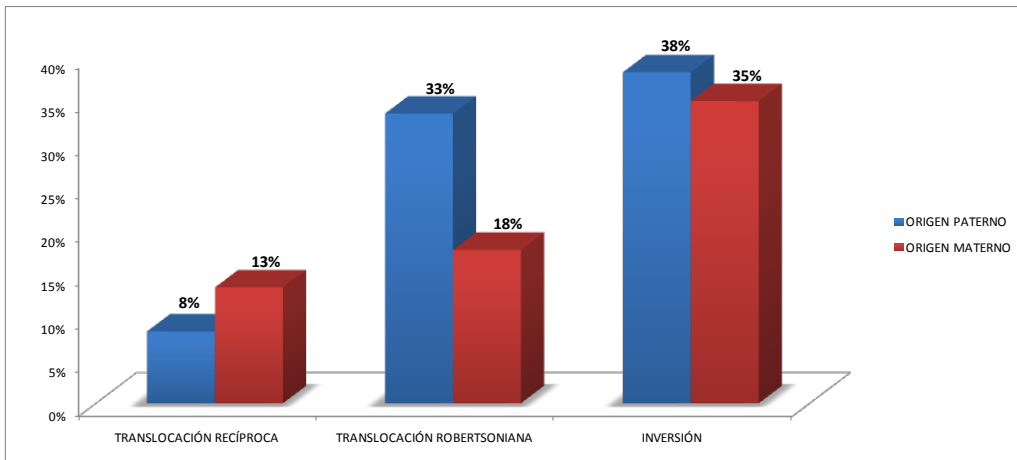


Figura 38. Porcentaje de embriones euploides/equilibrados y transferibles obtenidos en función del tipo de alteración cromosómica estructural y de su origen.

De un total de 138 ciclos de TGP-SR hubo transferencia en 80 (57.97%). El porcentaje de ciclos con transferencia para cada una de las indicaciones, con al menos un embrión para transferir, fue de 40% (33/82) para las translocaciones recíprocas, 77% (23/30) para las translocaciones robertsonianas y 92% (24/26) para las inversiones.

El porcentaje de ciclos con transferencia relacionando el tipo de reordenamiento y el origen se muestra en la figura 39.

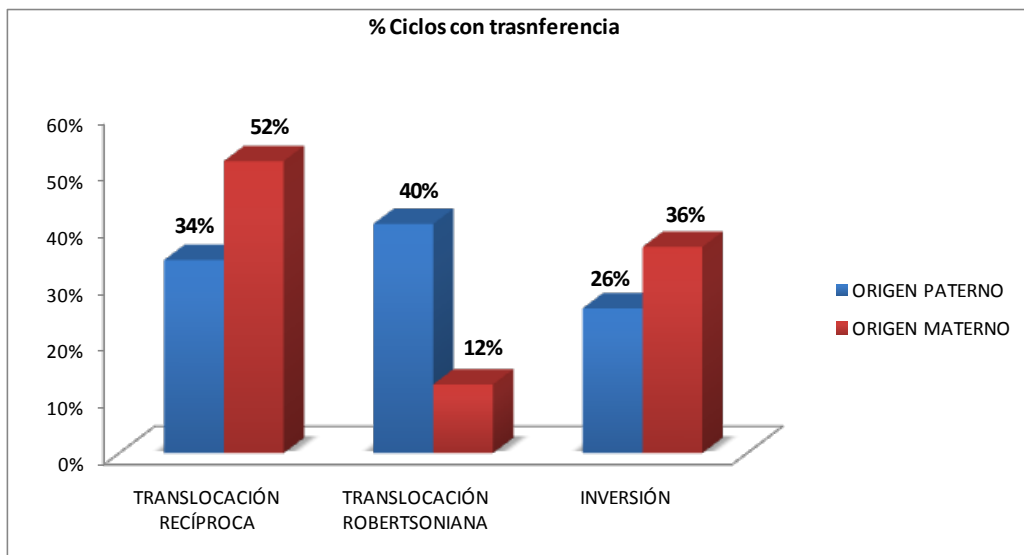


Figura 39. Porcentaje de ciclos con transferencia obtenidos en función del tipo de alteración cromosómica estructural y de su origen.

V.2.2.2. Estandarización de enfermedades monogénicas mediante PCR clásica.

Se analizaron 315 células correspondientes a 214 embriones biopsiados, con un promedio de 6 embriones biopsiados por ciclo. Se obtuvo diagnóstico en el 94,8% de los embriones, lo que supone un fallo de amplificación global de un 6,45% (Tabla 15).

Número de Ciclos	37
Número de embriones biopsiados	214
Número de células analizadas	315
Número de embriones diagnosticados	203(94,8%)
Número de embriones sanos	69
Número de embriones afectados	74
Número de embriones con riesgo	30
Número de embriones portadores sanos	18
Número de embriones recombinantes	12(5,9%)
Número de embriones transferidos	60
Número de transferencias	33
Media de embriones transferidos	1,8
Número de embarazos	10
Tasa de embarazo por transferencia	30,3%

Tabla 15. Resultados globales de los ciclos de TGP-M realizados durante la estandarización.

En número total de marcadores utilizados en el estudio fue de 85 en un total de 1.348 reacciones. La eficacia global de los marcadores utilizados fue del 93,53%. Si separamos entre marcadores STRs (78) y marcadores utilizados en minisequenciación (7), la eficacia encontrada en cada uno de ellos es del 93,20% y del 97,7% respectivamente. Por otro lado con lo respecta al ADO, el porcentaje de ADO global obtenido es de 19,11% siendo el porcentaje de ADO encontrado para los STRs del 20,46% y para la minisequenciación del 4,07% (Tabla 16).

Nº de Marcadores	Eficacia del proceso	%
85	Eficacia Global	93,53
78	Eficacia STRs	93,20
7	Eficacia Minisequenciación	97,27

Nº de Marcadores	ADO	%
85	Global	19,11%
78	STRs	20,46
7	Minisequenciación	4,07

Tabla 16. Resultados de eficiencia del proceso y tasa de ADO obtenidos para los marcadores STRs y mutaciones.

Se ha llevado a cabo la transferencia embrionaria en 33 de los 37 ciclos diagnosticados (89,2%) con una media de embrión transferido del 1,8. Se obtuvo una tasa de embarazo por transferencia del 30,3%. Los 4 ciclos sin transferencia, en 2 de ellos todos sus embriones se diagnosticaron como afectados y los otros dos no tuvieron evolución embrionaria. (Esther Fernández García, 2011. Revista ASEBIR; VI Congreso Girona 2011, Vol. 16 Nº2, 2011)

V.2.2.3. Análisis de los resultados obtenidos en el estudio de enfermedades monogénicas en el período 2008-2018

Análisis de los datos para enfermedades monogénicas entre el período 2008-2018. Se presentan 366 ciclos de TGP-M realizados en 236 parejas portadoras de 93 enfermedades monogénicas que se detallan en la tabla 17:

Enfermedad monogénica	Número de TGP-M
Adrenoleucodistrofia ligada a X (ABCD1)	1
Albinismo Oculocutáneo tipo 1 (OCA1)	1
Alfa talasemia (HBA2)	1
Anemia Falciforme (HBB)	1
Angioedema Hereditario (SERPING1)	1
Ataxia Cerebelosa Tipo 1 (ATXN1)	1
Ataxia Cerebelosa Tipo 2 (ATXN2)	2
Ataxia Cerebelosa Tipo 8 (ATXN8)	1
Ataxia con apraxia oculomotora	1
Ataxia Telangiectasia + Hipoacusia	2
Atelosteogenesis Tipo II (SLC26A2)	1
Atrofia Muscular Espinal (SMN1)	4
Cadasil (NOTCH3)	9
Cáncer gástrico Familiar (CDH1)	1
Cavernomatosis (KRIT1)	2
Charcot Marie-tooth (CMTX1)	1
Charcot Marie-tooth (GJB1)	1
Charcot Marie-tooth (MPZ)	1
Charcot Marie-Tooth (PMP22)	10
Compatibilidad HLA	1
Deficiencia de Adenilosuccinato Liasa tipo I (ADSL)	1
Deficiencia de carbamoil fosfato sintetasa (CPS1)	1
Deficiencia de Fosforilasa Hepática (PHKA2)	1
Déficit congénito de glicosilación proteica 1-A (PMM2)	1
Déficit de alfa 1 anti-tripsina (SERPINA1)	2
Déficit de ornitín transcarbamilasa (OTC)	2
Diabetes Neonatal (IER3IP1)	1
Displasia Arritmogénica del Ventrículo Derecho (PKP2)	1
Displasia Ectodérmica Hipohidrótica (ED1)	3
Distrofia Facioescapulo Humeral (D4Z4)	9

Distrofia Miotónica de Steinert (DMPK)	42
Distrofia Muscular de Becker (DMB)	1
Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	9
Encefalopatía epiléptica infantil temprana (SLC25A22)	1
Enfermedad de Fabry (GLA)	1
Enfermedad de Huntington (HTT)	46
Enfermedad de Norrie (NDP)	1
Enfermedad Granulomatosa Crónica (CYBB)	1
Enfermedad Hemolítica del recién nacido (Rh)	1
Epidermólisis Bullosa (COL7A1)	2
Esclerosis Lateral Amiotrófica (c9ORF72)	3
Esclerosis Tuberosa Tipo II (TSC2)	2
Exostosis Múltiple Hereditaria Tipo 2 (EXT2)	3
Fenilcetonuria (PAH)	1
Fibrosis Quística (CFTR)	14
Hemofilia A (F8)	10
Hiperglicinemia no cetósica (AMT)	2
Hiperglicinemia no cetósica (GLDC)	2
Hiperplasia Adrenal Congénita (CYP21A2)	5
Hipofosfatasa (ALPL)	1
Lipodistrofia Congénita de Berardinelli (BSCL2)	1
Miocardopatía Hipertrófica (CMH4)	1
Miocardopatía Hipertrófica (MYBPC3)	2
Miopatía Distal de Laing (MYH7)	3
Miopatía Miotubular Ligado a X (MTM1)	2
Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1 (MEN1)	10
Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2A (RET)	5
Neurofibromatosis Tipo I (NF1)	16
Osteogénesis Imperfecta (COL1A1)	3
Osteogénesis imperfecta (COL1A2)	3
Pancreatitis Crónica Hereditaria (PRSS1)	3
Paraparesia Espástica Hereditaria (SPG4)	2
Paraparesia Espástica Hereditaria (SPG4)/ADA	1
Poliposis Adenomatosa Familiar (APC)	11
Poliquistosis Renal Autosómica Dominante Tipo 1 (PKD1)	17
Poliquistosis Renal Autosómica Recesiva (PKHD1)	1
Porfiria aguda intermitente (HMBS)	1
Retinoblastoma (RB1)	2
Retinosis Pigmentaria (RHO)	6
Retinosis Pigmentaria (RPGR)	1
Retinosquiasis ligada a X (RS1)	2
Retraso mental ligado a X	1
Síndrome ARC (VPS33B)	1
Síndrome ATRX (ATRX)	5
Síndrome de Alport (COL4A5)	1
Síndrome de Andersen (KCNJ2)	1

Síndrome De Andrade (TTR)	4
Síndrome de Birt-Hogg Dubé (FLCN)	2
Síndrome de Ehler Danlos tipo IV (COL3A1)	1
Síndrome de Holt-Oram (TBX5)	1
Síndrome de Leight (COX15)	2
Síndrome de Lynch (MLH1)	1
Síndrome de Lynch (MSH2)	1
Síndrome de Marfan (FBN1)	7
Síndrome de Menkes (ATP7A)	2
Síndrome de polidactilia y costillas cortas tipo 3 (DYNC2H1)	1
Síndrome de Shwachman Diamond (SBDS)	1
Síndrome Nefrótico Tipo 5 (LAMB2)	1
Síndrome QT-largo (KCNH2)	1
Síndrome de Lesch-Nyhan (HPRT)	1
Von Hippel Lindau (VHL)	7
X-Frágil (FMR1)	18

Tabla 17. Enfermedad analizada y número de ciclos de TGP-M realizados

Número de Ciclos	366
Número de embriones biopsiados	2.221
Número de embriones amplificados	2.022(91,04%)
Número de embriones con diagnóstico	1.820(90,00%)
Número de embriones sanos	738
Número de embriones afectados o riesgo	915
Número de embriones con riesgo	30
Número de embriones portadores sanos	167
Número de embriones transferibles	905
Media de embriones transferibles	2,47

Tabla 18. Resultados globales de los ciclos de TGP-M realizados en el periodo 2008-2018

En este período de tiempo se analizaron un total de 2.221 embriones, 2.012 corresponden a embriones biopsiados en día 3 de cultivo embrionario y 209 embriones en estadio de blastocisto (trofoectodermo), 25 de los cuales eran rebiopsias (Tabla 18 y 19). La media de embriones analizados por ciclo fue de 6. De los 2.022 embriones amplificados (91,04%) (Figura 40), se obtuvo diagnóstico en el 90,01% (1.820/2.022). El 9,99% restante (202/2.022) representa a los embriones con un diagnóstico no concluyente debido a la presencia de recombinación genética, monosomías, contaminación materna y haplotipos con tasas de ADO por encima del 50%.

	Número	Amplificados	Tasa de amplificación
Embriones Biopsiados D+3	2.012	1.828	90,85 %
Embriones Biopsiados D+5	184	170	92,39 %
Embriones Rebiopsiados	25	24	96 %
Total	2.221	2.022	91,04%

Tabla 19. Tasa de amplificación correspondiente a los embriones biopsiados en los ciclos de TGP-M en el periodo 2008-2018.

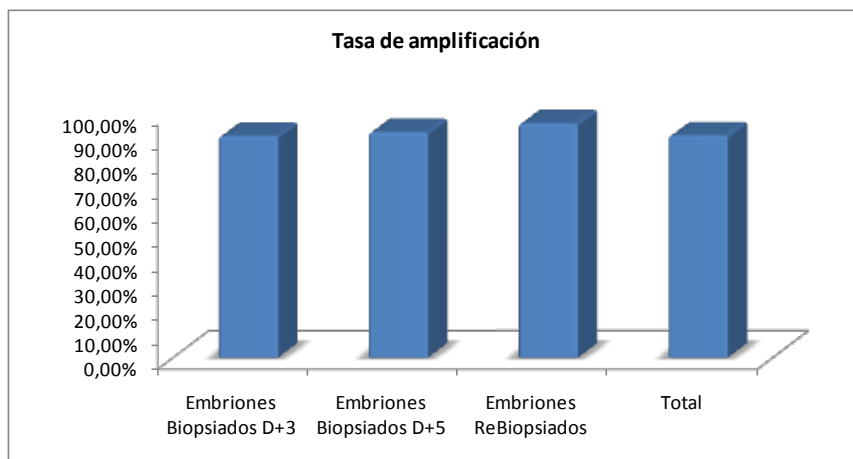


Figura 40. Tasa de amplificación obtenida en cada uno de los estadios de biopsia y tasa global de amplificación.

Del total de embriones con diagnóstico (1.820), 738 (40,55%) embriones eran sanos, 167 (9,18%) portadores-sanos y 915 (50,27%) eran afectados (Figura 41).

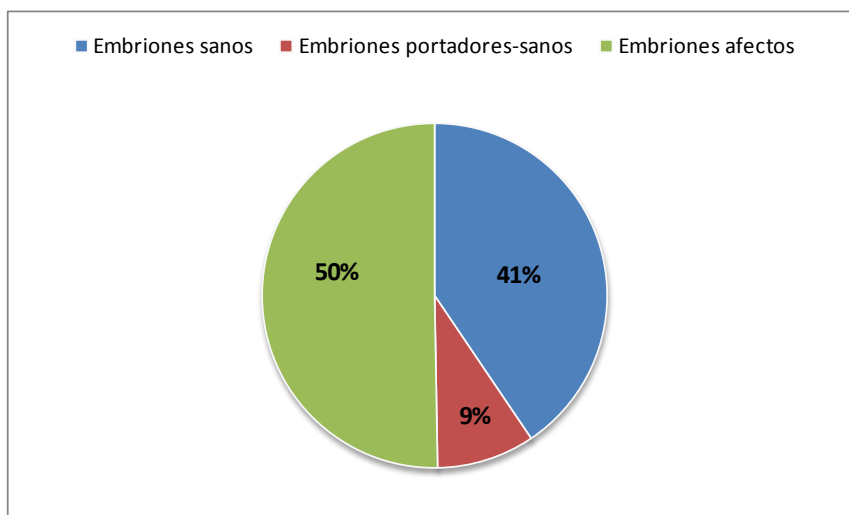


Figura 41. Porcentaje de embriones sanos, portadores sanos y afectados obtenidos en el total de las enfermedades monogénicas analizadas.

Con este resultado, el número de embriones transferibles fue de 905 (49,73%) para el total de las enfermedades monogénicas, lo que permitió que el 88% (323/366) de los ciclos de TGP-M iniciados tuvieran transferencia embrionaria (Figura 42).

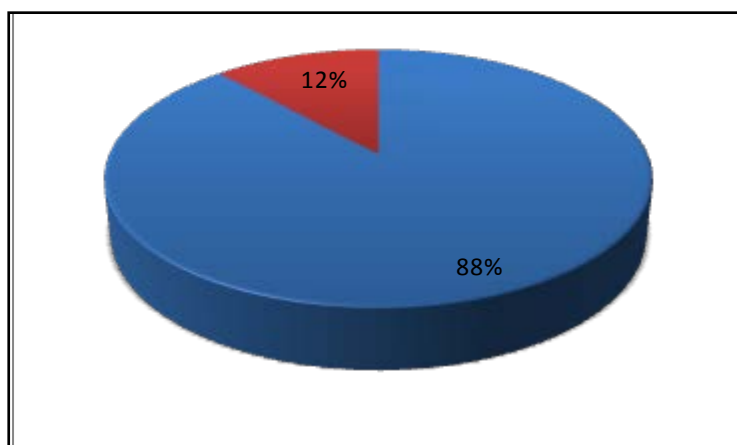


Figura 42. Porcentaje de ciclos con transferencia (88%) obtenidos en el total de las enfermedades monogénicas analizadas.

V.2.2.4. COMB-TGP

En 40 ciclos de TGP-M los pacientes tenían una doble indicación, 5 corresponden a portadores de alteraciones cromosómicas estructurales (46,XX,inv(9)(p11q13)) y 35 a indicaciones para “screening” de aneuploidías. En consecuencia, se lleva a cabo un doble TGP, monogénico y cromosómico partiendo del mismo material amplificado. Se analizaron un total de 263 embriones biopsiados en día 3 (182) y día 5 (81), con un promedio de 6 embriones biopsiados por ciclo. La tasa de amplificación fue del 95,4% (251/263) y el porcentaje de embriones con diagnóstico para el estudio de la enfermedad monogénica fue del 94% (236/251). (Tabla20)

	Número	Amplificados	Tasa de amplificación
Embriones Biopsiados D+3	182	170	93,4%
Embriones Biopsiados D+5	81	81	100,0 %
Total	263	251	95,4%

Tabla 20. Tasa de amplificación correspondiente a los embriones biopsiados en los ciclos de COMB-TGP en el periodo 2008-2018.

Para la enfermedad monogénica, el número de embriones sanos fue 79 (31,5%), 21 (8,4%) portadores-sanos y 136 (54,2%) eran afectados. Del total de embriones analizados, en 156 se realizó el análisis de los 24 cromosomas. 136 de ellos corresponden a screening de aneuploidías, de los cuales 46 eran euploides (33,8%), 4 euploide-mosaico (2,9%), 68 aneuploides (50%), 18 aneuploide complejo (13,2%). 20 embriones corresponden a alteraciones cromosómicas estructurales, 12 euploides/equilibrados (60%), 1 desequilibrado (5%), 3 aneuploide/equilibrado (15%) y 4 aneuploide complejo (20%).

El número total de embriones transferibles fue de 42, con una media de embriones transferibles por ciclo de 1. Esto permitió que el 57,5% (23/40) de los ciclos de COMB-TGP iniciados tuvieran transferencia embrionaria.

V.2.2.5. TGP en enfermedades monogénicas más frecuentes: Eficiencia de amplificación, tasa de Fallo de amplificación y tasa de Allele Drop-Out (ADO).

Dentro del período 2008-2018, se seleccionaron 13 enfermedades monogénicas, 10 de ellas seleccionadas por el número de ciclos realizados (5-46 ciclos) y 3 por su cercanía al locus, con el objetivo de diseñar un panel de SNPs que permita el análisis conjunto de todas ellas mediante NGS: Adrenoleucodistrofia (ABCD1), Distrofia Miotónica de Steinert (DMPK), Distrofia muscular de Duchenne (DMD), Enfermedad de Huntington (HTT), Esclerosis Tuberosa Tipo 2 (TSC2), Fibrosis Quística (CFTR), Hemofilia A (F8), Miopatía Miotubular (MTM1), Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2 (RET), Neurofibromatosis Tipo 1 (NF1), Poliposis Adenomatosa Familiar (APC), Poliquistosis renal AD (PKD1), X-Frágil (FMR1). (Tabla 21)

Enfermedad monogénica	Número de TGP-M
Adreno leucodistrofia ligada a X (ABCD1)	1
Distrofia Miotónica de Steinert (DMPK)	42
Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	9
Enfermedad de Huntington (HTT)	46
Esclerosis Tuberosa Tipo 2 (TSC2)	2
Fibrosis Quística (CFTR)	14
Hemofilia A (F8)	10
Miopatía Miotubular (MTM1)	2
Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2 (RET)	5
Neurofibromatosis Tipo 1 (NF1)	16
Poliposis Adenomatosa Familiar (APC)	11
Poliquistosis renal AD (PKD1)	17
X-Frágil (FMR1)	18

Tabla 21. Listado de enfermedades más frecuentes y número de ciclos de TGP-M.

Se define como Eficiencia de amplificación a la proporción de reacciones en la que uno o más alelos se amplifica correctamente.

Se define como Tasa de Fallo de amplificación a la proporción de reacciones en las que no se detecta amplificación de material genético.

Se define como Tasas de Allele Drop-Out (ADO) al número de reacciones en las que solo amplifica un alelo dividido por el total de reacciones en las que al menos amplifica un alelo.

De un total de 193 ciclos de TGP-M, se analizaron 766 embriones biopsiados en día 3 y día 5, con un promedio de 7 embriones biopsiados por ciclo. Se obtuvo diagnóstico en el 92% de los embriones, lo que supone una tasa de fallo de amplificación global de un 8%.

En número total de marcadores STRs utilizados fue de 103 en un total de 3.656 reacciones. La tasa de eficiencia de amplificación de los marcadores utilizados fue del 96,11%. En el estudio de las mutaciones se realizaron 274 reacciones mediante análisis de fragmentos y 72 reacciones mediante minisequenciación, con una tasa de eficiencia de amplificación del 98,78%; siendo del 98,57% para SNaPshot y 98,94% para las mutaciones mediante análisis de fragmentos.

La tasa de ADO global obtenida para los marcadores STRs fue del 17,53% y para las mutaciones del 18,16%. Se relacionó la tasa de ADO en función del tamaño del fragmento amplificado (Figura 43). El resultado de la relación entre la tasa de ADO y el tamaño del fragmento de ADN amplificado fue positivo, de forma que los fragmentos de mayor tamaño presentan una mayor tasa ADO. Esta misma relación positiva se observó relacionando el contenido medio de guaninas-citosinas de los cebadores con la tasa de ADO (Figura 44): a mayor contenido de G-C, mayor tasa de ADO.

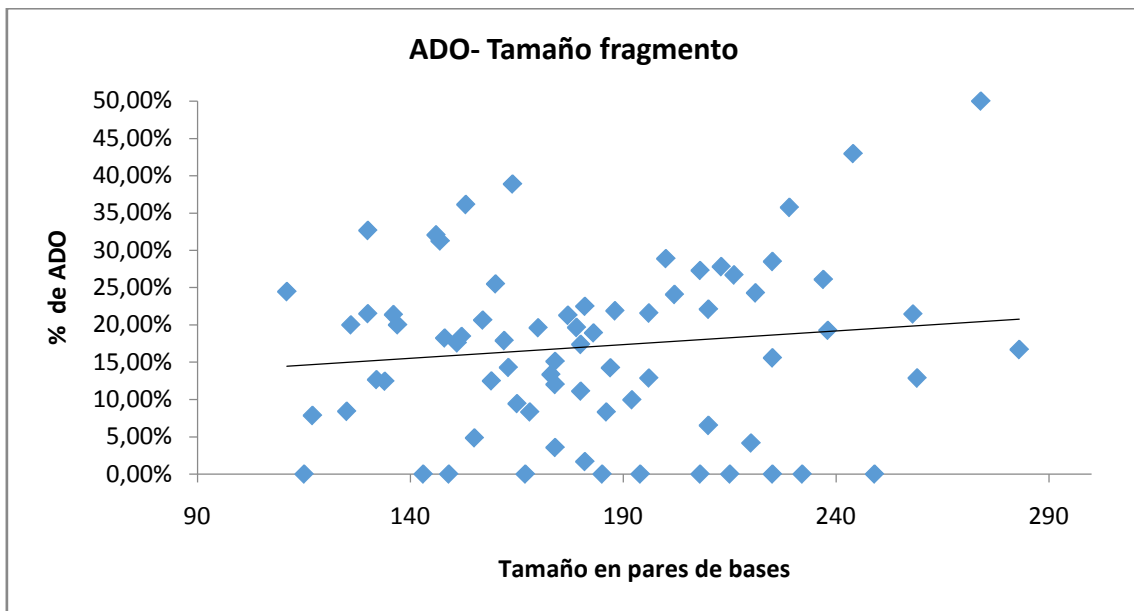


Figura 43. Relación positiva entre la tasa de ADO y el fragmento de ADN amplificado

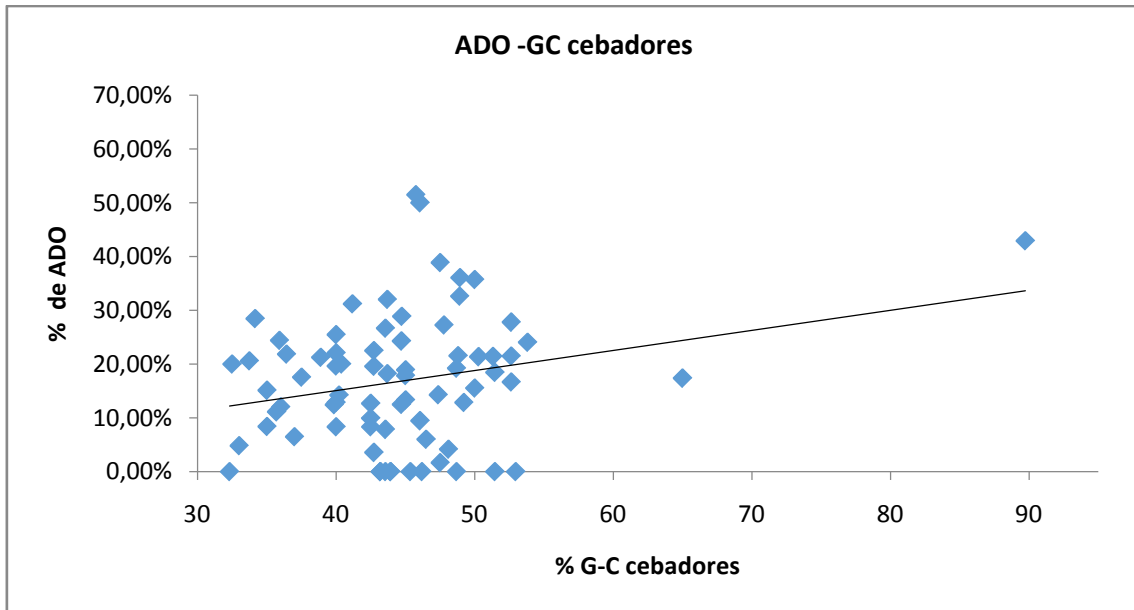


Figura 44. Relación positiva entre la tasa de ADO y el contenido de G-C de los cebadores.

Por otro lado, se relacionó el contenido medio de guaninas-citosinas del fragmento amplificado con la tasa de ADO. En este caso el resultado de la relación de las variables fue negativo. A mayor porcentaje de guaninas y citosinas en el fragmento amplificado menor tasa de ADO (Figura 45)

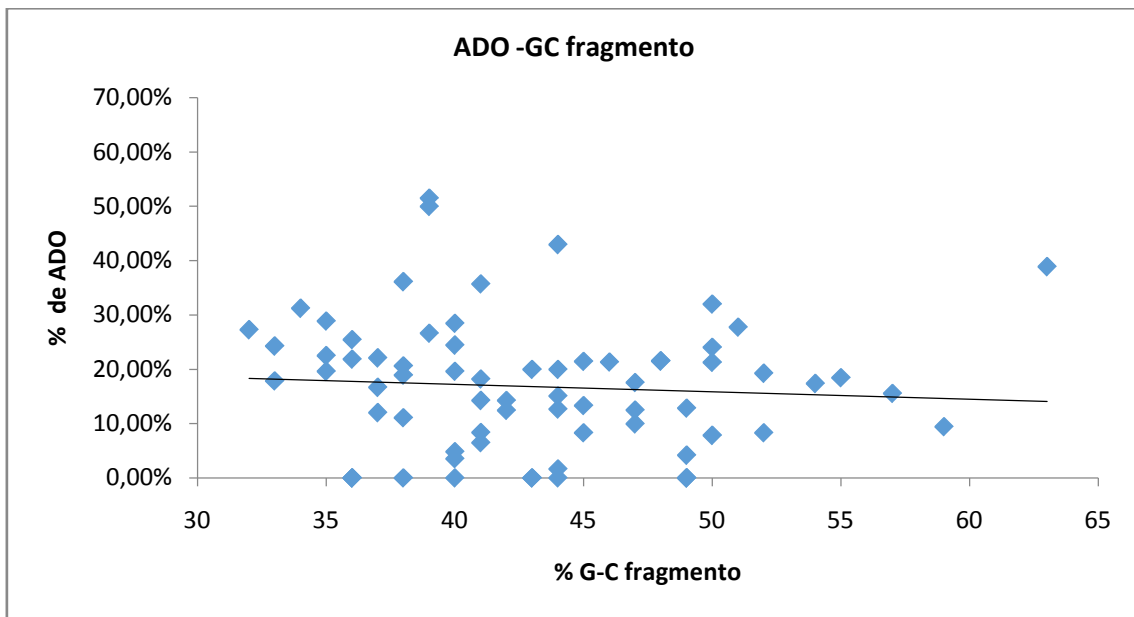


Figura 45. Relación negativa entre la tasa de ADO y el contenido de G-C del fragmento amplificado

VI. Discusión

VI. DISCUSIÓN

El principal objetivo del TGP-A es la mejora de las tasas de éxito de la fecundación *in vitro*. La introducción de nuevas tecnologías en el campo de la medicina reproductiva es una práctica común. Lógicamente, y antes de su aplicación clínica, cualquier técnica debe validarse con el fin de garantizar su eficiencia y precisión en el diagnóstico. Como ejemplo de tecnología emergente, la secuenciación masiva proporciona un alto rendimiento y permite el análisis en paralelo de múltiples muestras embrionarias (Fiorentino et al. 2014b).

La secuenciación masiva es una nueva técnica aplicada al TGP que permite la detección de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales en los embriones preimplantación. Sin embargo, y hasta la fecha, no se dispone de unas directrices claras para su validación. La Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) ha desarrollado una serie de directrices generales, de acuerdo con los estándares de calidad adecuados, aunque están restringidas a los análisis basados en PCR y FISH (Harton et al., 2011a y b).

En este caso, para la validación de la NGS se utilizó una línea celular GM50159 de linfocitos B que presentaba una duplicación de 17 megabases en el cromosoma 18 (18q). Se realizó su cultivo y tipificación mediante un “array”-CGH 44k de oligos y el aislamiento de células individuales para su diagnóstico y validación mediante NGS. Los resultados confirmaron la detección del fragmento duplicado mediante secuenciación masiva, tanto en el análisis de una célula, cinco células y diez células. Fiorentino y colaboradores (2014), en una primera fase de validación del NGS evaluaron muestras, con cariotipo anormal conocido, procedentes de cultivo de líquido amniótico, y obtuvieron valores de especificidad y sensibilidad cercanos al 100% (Fiorentino et al. 2014a). En nuestro caso, una vez probada y validada la secuenciación masiva, se procedió al análisis de muestras de WGA procedentes de embriones biopsiados en día 3 y día 5 de cultivo embrionario.

Otro aspecto a tener en cuenta, es el método WGA utilizado para la amplificación del genoma de la muestra. Antes de su aplicación clínica para el estudio de anomalías cromosómicas o enfermedades monogénicas es necesaria una adaptación y validación de un método de WGA específico para el análisis mediante NGS y que no introduzca sesgos altamente representativos. Este WGA debe proporcionar un alto rendimiento y una copia del ADN original de una manera eficiente, con una cobertura completa del genoma.

Se han descrito diferentes métodos de WGA para el análisis de muestras biopsiadas, pero hay dos tipos principales: los basados en PCR y los basados en amplificación de desplazamiento múltiple (MDA). Ambos métodos se han utilizado tanto para el estudio de enfermedades monogénicas como para el análisis cromosómico (Sermon et al. 1996; Hu et al. 2004; Hellani et al. 2008). Actualmente, los métodos de WGA basados en PCR han mejorado la eficiencia de amplificación, de manera que existen estudios donde se ha logrado que este parámetro alcance entre el 97% y el 99% cuando se aplica a blastómeros individuales (Rauch et al. 2004; Scott et al. 2013).

Por ello, elegir el tipo de WGA más adecuado para el análisis es un paso importante, ya que debe permitirnos distintos tipos de análisis sin comprometer la fiabilidad diagnóstica. La amplificación de las muestras y la comprobación del resultado en un gel de agarosa, es el

primer punto de control de calidad para validar la idoneidad de una muestra. Este primer indicador nos permite confirmar si la muestra presenta un ADN óptimo o degradado.

En la validación, incluimos dos métodos distintos de WGA, el “Sureplex” y “Genomiphi” para amplificación de muestras de trofoectodermo con el fin de detectar posibles errores introducidos por el método de amplificación de genoma completo. Esta comparación permitió descartar cualquier artefacto que pudiera alterar el resultado final del diagnóstico (falsos positivos o falsos negativos). Se obtuvo amplificación y resultado por secuenciación masiva en todas las muestras incluidas en el experimento (100%). En cuanto al análisis Apto/No Apto de las muestras hubo un 100% de concordancia. Sin embargo, una de las muestras amplificadas con “Genomiphi” presentó un desequilibrio y con la amplificación “Sureplex” se detectaron dos desequilibrios. La robustez de “Sureplex” como método de amplificación la ratificamos con un reanálisis por NGS de un desequilibrio en el cromosoma 5, consistente en una duplicación 5p15.33p11. Los resultados fueron totalmente satisfactorios porque la respuesta fue idéntica a la del primer análisis.

Otra fase del estudio incluía la evaluación mediante NGS de productos de WGA pertenecientes a ciclos de “screening” de aneuploidías en biopsias de blastómeros y de trofoectodermo, que previamente habían sido analizados utilizando el “array”-CGH. Los resultados obtenidos indican que la técnica de NGS descrita es comparable al “array”-CGH para el diagnóstico de aneuploidía, con > 98% de concordancia entre NGS y “array”-CGH. Varios estudios confirman estas tasas de concordancia (Fiorentino et al. 2014b). Kung y colaboradores (2015) volvieron a analizar embriones en día 3 y día 5 utilizando NGS. Encontraron que la especificidad y la sensibilidad de NGS eran ambas del 100% y que la concordancia entre NGS y “array”-CGH era superior al 99% (Kung et al. 2015). Yan y colaboradores(2015) obtuvieron también resultados de especificidad, sensibilidad y valor predictivo positivo y negativo para NGS del 100% al analizar embriones previamente estudiados mediante “array”-CGH. Realizaron también un ensayo controlado aleatorio con dos grupos, uno analizado mediante NGS y otro con “array”-CGH. Los resultados no revelaron diferencias significativas en las tasas de embarazo clínico, embarazo en curso y aborto espontáneo entre los dos grupos (Yang et al. 2015).

Los resultados que obtuvimos en la validación del TGP-A basados en el análisis de blastómeros presentaron un 100% de concordancia. En el análisis de las muestras procedentes de biopsia de trofoectodermo, una única muestra diagnosticada como euploide mediante “array”-CGH presentó un resultado euploide-mosaico en el estudio mediante NGS. Esta muestra presenta cromosomas en monosomía que estaban en mosaico y que no habían podido ser detectados con el “array”-CGH.

La capacidad de NGS para detectar mosaicismo se ha demostrado en varios estudios. Maxwell y colaboradores (2016) reanalizaron por NGS muestras de embriones euploides obtenidos con “array”-CGH, y que resultaron en un aborto espontáneo o un nacimiento vivo. De los blastocistos diagnosticados como euploides por “array”-CGH que resultaron en aborto espontáneo, el 13,6% eran mosaico y 5,2% fueron diagnosticados como poliploides con NGS (Maxwell et al. 2016). También es importante tener en cuenta que algunos

embriones diagnosticados como mosaicos han sido transferidos y han resultado en embarazo con nacidos vivos sanos (Greco et al. 2015; Maxwell et al. 2016).

Con estos resultados, >98% de concordancia, se demuestra que la secuenciación masiva puede aplicarse con éxito al análisis, tanto de blastómeros como de trofoectodermo de embriones humanos, permitiendo una determinación precisa del número de copias de los 24 cromosomas.

El estudio de validación preclínico se ha realizado para determinar la precisión y exactitud de un protocolo basado en secuenciación masiva que permita la detección de desequilibrios cromosómicos en embriones procedentes de pacientes portadores de alteraciones cromosómicas estructurales.

Para evaluar la precisión del NGS en la detección de desequilibrios cromosómicos se utilizó ADN amplificado mediante WGA ("Sureplex") de embriones procedentes de pacientes portadores de alteraciones cromosómicas en equilibrio, y que previamente habían sido analizadas mediante "array"-CGH. Aunque el objetivo principal del estudio fue la detección de desequilibrios cromosómicos, también se estudiaron en paralelo las aneuploidías de todos los cromosomas. Nuestros datos apoyan el uso de la secuenciación masiva como una técnica fiable y viable tanto para la detección de aneuploidías y desequilibrios, para los que proporciona un patrón claro y discriminante, y también para la detección de mosaicismo.

Demostramos la capacidad del método basado en NGS para identificar desequilibrios cromosómicos y predecir la segregación de las translocaciones tanto en embriones en etapa de escisión como en blastocistos. Se obtuvo un perfil de NGS válido para el 100% de las muestras analizadas. Nuestros resultados muestran que el enfoque basado en NGS ofrece un nivel de precisión comparable al de "array"-CGH para el diagnóstico de aneuploidías y desequilibrios cromosómicos. En general, la tasa de concordancia de NGS y "array"-CGH para la detección de deleciones y duplicaciones segmentarias fue del 98,6% (71/72).

En los análisis realizados utilizando solo biopsias de blastómeros, todos los embriones diagnosticados como euploides/equilibrados o aneuploides por "array"-CGH fueron diagnosticados como tales por NGS (100% de concordancia diagnóstica). Sin embargo, en los análisis de biopsias de trofoectodermo, no todos los embriones diagnosticados como euploides/equilibrados por "array"-CGH se clasificaron como tales por NGS 25/28 (89,3% de concordancia). Sí obtuvimos total concordancia en el diagnóstico de los embriones aneuploides: todos los embriones diagnosticados como aneuploides con "array"-CGH también se clasificaron como aneuploides por NGS (100% de concordancia). La consistencia diagnóstica del NGS con el método "array"-CGH fue de 96,5% (82/85) Otros estudios publicados para validación de translocaciones mediante NGS han presentado concordancias superiores al 99% (Yin et al. 2013; Bono et al. 2015; Deleye et al. 2015).

Los resultados obtenidos permitieron la estimación de los límites de detección del enfoque basado en NGS. La probabilidad de detectar un desequilibrio cromosómico depende de la localización de los puntos de rotura de translocación en los cromosomas y del tamaño de la (s) región (es) cromosómica desequilibrada (s). Los pequeños desequilibrios pueden ser difíciles de identificar cuando los puntos de rotura están ubicados cerca de los telómeros

debido a la resolución de los “software” de análisis. En nuestro caso, la secuenciación masiva permitió la detección de desequilibrios cromosómicos de 4,1 Mb de tamaño en biopsias de blastómeros. Los fragmentos cromosómicos inferiores a 4,1 Mb no se detectaron con NGS. Esto puede explicarse por el límite de detección del algoritmo utilizado para la detección de la CNV en el software de análisis BlueFuse. El menor desequilibrio cromosómico detectado varía en los estudios publicados. Fiorentino y colaboradores determinaron desequilibrios de 14 megabases (Fiorentino et al. 2014b). Bono y colaboradores (2015) detectaron un segmento cromosómico de 5 megabases (Bono et al. 2015). Deleye y colaboradores (2015) determinaron un fragmento cromosómico de 4,5 megabases y de 3 megabases, aunque este último presentaba una relación de señal/ruido elevada (Deleye et al. 2015).

El uso de la secuenciación masiva para el estudio de las anomalías cromosómicas estructurales en los casos de TGP-SR ofrece muchas ventajas sobre otras técnicas. NGS proporciona un alto rendimiento y utilizando tecnologías de codificación “ADN barcoding” (Knapp et al. 2012). Además, la secuenciación masiva permite la detección de aneuploidías y la detección del mosaicismo cromosómico en embriones de fecundación *in vitro*, así como la evaluación simultánea de enfermedades monogénicas (Treff et al. 2013) y anomalías del genoma mitocondrial en la misma muestra de biopsia, lo que excluye la necesidad de usar múltiples plataformas tecnológicas.

Aunque, y hasta donde nosotros conocemos, aún no se han publicado casos de TGP que usen NGS para anomalías cromosómicas estructural del tipo, anillos y marcadores, según los estudios mencionados anteriormente, NGS tiene el potencial y la eficiencia para detectarlas. Por lo tanto, se necesitan más estudios para validar el uso de NGS para el cromosoma en anillo y marcador.

La automatización y la escalabilidad son otras ventajas de los enfoques basados en NGS: el potencial para automatizar la preparación de librerías minimiza los errores humanos, reduce el tiempo de uso y proporciona un mayor rendimiento y una mayor consistencia. Además, a diferencia de “array”-CGH, la hibridación de una muestra de control no es necesaria para la NGS. Los métodos de NGS pueden, en última instancia, reducir el coste del análisis por paciente, proporcionando a las parejas que realizan un ciclo de fecundación *in vitro* un mayor acceso a las pruebas genéticas de diagnóstico genético preimplantacional para seleccionar el embrión más competente para la transferencia.

A pesar de las muchas ventajas mencionadas anteriormente, se deben tener en cuenta varias limitaciones de las tecnologías NGS. Como otras tecnologías utilizadas actualmente para PGT-A, mediante secuenciación masiva no podemos detectar directamente reordenamientos cromosómicos equilibrados que no causan pérdidas o ganancias en el contenido total de ADN (Fiorentino et al. 2014b) Además, se requiere un número suficiente de muestras para utilizar completamente la capacidad de secuenciación disponible y, por lo tanto, minimizar el coste del proceso.

En comparación con “array”-CGH, la secuenciación masiva puede detectar el mosaicismo embrionario cuando la aneuploidía está presente entre el 20 y 80% de las células de trofoectodermo biopsiadas de un blastocisto (Munné and Wells 2017). Cabe destacar que

el software BlueFuse de Illumina, usado para este análisis, no está adaptado de forma automática para la detección de mosaicismo ni de translocaciones. Estas deben analizarse y marcarse de manera manual. Por ello, debemos confirmar siempre que podemos detectar las posibles segregaciones antes de realizar el Test Genético Preimplantacional de alteraciones cromosómicas estructurales.

El enfoque que existe para el análisis cromosómico de aneuploidías o alteraciones cromosómicas estructurales en el TGP es distinto cuando estamos ante biopsias de trofoectodermo en comparación con el blastómero. La biopsia de blastocisto permite disponer de una mayor cantidad de ADN de partida, ya que podemos analizar de 5 a 10 células como una única muestra, minimizando los problemas presentes cuando se analiza un único blastómero.

En la etapa de blastocisto, los niveles de mosaicismo no son tan altos. Se ha estimado que las tasas de mosaico pueden llegar a ser del 60% en la etapa de escisión, pero son más bajas, aproximadamente el 20%, en la etapa de blastocisto (Johnson et al. 2010; Capalbo et al. 2013). Estudios mediante FISH que utilizaron métodos apropiados establecieron una tasa de mosaicismo en torno al 30% tanto en estadio de división como en blastocisto (Bielanska 2002; Fragouli et al. 2011). La tasa de mosaicismo en biopsias de blastocisto con el uso de “array”-CGH se estima en 4,8% -32% y puede variar según los protocolos de “array”-CGH utilizados (Fragouli et al. 2011; Capalbo et al. 2013; Greco et al. 2015).

Gracias a tecnologías como la secuenciación masiva podemos detectarlo de una manera más eficiente que con el “array”-CGH. Tecnologías como el “array”-CGH pueden detectar a veces el mosaicismo cuando el porcentaje de células aneuploide es mayor al 40% como describen algunos estudios (Fragouli et al, 2011a). Por su parte, la secuenciación masiva permite el análisis del mosaicismo a partir de un 20% de células aneuploides (Munné y Wells, 2017). Esto se ha visto reflejado tanto en la validación del “screening” de aneuploidías como en las alteraciones cromosómicas estructurales. Las diferencias entre ambas metodologías aparecen en las muestras analizadas de trofoectodermo, ya que con el NGS, y a diferencia de “array”-CGH, sí se detectó un cromosoma aneuploide en mosaico.

Las alteraciones cromosómicas estructurales representan una de las indicaciones más frecuentes para el diagnóstico genético preimplantacional.

Las translocaciones recíprocas consisten en el intercambio de segmentos cromosómicos entre dos cromosomas no homólogos, sin alterar el número total de cromosomas. Los portadores de translocaciones recíprocas presentan un riesgo teórico de segregaciones anormales en torno al 80%. Estudios cromosómicos en espermatozoides y en corpúsculo polar han revelado que el riesgo de gametos anormales en los portadores de translocaciones recíprocas es similar o peor al riesgo teórico. En consecuencia, se debe tener en cuenta este elevado porcentaje en los casos que se pretende realizar TGP (Escudero et al. 2008)

En el caso de las translocaciones robertsonianas se produce un reordenamiento en el que intervienen dos cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21, y 22), perdiéndose la información de los brazos cortos. Aunque el portador suele ser fenotípicamente normal, el número total de cromosomas decrece. En este tipo de alteración cromosómica, el

porcentaje teórico de formación de gametos anormales es del 75%, cuando se producen fusiones heterólogas entre dos cromosomas acrocéntricos diferentes.

En las inversiones se producen dos roturas dentro de un cromosoma, inversión del segmento entre ellas y unión de los fragmentos cromosómicos implicados. Los portadores de inversiones equilibradas pueden presentar cierta disminución de su fertilidad por la generación de proporciones variables de gametos no funcionales. Para las inversiones el riesgo teórico de segregaciones anormales es del 50%, aunque en la práctica es mucho menor, no superando el 20%.

Debemos tener en consideración, que existen otros factores que pueden influir en el porcentaje, como son el cromosoma que esté implicado, los puntos de rotura y el sexo del portador de la alteración (Scriven et al. 1998).

Teniendo en cuenta la segregación teórica esperada de gametos desequilibrados para cada una de las anomalías cromosómicas estructurales, se compararon los resultados obtenidos mediante "array"-CGH en el período 2011-2017 con los obtenidos con secuenciación masiva tras su validación.

Observamos diferencias que se pueden relacionar en primer lugar por el tamaño de la muestra analizado con NGS. Un segundo aspecto a tener en cuenta sería el cambio en el día de la biopsia, pasando a tener un mayor número de ciclos con biopsia en estadio de blastocisto. Con el "array"-CGH el 89,8% de los ciclos se realizó en día 3 y con el NGS el 76% de los ciclos se realizaron en día 5. La tasa de amplificación fue del 92,2% para los casos de "array"-CGH y del 95,7% para los casos mediante NGS. Esta diferencia está relacionada con la mayor cantidad de ADN de partida. En cuanto al porcentaje total de embriones euploides/equilibrados (aptos) para las alteraciones cromosómicas estructurales se observaron diferencias significativas entre ambas metodologías ($p=0,0161$), siendo para los casos de secuenciación masiva del 26,8% y el 20% para el "array"-CGH.

El porcentaje de embriones euploides/equilibrados difiere para cada una de las indicaciones, y aunque es más elevado para los casos de NGS, se mantiene esa relación: 10,79% vs 18,7% para las translocaciones recíprocas; 30,18% y 40% para las translocaciones robertsonianas; 36,6% vs 43,6% para las inversiones, porcentajes mediante "array"-CGH y NGS, respectivamente. En 2005, Munné obtuvo porcentajes del 30% para translocaciones robertsonianas, aunque es inferior a los publicados por otros autores. Este es el caso de Scriven (2001) que obtuvo un 50% y el de Alves y colaboradores (2002) que encontraron un 59,9% de euploides equilibrados.

Por otro lado, en 2003, Escudero y colaboradores encontraron porcentajes del 23% de embriones euploides/equilibrados para las translocaciones recíprocas (Escudero et al. 2003). Asimismo, Lledó y colaboradores (2010) publicaron porcentajes más elevados de embriones euploides/equilibrados 31,4% (Lledó et al. 2010).

Para el caso de las inversiones Escudero y colaboradores (2008), publicaron porcentajes de embriones euploides/equilibrados del 81,2% para una inversión en el cromosoma 12. Estos autores u otros concluyeron que la aparición de un número menor de embriones

desequilibrados en inversiones está relacionada con el tamaño del fragmento invertido (Iwarsson et al. 1998; Escudero et al. 2008).

El porcentaje de embriones euploides/equilibrados obtenidos mediante “array”-CGH y NGS para los reordenamientos de origen paterno fue de 21,10% vs 28,7%, respectivamente. En cuanto a los resultados para los reordenamientos de origen materno fue de 18,07% vs 25,7%. En consecuencia, se encuentran diferencias significativas ($p=0,2965$), con nivel de significación del 95%. Estos mismos resultados se observaron en otros estudios.

Lledó y colaboradores (2010) presentaron una incidencia global de embriones desequilibrados del 68,6%, pero no encontraron diferencias entre portadores femeninos y masculinos (Lledó et al. 2010). Ogilvie y Scriven (2002), publicaron frecuencias similares de embriones desequilibrados con respecto al género del portador de la translocación recíproca (Ogilvie and Scriven, 2002). Según la IX recopilación de datos del consorcio PGD de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE) (Goossens et al., 2009), alrededor del 80% de los embriones de portadores de translocación recíproca se diagnostican como no transferibles y se notificaron frecuencias similares de embriones equilibrados con respecto al portador de la translocación.

El porcentaje de ciclos con transferencia (con al menos un embrión para transferir) que encontramos fue del 57,97% para los casos de “array”-CGH y del 42% para los casos de NGS ($p=0,0523$). En relación al origen de la alteración fue del 62,6% vs 42,85% para los de origen paterno y 52,3% vs 41,3% para los de origen materno, mediante “array”-CGH y NGS respectivamente. El porcentaje de ciclos con transferencia para los casos analizados mediante “array”-CGH fue del 40% para las translocaciones recíprocas, del 77% para las translocaciones Robertsonianas y del 92% para las inversiones. En el análisis de los resultados mediante NGS fue del 60% para las translocaciones recíprocas, del 12,5% para las translocaciones Robertsonianas y del 16,5% para las inversiones.

En cuanto al porcentaje de embriones euploides/equilibrados es distinto en función del tipo de reordenamiento, teniendo un mejor pronóstico las inversiones, las translocaciones robertsonianas y por último las translocaciones recíprocas. Las diferencias entre los resultados obtenidos en el porcentaje de ciclos con transferencia en función del tipo de reordenamiento, indican que tienen un mejor pronóstico las inversiones para los casos de “array”-CGH y las translocaciones recíprocas para los casos de NGS. Esta diferencia puede deberse al número de ciclos realizados hasta el momento mediante NGS en TGP-SR. Como ya hemos comentado, la alteración estructural más frecuentemente analizada es la translocación recíproca, que puede aparecer sobre expresada en estos primeros 50 ciclos.

En resumen, el tipo de reordenamiento cromosómico está completamente relacionado con el éxito del ciclo de TGP-SR. A la espera de que los datos se equiparen, podemos deducir que tiene mejor pronóstico la inversión, que la translocación robertsoniana y éstas dos mejor que la translocación recíproca. Como se ha encontrado en los estudios citados esta relación se mantiene y puede estar relacionada con el porcentaje teórico que se espera de gametos desequilibrados para cada una de las alteraciones.

El Diagnóstico Genético Preimplantacional de enfermedades monogénicas es una técnica cada más solicitada por las parejas portadoras de enfermedades genéticas graves, ya que

les ofrece la oportunidad de realizar el diagnóstico de su descendencia antes de la implantación en el útero materno, evitando así el aborto terapéutico.

Hace 50 años, Gardner y Edwards apuntaron la posibilidad de predecir el sexo de los conejos después de la biopsia de las células del trofoectodermo en la etapa de blastocisto (Gardner y Edwards, 1968). Este estudio inicial en animales preparó el escenario para estudios posteriores relacionados con la biopsia y la TGP de embriones humanos. La primera aplicación clínica del TGP en la que se utilizaron técnicas de reproducción asistida, biopsia de embriones en desarrollo y análisis genético de una única célula se publicó en 1989 (Handyside et al. 1989).

El TGP-M es una técnica que nos permite abordar el estudio de cualquier enfermedad monogénica grave. Esta técnica se ha empleado en los últimos 30 años para el diagnóstico de diversas enfermedades que conforman una lista cada vez más extensa. Sin embargo, también las metodologías empleadas en el diagnóstico de estas enfermedades son muy variadas y, en ocasiones, complejas.

Los métodos convencionales para TGP se basan en la reacción en cadena de la polimerasa que permite amplificar segmentos de ADN e identificar mutaciones específicas o polimorfismos (STRs) que segregan con la mutación causante de la enfermedad. La realización de pruebas específicas en la familia requiere la búsqueda y el diseño de marcadores (STR), para determinar qué marcadores son informativos (idealmente con diferentes números de repeticiones para cada uno de los cuatro cromosomas parentales), seguido de optimización en células individuales (Renwick et al. 2010; Drüsedau et al. 2013). El TGP-M también se puede realizar utilizando SNPs para realizar el análisis mediante haplotipos (Natesan et al. 2014; Konstantinidis et al. 2015). Uno de estos “arrays” de SNP es el “Karyomapping”, con alrededor de 280.000 SNPs repartidos por todo el genoma, y que permite el diagnóstico mediante segregación. Existen estudios en los que la tasa de diagnóstico no concluyente es de aproximadamente el 10% para “Karyomapping” (Konstantinidis et al. 2015).

Aunque el uso de la secuenciación masiva para descartar una enfermedad monogénica aún no ha avanzado más allá de la prueba de concepto (Treff et al. 2013), con la utilización de esta tecnología para el análisis de aneuploidías, es probable que no pase mucho tiempo antes de su implantación en la práctica clínica.

Se han publicado varios estudios de detección de enfermedades monogénicas con secuenciación masiva (Wells et al. 2014; Chen; et al. 2017). Yan y colaboradores (2015) estudiaron dos parejas, una portadora de exostosis múltiple y otra de displasia ectodérmica mediante NGS. Realizaron biopsias de corpúsculo polar y trofoectodermo. La confirmación de los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva la realizaron con “array”-CGH, secuenciación Sanger y análisis de haplotipos mediante STRs (Yan et al. 2015).

El protocolo desarrollado en nuestro laboratorio pretende establecer unas condiciones únicas de diagnóstico para cualquier enfermedad en el que únicamente varían los cebadores que serán dependientes del locus o enfermedad a estudiar. Esto permite simplificar todo el procedimiento en el diagnóstico de enfermedades monogénicas y, por

tanto, reducir los tiempos de respuesta en la fase de estudio de informatividad, puesto que las condiciones son iguales en el estudio de cualquier enfermedad y permite comparar los parámetros de éxito de los diagnósticos (tasa de eficiencia diagnóstica, tasa de “allele drop-out” y fallo de amplificación) independientemente del locus analizado.

El empleo del MDA permite realizar un gran número de reacciones con una tasa de eficiencia diagnóstica por encima del 95%. Las tasas de “allele drop-out” asociadas a este protocolo son similares o incluso inferiores a las descritas en la bibliografía (Spits y Sermon, 2009) y el posible error diagnóstico, consecuencia de este fenómeno, se solventa con la inclusión de una media de 5-6 marcadores informativos o semi-informativos por diagnóstico.

En nuestro caso, del total de embriones analizados en el TGP de enfermedades monogénicas se obtuvo diagnóstico en más del 90% de los embriones. Cuando estamos frente al análisis de una única célula, estos resultados permiten confirmar que la metodología de trabajo empleada para el diagnóstico es altamente eficiente. Las tasas de amplificación de los embriones son superiores al 92%. En el análisis de los marcadores STRs, las tasas de eficiencia de amplificación son superiores al 96% y cercanas al 99% en el análisis de las mutaciones. Estos resultados, junto con bajas tasas de ADO global que están en torno al 18%, permiten tener resultados diagnósticos eficientes (Sermon et al. 1996; Hu et al. 2004; Hellani et al. 2008).

En cuanto a los resultados de los 366 ciclos de TGP-M, un 88% de ciclos tuvo transferencia embrionaria, con un 50% de los embriones entre sanos y portadores/sanos Aptos para transferir.

El objetivo final del TGP-M es la selección de un embrión "sano" para transferir. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos y el largo proceso, la transferencia de un embrión sano para la enfermedad monogénica puede resultar en un fallo de implantación, un aborto espontáneo o un embrión con alguna anomalía cromosómica

Para solventar esta cuestión, se estandarizó un protocolo denominado COMB-TGP, basado en la combinación de dos métodos diagnósticos independientes: por un lado se realiza el estudio de la enfermedad monogénica mediante el análisis de marcadores tipo STRs y análisis de la mutación, y por otro analizamos el componente cromosómico del embrión (Obradors et al. 2008; Daina et al. 2013).

Para ello, y como punto de partida del protocolo, se hace necesaria la amplificación del genoma completo mediante WGA. En nuestro caso, partíamos de dos métodos distintos: el “Genomiphi” y el “Sureplex”. El “Genomiphi” le hemos utilizado de manera rutinaria en los análisis de enfermedades monogénicas (Coskun y Alsmadi, 2007). Sin embargo, no hemos obtenido resultados óptimos en el análisis del complemento cromosómico mediante “array”-CGH. En algunos estudios se han utilizado productos de MDA en una sola célula para el análisis con “array”-CGH (Hellani et al. 2004; Le Caignec et al. 2006).

Además aparecen otros estudios que indican, que como ocurre en nuestro caso, los productos de MDA pueden resultar en perfiles distorsionados (Treff et al. 2011; Voet et al. 2013).

El “Sureplex”, por el contrario, nos permitía obtener muy buenos resultados en el análisis cromosómico, pero ciertos marcadores tipo STRs presentaban amplificaciones inespecíficas en el estudio de la enfermedad monogénica. El resultado de la estandarización permitió seleccionar un tipo u otro de metodología en función del tipo de muestra de partida. Para el análisis de la enfermedad monogénica y las aneuploidías mediante NGS, en los casos de biopsia de blastómero, la amplificación mediante WGA la hemos realizado con “Sureplex” (Rauch et al. 2004; Scott et al. 2013). Para los casos de biopsia de trofoectodermo, la amplificación mediante WGA la hemos realizado con “Genomiphi”.

De los 40 ciclos de COMB-TGP se analizaron un total de 263 embriones, con tasas de amplificación del 95,4% y con un 94% de embriones con diagnóstico para el estudio de la enfermedad monogénica. El número total de embriones Aptos para la transferencia fue de 42 embriones, con una media de embriones Aptos por ciclo de 1. Como resultado obtuvimos que el 57,5% de los ciclos de COMB-TGP iniciados tuvieron transferencia embrionaria. Podemos resaltar la diferencia obtenida cuando únicamente se analiza la enfermedad monogénica, donde el 88% de los ciclos tienen transferencia, frente al 57% en el TGP combinado. En 2015, Daina y colaboradores realizaron el análisis doble de enfermedad monogénica y aneuploidías en una sola biopsia de blastómero de 62 embriones del día 3. En sus resultados obtuvieron que el 68,2% de los embriones analizados no estaban afectados para la enfermedad monogénica, aunque solo el 43,3% de ellos eran euploides (Daina et al. 2015).

Las enfermedades monogénicas, las anomalías cromosómicas y las aneuploidías se pueden detectar con una sola biopsia, de blastómero o trofoectodermo, sin impacto negativo en la implantación y desarrollo del blastocisto, produciendo buenos resultados clínicos, comparables con los recogidos en la literatura (Traversa et al. 2010; Tan et al. 2013).

La estandarización de los protocolos de diagnóstico genético utilizados en el Test Genético Preimplantacional nos permite ofrecer unos resultados con una alta fiabilidad que queda reflejada en la eficacia conseguida con esta metodología de trabajo. Esta estandarización tiene que empezar en la etapa del estudio de informatividad y desde el momento en que la célula embrionaria es introducida en el tubo de PCR donde se llevará a cabo la lisis celular, la posterior amplificación masiva del ADN mediante la técnica WGA y las diferentes PCR multiplex. La mejora de estos resultados va acompañada del análisis del complemento cromosómico del embrión. Todo ello nos permitirá llegar a seleccionar el embrión “Apto” para su transferencia al útero materno y evitar las transferencias de embriones aneuploides. Como consecuencia, también se logra reducir los tiempos para conseguir una gestación y se permite la transferencia selectiva de un único embrión en el ciclo de TGP.

En nuestro laboratorio y durante estos dos últimos años, hemos podido validar la tecnología de NGS para dos de los tres tipos de TGP que se realizan en la actualidad: el TGP-A y TGP-SR. En la actualidad continuamos los trabajos para lograr la validación para el TGP-M. Alcanzado este último objetivo dispondríamos de la metodología adecuada y fiable para realizar los distintos tipos de diagnósticos preimplantacionales mediante una sola tecnología. Para la realización de este objetivo, se pretende diseñar un panel de

polimorfismos de nucleótido único (“Single Nucleotide Polymorphisms” SNPs) que permita el análisis conjunto de un número elevado de enfermedades monogénicas mediante NGS.

El Test Genético Preimplantacional engloba una serie de técnicas que permiten diagnosticar una determinada condición genética en células embrionarias. Su fin último es evitar la transmisión de una enfermedad genética grave a la descendencia y que la pareja pueda tener un hijo sano. Si bien, es una técnica que no está exenta de controversia.

Es una herramienta técnica potente que nos permite el diagnóstico y la selección de embriones sanos para una determinada patología, además en aquellas parejas que presentan alteraciones cromosómicas estructurales o tienen problemas reproductivos, mejorar la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida.

Constituye uno de los avances más importantes en el análisis y diagnóstico de enfermedades genéticas, y es inevitable que surjan a su alrededor una serie de utopías, muy discutibles desde el punto de vista ético, como la selección del niño “perfecto” o la “mejora” de determinadas características, etc. Frente a esta interpretación próxima a la eugenesia, encontramos en el lado opuesto la disposición de este conjunto de técnicas para garantizar la “mejor” condición de salud para la descendencia de las parejas que tienen que utilizar estos servicios.

De igual modo, la evolución vertiginosa de la tecnología asociada al TGP (con actualizaciones y modificaciones de los protocolos constantes o también la incorporación de nuevos métodos de análisis) no se corresponde con la actualización de la normativa legal. Sería deseable que se arbitraran medidas más ágiles para la puesta al día del marco legal que permitieran la incorporación de los nuevos avances a la práctica clínica.

VII. Conclusiones

VII. CONCLUSIONES

1.-La validación de los distintos protocolos para el diagnóstico de TGP ha permitido confirmar que los dos métodos ensayados, "Sureplex" y "Genomiphi", son válidos para el estudio tanto de las enfermedades monogénicas como de las anomalías cromosómicas.

2.- Se ha determinado una concordancia de hasta el 98% entre la validación de la NGS y del "array"-CGH tanto para aneuploidías como para alteraciones cromosómicas estructurales. No obstante, la NGS ha permitido determinar la presencia de mosaicismos que no se pudieron determinar con el "array"-CGH.

3.- Se ha determinado mediante NGS un límite de 4,1 Mb en el tamaño de los fragmentos cromosómicos analizados en el protocolo de TGP-SR (alteraciones cromosómicas estructurales).

4.- Los resultados obtenidos confirman que la NGS es una técnica robusta, de alto rendimiento y lista para su aplicación clínica en el campo de la genética reproductiva. Permite detectar con altísima fiabilidad tanto aneuploidías (TGP-A) como desequilibrios cromosómicos (TGP-SR) y, por primera vez, casos de mosaicismo que afecten en más de un 20% de las células del trofoectodermo.

5.- El protocolo desarrollado para el TGP-M permite identificar en un embrión cualquier enfermedad monogénica cuyo gen esté identificado. Además, los resultados muestran que se simplifica y mejora el procedimiento diagnóstico debido a, por un lado, la reducción de los tiempos de respuesta en la fase de estudio de informatividad (<30 días), y, de otro lado, a que se alcanzan tasas de eficiencia de amplificación y de "allele drop-out", así como fallos en la amplificación comparables a métodos más tradicionales, pero independientes del *locus* analizado.

6.- La aplicación del COMB-TGP (aplicada en embriones de parejas con doble indicación genética y cromosómica) confirma a esta variante del TGP como particularmente fiable para la selección de un embrión euploide y exento de la enfermedad monogénica analizada. Así se logra, además, una reducción en el tiempo para conseguir una gestación, la transferencia selectiva de un único embrión por ciclo de TGP.

VIII. Bibliografía

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, H.I., Burton, G., Kirkland, A., Johnson, M.R., Leonard, T., Brooks, A.A., Studd, J.W.W., 1993. Pregnancy: Age, pregnancy and miscarriage: Uterine versus ovarian factors. *Hum. Reprod.* 8, 1512–1517. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138289>
- Alemañ, M., López, L., Cañadas, M.C., Madrid, G., 2007. Diagnóstico Genético Preimplantacional. ¿Cuándo está indicado?
- Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Wells, D., 2011. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray. *Hum. Reprod.* 26, 1560–74. <https://doi.org/10.1093/humrep/der068>
- Alves, C., Sousa, M., Silva, J., Barros, A., 2002. Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of Robertsonian translocations: The Portuguese experience. *Prenat. Diagn.* <https://doi.org/10.1002/pd.503>
- Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J., Vidal, F., 2004. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum. Reprod.* 19, 1345–1351. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh232>
- Baart, E.B., Van Opstal, D., Los, F.J., Fauser, B.C.J.M., Martini, E., 2004. Fluorescence in situ hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Hum. Reprod.* 19, 685–693. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh094>
- Bielanska, M., 2002. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum. Reprod.* 17, 413–419. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.2.413>
- Bishop, R., 2010. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Biosci. Horizons.* <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzq009>
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martín, G., Garmendia, C., Salas, M., 1989. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 264, 8935–8940.
- Bono, S., Biricik, A., Spizzichino, L., Nuccitelli, A., Minasi, M.G., Greco, E., Spinella, F., Fiorentino, F., 2015. Validation of a semiconductor next-generation sequencing-based protocol for preimplantation genetic diagnosis of reciprocal translocations. *Prenat. Diagn.* 35, 938–944. <https://doi.org/10.1002/pd.4665>
- Boué, J., Boué, A., Lazar, P., 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12, 11–26. <https://doi.org/10.1002/tera.1420120103>
- Bredenoord, A.L., Pennings, G., Smeets, H.J., de Wert, G., 2008. Dealing with uncertainties: Ethics of prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis to prevent mitochondrial disorders. *Hum. Reprod. Update.* <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm037>
- Brezina, P.R., Benner, A., Rechitsky, S., Kuliev, A., Pomerantseva, E., Pauling, D., Kearns, W.G., 2011. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: A novel approach in optimizing pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* 95. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.025>
- Burlet, P., Frydman, N., Gigarel, N., Kerbrat, V., Tachdjian, G., Feyereisen, E., Bonnefont, J.P., Frydman, R., Munnich, A., Steffann, J., 2006. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 647–652. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal069>

- Bustamante-Aragonés, A., Fernández, E., Peciña, A., Rueda, J., Ramos, C., Giménez, C., Monfort, S., Rubio, C., 2016. Guía de buenas prácticas en diagnóstico genético preimplantacional. *Med. Reprod. y Embriol. Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.medre.2016.05.002>
- Calogero, A.E., Burrello, N., De Palma, A., Barone, N., D'Agata, R., Vicari, E., 2003. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod. Biomed. Online* 6, 310–317. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61850-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61850-0)
- Camus, M., Clasen, K., De Vos, A., Van Steirteghem, A., 1999. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum. Reprod.* 14, 2474–2479. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.10.2474>
- Capalbo, A., Bono, S., Spizzichino, L., Biricik, A., Baldi, M., Colamaria, S., Ubaldi, F.M., Rienzi, L., Fiorentino, F., 2013a. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: Insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum. Reprod.* 28, 509–518. <https://doi.org/10.1093/humrep/des394>
- Capalbo, A., Wright, G., Elliott, T., Ubaldi, F.M., Rienzi, L., Nagy, Z.P., 2013b. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* 28, 2298–2307. <https://doi.org/10.1093/humrep/det245>
- Chen, L., Diao, Z., Xu, Z., Zhou, J., Yan, G., Sun, H., 2017. The clinical application of NGS-based SNP haplotyping for PGD of Hb H disease. *Syst. Biol. Reprod. Med.* <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1296501>
- Chen, H.F., Chang, S.P., Wu, S.H., Lin, W.H., Lee, Y.C., Ni, Y.H., Chen, C.A., Ma, G.C., Ginsberg, N.A., You, E.M., Tsai, F.P., Chen, M., 2014. Validating a rapid, real-time, PCR-based direct mutation detection assay for preimplantation genetic diagnosis. *Gene* 548, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.07.039>
- Coskun, S., Alsmadi, O., 2007. Whole genome amplification from a single cell: A new era for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* <https://doi.org/10.1002/pd.1667>
- Daina, G., Ramos, L., Obradors, A., Rius, M., del Rey, J., Martinez-Pasarell, O., Pujol, A., Benet, J., Navarro Ferreté, J., 2015. Double-factor preimplantation genetic diagnosis: Monogenic and cytogenetic diagnoses analyzing a single blastomere. *Prenat. Diagn.* <https://doi.org/10.1002/pd.4691>
- Daina, G., Ramos, L., Obradors, A., Rius, M., Martinez-Pasarell, O., Polo, A., del Rey, J., Obradors, J., Benet, J., Navarro, J., 2013. First successful double-factor PGD for Lynch syndrome: Monogenic analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Clin. Genet.* <https://doi.org/10.1111/cge.12025>
- Danylevska, A., Kovacicova, K., Awadova, T., Anger, M., 2014. The frequency of precocious segregation of sister chromatids in mouse female meiosis I is affected by genetic background. *Chromosom. Res.* <https://doi.org/10.1007/s10577-014-9428-6>
- Daphnis, D.D., Fragouli, E., Economou, K., Jerkovic, S., Craft, I.L., Delhanty, J.D.A., Harper, J.C., 2008. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 117–125. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam087>
- De, M.B., Dao, T.N., 1991. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum. Reprod.* 6, 245–250.
- De Vos, A., Staessen, C., De Rycke, M., Verpoest, W., Haentjens, P., Devroey, P., Liebaers, I., Van De Velde, H., 2009. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: A prospective cohort of single embryo transfers. *Hum. Reprod.* 24, 2988–2996. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep251>
- Debrock, S., Melotte, C., Spiessens, C., Peeraer, K., Vanneste, E., Meeuwis, L., Meuleman, C., Frijns,

- J.P., Vermeesch, J.R., D'Hooghe, T.M., 2010. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil. Steril.* 93, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.072>
- Deleye, L., Dheedene, A., De Coninck, D., Sante, T., Christodoulou, C., Heindryckx, B., Van Den Abbeel, E., De Sutter, P., Deforce, D., Menten, B., Van Nieuwerburgh, F., 2015. Shallow whole genome sequencing is well suited for the detection of chromosomal aberrations in human blastocysts. *Fertil. Steril.* 104, 1276–1285.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1144>
- Donoso, P., Staessen, C., Fauser, B.C.J.M., Devroey, P., 2007. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. *Hum. Reprod. Update.* <https://doi.org/10.1093/humupd/dml043>
- Drüsedau, M., Dreesen, J.C., Derks-Smeets, I., Coonen, E., Van Golde, R., Van Echten-Arends, J., Kastrop, P.M.M., Blok, M.J., Gómez-García, E., Geraedts, J.P., Smeets, H.J., De Die-Smulders, C.E., Paulussen, A.D., 2013. PGD for hereditary breast and ovarian cancer: The route to universal tests for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Eur. J. Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.50>
- Egozcue, S., Blanco, J., Vidal, F., Egozcue, J., 2002. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum. Reprod.* 17, 5–7. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.5>
- El-Toukhy, T., Kamal, A., Wharf, E., Grace, J., Bolton, V., Khalaf, Y., Braude, P., 2009. Reduction of the multiple pregnancy rate in a preimplantation genetic diagnosis programme after introduction of single blastocyst transfer and cryopreservation of blastocysts biopsied on Day 3. *Hum. Reprod.* 24, 2642–2648. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep172>
- Escudero, T., Abdelhadi, I., Sandalinas, M., Munné, S., 2003. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil. Steril.* [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00252-8)
- Escudero, T., Estop, A., Fischer, J., Munne, S., 2008. Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements. *Am. J. Med. Genet. Part A.* <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32286>
- Ferguson-Smith, M.A., Yates, J.R.W., 1984. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: Report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. *Prenat. Diagn.* 4, 5–44. <https://doi.org/10.1002/pd.1970040704>
- Findlay, I., Litford, R.J., Quirke, P., Findlay, I., Urquhart, A., Sullivan, K., Rutherford, A.J., 1995. Simultaneous DNA 'fingerprintin', diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1, 85–93. <https://doi.org/10.1093/molehr/1.2.85>
- Fiorentino, F., 2003. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 399–410. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag046>
- Fiorentino, F., Biricik, A., Bono, S., Spizzichino, L., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C.E., 2014a. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil. Steril.* 101. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.051>
- Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C.E., Minasi, M.G., Greco, E., 2014b. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum. Reprod.* 29, 2802–2813. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu277>
- Fiorentino, F., Caiazzo, F., Napolitano, S., Spizzichino, L., Bono, S., Sessa, M., Nuccitelli, A., Biricik, A., Gordon, A., Rizzo, G., Baldi, M., 2011. Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: A prospective study on over 1000 consecutive clinical

cases. *Prenat. Diagn.* 31, 1270–1282. <https://doi.org/10.1002/pd.2884>

- Fishel, S., Gordon, A., Lynch, C., Dowell, K., Ndukwe, G., Kelada, E., Thornton, S., Jenner, L., Cater, E., Brown, A., Garcia-Bernardo, J., 2010. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil. Steril.* 93. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.055>
- Forman, E.J., Li, X., Ferry, K.M., Scott, K., Treff, N.R., Scott, R.T., 2012. 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.* 98, 644–649. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.028>
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Daphnis, D.D., Goodall, N.N., Mania, A., Griffiths, T., Gordon, A., Wells, D., 2011. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: Scientific data and technical evaluation. *Hum. Reprod.* 26, 480–490. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq344>
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Babariya, D., Tarozzi, N., Borini, A., Wells, D., 2017. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid–aneuploid blastocysts. *Hum. Genet.* 136, 805–819. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1797-4>
- Fragouli, E., Katz-Jaffe, M., Alfarawati, S., Stevens, J., Colls, P., Goodall, N.N., Tormasi, S., Gutierrez-Mateo, C., Prates, R., Schoolcraft, W.B., Munne, S., Wells, D., 2010. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil. Steril.* 94, 875–887. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.053>
- Fragouli, E., Wells, D., Thornhill, A., Serhal, P., Faed, M.J.W., Harper, J.C., Delhanty, J.D.A., 2006a. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum. Reprod.* 21, 2319–2328. <https://doi.org/10.1093/humrep/del157>
- Fragouli, E., Wells, D., Whalley, K.M., Mills, J.A., Faed, M.J.W., Delhanty, J.D.A., 2006b. Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies. *Cytogenet. Genome Res.* 114, 30–38. <https://doi.org/10.1159/000091925>
- Franasiak, J.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Werner, M.D., Upham, K.M., Treff, N.R., Scott, R.T., 2014. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil. Steril.* 101. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.004>
- Fritz, B., Hallermann, C., Olert, J., Fuchs, B., Bruns, M., Aslan, M., Schmidt, S., Coerdts, W., Müntefering, H., Rehder, H., 2001. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)—Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 539.
- Fryns, J.P., Van Buggenhout, G., 1998. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 81, 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(98\)00185-7](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(98)00185-7)
- Gadow, E., 2007. DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIÓN: ACEPTABILIDAD Y CONTROVERSIAS.
- Gardner, R.L., Edwards, R.G., 1968. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/218346a0>
- Garrisi, G., Walmsley, R.H., Bauckman, K., Mendola, R.J., Colls, P., Munne, S., 2016. Discordance among serial biopsies of mosaic embryos. *Fertil. Steril.* 106, e151. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.447>
- Geraedts, J., Montag, M., Magli, M.C., Repping, S., Handyside, A., Staessen, C., Harper, J., Schmutzler, A., Collins, J., Goossens, V., van der Ven, H., Vesela, K., Gianaroli, L., 2011. Polar body array

- CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum. Reprod.* 26, 73–80. <https://doi.org/10.1093/humrep/der294>
- Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Scriven, P.N., Traeger-Synodinos, J., Sermon, K., Harper, J.C., 2008. ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006. *Hum. Reprod.* 23, 2629–2645.
- Greco, E., Minasi, M.G., Fiorentino, F., 2015. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N. Engl. J. Med.* 373, 2089–2090. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1500421>
- Griffin, D.K., Handyside, A.H., Harper, J.C., Wilton, L.J., Atkinson, G., Soussis, I., Wells, D., Kontogianni, E., Tarin, J., Geber, S., Ao, A., Winston, R.M.L., Delhanty, J.D.A., 1994. Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 11, 132–143. <https://doi.org/10.1007/BF02332090>
- Griffin, D.K., Wilton, L.J., Handyside, A.H., Winston, R.M.L., Delhanty, J.D.A., 1992. Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum. Genet.* 89, 18–22. <https://doi.org/10.1007/BF00207035>
- Gutiérrez-Mateo, C., Colls, P., Sánchez-García, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Wells, D., Munné, S., 2011. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil. Steril.* 95, 953–958. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.010>
- Gutiérrez-Mateo, C., Wells, D., Benet, J., Sánchez-García, J.F., Bermúdez, M.G., Belil, I., Egozcue, J., Munné, S., Navarro, J., 2004. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum. Reprod.* 19, 2118–2125. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh367>
- Guttenbach, M., Engel, W., Schmid, M., 1997. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. *Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s004390050459>
- Handyside, A.H., Harton, G.L., Mariani, B., Thornhill, A.R., Affara, N., Shaw, M.A., Griffin, D.K., 2010. Karyomapping: A universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J. Med. Genet.* 47, 651–658. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.069971>
- Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K., Winston, R.M.L., 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344, 768–770. <https://doi.org/10.1038/344768a0>
- Handyside, A.H., Lesko, J.G., Tarin, J.J., Winston, R.M.L., Hughes, M.R., 1992. Birth of a Normal Girl after in Vitro Fertilization and Preimplantation Diagnostic Testing for Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 327, 905–909. <https://doi.org/10.1056/NEJM199209243271301>
- Handyside, A.H., Penketh, R.J.A., Winston, R.M.L., Pattinson, J.K., Delhanty, J.D.A., Tuddenham, E.G.D., 1989. BIOPSY OF HUMAN PREIMPLANTATION EMBRYOS AND SEXING BY DNA AMPLIFICATION. *Lancet* 333, 347–349. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91723-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91723-6)
- Handyside, A.H., Robinson, M.D., Simpson, R.J., Omar, M.B., Shaw, M.A., Grudzinskas, J.G., Rutherford, A., 2004. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: A new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 767–772. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah101>
- Hardarson, T., Hanson, C., Lundin, K., Hillensjö, T., Nilsson, L., Stevic, J., Reismer, E., Borg, K., Wikland, M., Bergh, C., 2008. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 23, 2806–2812. <https://doi.org/10.1093/humrep/den217>

- Hardy, K., Martin, K.L., Leese, H.J., Winston, R.M.L., Handyside, A.H., 1990. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum. Reprod.* 5, 708–714. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137173>
- Harper, J.C., Sengupta, S.B., 2012. Preimplantation genetic diagnosis: State of the ART 2011. *Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1056-z>
- Harper, J.C., Wells, D., Piyamongkol, W., Abou-Sleiman, P., Apeessos, A., Ioulianos, A., Davis, M., Doshi, A., Serhal, P., Ranieri, M., Rodeck, C., Delhanty, J.D.A., 2002. Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: Experience with five single gene disorders. *Prenat. Diagn.* <https://doi.org/10.1002/pd.394>
- Harton, G., Braude, P., Lashwood, A., Schmutzler, A., Traeger-Synodinos, J., Wilton, L., Harper, J.C., 2011. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum. Reprod.* 26, 14–24. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq229>
- Harton, G.L., De Rycke, M., Fiorentino, F., Moutou, C., Sengupta, S., Traeger-Synodinos, J., Harper, J.C., 2011a. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum. Reprod.* 26, 33–40. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq231>
- Harton, G.L., Harper, J.C., Coonen, E., Pehlivan, T., Vesela, K., Wilton, L., 2011b. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum. Reprod.* 26, 25–32. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq230>
- Harton, G.L., Magli, M.C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., Harper, J.C., 2011c. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum. Reprod.* 26, 41–46. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq265>
- Harton, G.L., Munné, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D.H., Griffin, D.K., Wells, D., 2013. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil. Steril.* 100, 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.2002>
- Hassold, T., Abruzzo, M., Adkins, K., Griffin, D., Merrill, M., Millie, E., Saker, D., Shen, J., Zaragoza, M., 1996. Human aneuploidy: Incidence, origin and etiology, in: *Environmental and Molecular Mutagenesis*. pp. 167–175. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)28:3<167::AID-EM2>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)28:3<167::AID-EM2>3.0.CO;2-B)
- Hassold, T., Hall, H., Hunt, P., 2007. The origin of human aneuploidy: Where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet.* <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm243>
- Hassold, T., Hunt, P., 2001. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* <https://doi.org/10.1038/35066065>
- Hassold, T., Hunt, P.A., Sherman, S., 1993. Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 398–403. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(93\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0959-437X(93)90111-2)
- Hellani, A., Abu-Amero, K., Azouri, J., El-Akoum, S., 2008. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod. Biomed. Online* 17, 841–847. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60413-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60413-0)
- Hellani, A., Coskun, S., Benkhalifa, M., Tbakhi, A., Sakati, N., Al-Odaib, A., Ozand, P., 2004. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 847–852. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah114>
- Hens, K., Dondorp, W.J., Geraedts, J.P.M., De Wert, G.M., 2013. Comprehensive embryo testing. Experts' opinions regarding future directions: An expert panel study on comprehensive embryo testing. *Hum. Reprod.* 28, 1418–1425. <https://doi.org/10.1093/humrep/det018>
- Hodes-Wertz, B., Grifo, J., Ghadir, S., Kaplan, B., Laskin, C.A., Glassner, M., Munné, S., 2012.

- Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil. Steril.* 98, 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.05.025>
- Hook, E.B., Cross, P., Jackson, L., Pergament, E., Brambati, B., 1988. Maternal age-specific rates of 47,+ 21 and other cytogenetic abnormalities diagnosed in the first trimester of pregnancy in chorionic villus biopsy specimens: comparison with rates expected from observations at amniocentesis. *Am. J. Hum. Genet.* 42, 797.
- Hu, D.G., Webb, G., Hussey, N., 2004. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/gah038>
- Iselius, L., Lindsten, J., Aurias, A., Fraccaro, M., Bastard, C., Bottelli, A.M., Bui, T.H., Caufin, D., Dalprà, L., Delendi, N., Dutrillaux, B., Fukushima, Y., Geraedts, J.P.M., De Grouchy, J., Gyftodimou, J., Hanley, A.L., Hansmann, I., Ishii, T., Jalbert, P., Jingeleski, S., Kajii, T., von Koskull, H., Niikawa, N., Noel, B., Pasquali, F., Probeck, H.D., Robinson, A., Roncarati, E., Sachs, E., Scappaticci, S., Schwinger, E., Simoni, G., Veenema, H., Vigi, V., Volpato, S., Wegner, R.D., Welch, J.P., Winsor, E.J.T., Zhang, S., Zuffardi, O., 1983. The 11q;22q translocation: A collaborative study of 20 new cases and analysis of 110 families. *Hum. Genet.* 64, 343–355. <https://doi.org/10.1007/BF00292366>
- Iwarsson, E., Ährlund-Richter, L., Inzunza, J., Rosenlund, B., Fridström, M., Hillensjö, T., Sjöblom, P., Nordenskjöld, M., Blennow, E., 1998. Preimplantation genetic diagnosis of a large pericentric inversion of chromosome 5. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/molehr/4.7.719>
- Iwarsson, E., Lundqvist, M., Inzunza, J., Ährlund-Richter, L., Sjöblom, P., Lundkvist, Ö., Simberg, N., Nordenskjöld, M., Blennow, E., 1999. A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Hum. Genet.* 104, 376–382. <https://doi.org/10.1007/s004390050971>
- Jacobs, P.A., Hassold, T.J., 1995. The Origin of Numerical Chromosome Abnormalities. *Adv. Genet.* 33, 101–133. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60332-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60332-6)
- Johnson, D.S., Gemelos, G., Baner, J., Ryan, A., Cinnioglu, C., Banjevic, M., Ross, R., Alper, M., Barrett, B., Frederick, J., Potter, D., Behr, B., Rabinowitz, M., 2010. Preclinical validation of a microarray Method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/dep452>
- Kaiser, P., 1984. Pericentric inversions - Problems and significance for clinical genetics. *Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1007/BF00293869>
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D., 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* (80-). 258, 818–821. <https://doi.org/10.1126/science.1359641>
- Kane, S.C., Willats, E., Bezerra Maia E Holanda Moura, S., Hyett, J., Da Silva Costa, F., 2016. Pre-Implantation Genetic Screening Techniques: Implications for Clinical Prenatal Diagnosis. *Fetal Diagn. Ther.* <https://doi.org/10.1159/000449381>
- Kim, J.W., Lee, W.S., Yoon, T.K., Seok, H.H., Cho, J.H., Kim, Y.S., Lyu, S.W., Shim, S.H., 2010. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC Med. Genet.* 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-153>
- Kleczkowska, A., Fryns, J.P., Van den Berghe, H., 1987. Pericentric inversions in man: personal experience and review of the literature. *Hum. Genet.* 75, 333–338. <https://doi.org/10.1007/BF00284103>
- Knapp, M., Stiller, M., Meyer, M., 2012. Generating barcoded libraries for multiplex high-throughput sequencing. *Methods Mol. Biol.* 840, 155–170. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-516-9_19
- Kokkali, G., Vrettou, C., Traeger-Synodinos, J., Jones, G.M., Cram, D.S., Stavrou, D., Trounson, A.O., Kanavakis, E., Pantos, K., 2005. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from

- blastocysts for PGD of β -thalassaemia major: Case report. *Hum. Reprod.* 20, 1855–1859. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh893>
- Konstantinidis, M., Prates, R., Goodall, N.N., Fischer, J., Tecson, V., Lemma, T., Chu, B., Jordan, A., Armenti, E., Wells, D., Munné, S., 2015. Live births following Karyomapping of human blastocysts: Experience from clinical application of the method. *Reprod. Biomed. Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.05.018>
- Kuliev, A., Cieslak, J., Ilkevitch, Y., Verlinsky, Y., 2003. Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod. Biomed. Online* 6, 54–59. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62055-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62055-X)
- Kung, A., Munné, S., Bankowski, B., Coates, A., Wells, D., 2015. Validation of next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos. *Reprod. Biomed. Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.09.002>
- Kupka, M.S., Ferraretti, A.P., de Mouzon, J., Erb, K., D’Hooghe, T., Castilla, J.A., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., Goossens, V., European Ivf-Monitoring Consortium, for the E.S. of H.R., Embryology, 2014. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod* 29, 2099–2113. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu175>
- Kushnir, V.A., Darmon, S.K., Barad, D.H., Gleicher, N., 2018. Degree of mosaicism in trophectoderm does not predict pregnancy potential: A corrected analysis of pregnancy outcomes following transfer of mosaic embryos. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0322-5>
- Le Caignec, C., Spits, C., Sermon, K., De Rycke, M., Thienpont, B., Debrock, S., Staessen, C., Moreau, Y., Fryns, J.P., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., Vermeesch, J.R., 2006. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkl336>
- Li, G., Jin, H., Xin, Z., Su, Y., Brezina, P.R., Benner, A.T., Kearns, W.G., Sun, Y., 2014. Increased IVF pregnancy rates after microarray preimplantation genetic diagnosis due to parental translocations. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60, 119–124. <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.875241>
- Li, H., Gyllenstein, U.B., Cui, X., Saiki, R.K., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1988. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335, 414–417. <https://doi.org/10.1038/335414a0>
- Li, T.C., Makris, M., Tomsu, M., Tuckerman, E., Laird, S., 2002. Recurrent miscarriage: Aetiology, management and prognosis. *Hum. Reprod. Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.5.463>
- Lissens, W., Sermon, K., 1997. Preimplantation genetic diagnosis: current status and new developments. *Hum. Reprod.* 12, 1756–61.
- Lledó, B., Ortiz, J.A., Morales, R., Ten, J., De La Fuente, P.E., García-Ochoa, C., Bernabeu, R., 2010. The paternal effect of chromosome translocation carriers observed from meiotic segregation in embryos. *Hum. Reprod.* 25, 1843–1848. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq111>
- Lledó, B., Ten, J., Rodríguez-Arnedo, D., Llácer, J., Bernabeu, R., 2008. Preimplantation genetic diagnosis of X-linked retinoschisis. *Reprod. Biomed. Online* 16, 886–892. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60157-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60157-5)
- Łukaszuk, K., Pukszta, S., Wells, D., Cybulska, C., Liss, J., Płóciennik, Ł., Kuczyński, W., Zabielska, J., 2015. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* 103, 1031–1036. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.123>
- Macklon, N.S., Geraedts, J.P.M., Fauser, B.C.J.M., 2002. Conception to ongoing pregnancy: The “black box” of early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update* 8, 333–343. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.4.333>

- Magli, M.C., Crippa, A., Muzii, L., Boudjema, E., Capoti, A., Scaravelli, G., Ferraretti, A.P., Gianaroli, L., 2012. Head birefringence properties are associated with acrosome reaction, sperm motility and morphology. *Reprod. Biomed. Online* 24, 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.12.013>
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A., Farfalli, V., 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* 87, 534–541. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1512>
- Malpani, A., Malpani, A., 2002. Preimplantation genetic diagnosis for gender selection for family balancing: a view from India. *Reprod. Biomed. Online.* [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61904-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61904-9)
- Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J.C., Verhoeve, H.R., Vogel, N.E.A., Arts, E.G.J.M., de Vries, J.W.A., Bossuyt, P.M., Buys, C.H.C.M., Heineman, M.J., Repping, S., van der Veen, F., 2007. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N. Engl. J. Med.* 357, 9–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067744>
- Mau-Holzmann, U.A., 2005. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 111, 317–336. <https://doi.org/86906> [pii]\r10.1159/000086906
- Maxwell, S.M., Colls, P., Hodes-Wertz, B., McCulloh, D.H., McCaffrey, C., Wells, D., Munné, S., Grifo, J.A., 2016. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertil. Steril.* 106, 1414–1419.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.017>
- McArthur, S.J., Leigh, D., Marshall, J.T., De Boer, K.A., Jansen, R.P.S., 2005. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil. Steril.* <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.05.063>
- McKinlay Gardner, R.J., Sutherland, G.R., 1996. Chromosome abnormalities and genetic counseling. *Oxford Monogr. Med. Genet.* 29.
- Meldrum, D.R., 1993. Female reproductive aging—ovarian and uterine factors. *Fertil. Steril.* 59, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55608-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55608-8)
- Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K., Kardon, N.B., 2005. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genet. Med.* 7, 251–263. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000160075.96707.04>
- Meza-Espinoza, J.P., Ortiz Anguiano, L., Rivera, H., 2008. Chromosomal abnormalities in couples with reproductive disorders. *Gynecol. Obstet. Invest.* 66, 237–240. <https://doi.org/10.1159/000147170>
- Mir, P., Rodrigo, L., Mateu, E., Peinado, V., Milán, M., Mercader, A., Buendía, P., Delgado, A., Pellicer, A., Remohí, J., Rubio, C., 2010. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum. Reprod.* 25, 1812–1817. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq122>
- Moutou, C., Goossens, V., Coonen, E., De Rycke, M., Kokkali, G., Renwick, P., SenGupta, S.B., Vesela, K., Traeger-Synodinos, J., 2014. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Hum. Reprod.* 29, 880–903.
- Munné, S., 2012. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Curr. Genomics* 13, 463–70. <https://doi.org/10.2174/138920212802510457>
- Munné, S., 2005. Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes. *Cytogenet. Genome Res.* <https://doi.org/10.1159/000086904>
- Munné, S., Bahçe, M., Schimmel, T., Sadowy, S., Cohen, J., 1998a. Case report: Chromatid exchange

- and predivision of chromatids as other sources of abnormal oocytes detected by preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Prenat. Diagn.* 18, 1450–1458. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(199812\)18:13<1450::AID-PD509>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(199812)18:13<1450::AID-PD509>3.0.CO;2-Q)
- Munné, S., Blazek, J., Large, M., Martinez-Ortiz, P.A., Nisson, H., Liu, E., Tarozzi, N., Borini, A., Becker, A., Zhang, J., Maxwell, S., Grifo, J., Babariya, D., Wells, D., Fragouli, E., 2017. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil. Steril.* 108, 62–71.e8. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.002>
- Munné, S., Chen, S., Fischer, J., Colls, P., Zheng, X., Stevens, J., Escudero, T., Oter, M., Schoolcraft, B., Simpson, J.L., Cohen, J., 2005. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil. Steril.* 84, 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.027>
- Munné, S., Cohen, J., 1998. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod. Update* 4, 842–55. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.6.842>
- Munné, S., Fischer, J., Warner, A., Chen, S., Zouves, C., Cohen, J., 2006. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: A multicenter study. *Fertil. Steril.* 85, 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.10.014>
- Munné, S., Márquez, C., Magli, C., Morton, P., Morrison, L., 1998b. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 863–870. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.9.863>
- Munné, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Fung, J., Gianaroli, L., Cohen, J., 2000. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil. Steril.* 73, 1209–1218. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00495-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00495-7)
- Munné, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Márquez, C., Cohen, J., 2002. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: Evidence of a maternal age effect. *Reprod. Biomed. Online* 4, 223–232. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61810-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61810-X)
- Munné, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Velilla, E., Walmsley, R., Sadowy, S., Cohen, J., Sable, D., 2003. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod. Biomed. Online* 7, 91–97. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61735-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61735-X)
- Munné, S., Weier, H.U., Grifo, J., Cohen, J., 1994. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol. Reprod.* 51, 373–379. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.373>
- Munné, S., Wells, D., 2017. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil. Steril.* <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.024>
- Natesan, S.A., Bladon, A.J., Coskun, S., Qubbaj, W., Prates, R., Munne, S., Coonen, E., Dreesen, J.C.F.M., Stevens, S.J.C., Paulussen, A.D.C., Stock-Myer, S.E., Wilton, L.J., Jaroudi, S., Wells, D., Brown, A.P.C., Handyside, A.H., 2014. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet. Med.* <https://doi.org/10.1038/gim.2014.45>
- Nicolaidis, P., Petersen, M.B., 1998. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/13.2.313>
- Nielsen, J., 1975. Chromosome examination of newborn children: purpose and ethical aspects. *Humangenetik* 26, 215–22.
- Nielsen, J., Wohlert, M., 1991. Chromosome abnormalities found among 34910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Ørhus, Denmark. *Hum. Genet.* 87, 81–83. <https://doi.org/10.1007/BF01213097>
- Norwitz, E.R., Schust, D.J., Fisher, S.J., 2001. Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *N.*

Engl. J. Med. 345, 1400–1408. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000763>

- Obradors, A., Fernández, E., Oliver-Bonet, M., Rius, M., De La Fuente, A., Wells, D., Benet, J., Navarro, J., 2008. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: Case Report. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/den201>
- Ogilvie, C.M., Braude, P., Scriven, P.N., 2001. Successful pregnancy outcomes after preimplantation genetic diagnosis (PGD) for carriers of chromosome translocations. *Hum. Fertil.* <https://doi.org/10.1080/1464727012000199252>
- Ogilvie, C.M., Scriven, P.N., 2002. Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 801–806. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200895>
- Paternot, G., Debrock, S., D’Hooghe, T.M., Spiessens, C., 2010. Early embryo development in a sequential versus single medium: A randomized study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-83>
- Peciña, A., Lozano Arana, M.D., García-Lozano, J.C., Borrego, S., Antiñolo, G., 2010. One-step multiplex polymerase chain reaction for preimplantation genetic diagnosis of Huntington disease. *Fertil. Steril.* 93, 2411–2412. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.120>
- Pehlivan, T., Rubio, C., Rodrigo, L., Romero, J., Remohi, J., Simón, C., Pellicer, A., 2003. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod. Biomed. Online* 6, 232–237. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61715-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61715-4)
- Pellestor, F., Anahory, T., Hamamah, S., 2005. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet. Genome Res.* <https://doi.org/10.1159/000086891>
- Pellestor, F., Andréo, B., Arnal, F., Humeau, C., Demaille, J., 2003. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum. Genet.* 112, 195–203. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0852-x>
- Peters, B.A., Kermani, B.G., Alferov, O., Agarwal, M.R., McElwain, M.A., Gulbahce, N., Hayden, D.M., Tang, Y.T., Zhang, R.Y., Tearle, R., Crain, B., Prates, R., Berkeley, A., Munné, S., Drmanac, R., 2015. Detection and phasing of single base de novo mutations in biopsies from human in vitro fertilized embryos by advanced whole-genome sequencing. *Genome Res.* 25, 426–434. <https://doi.org/10.1101/gr.181255.114>
- Pgd, E., Steering, C., 2002. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum. Reprod.* 17, 233–246. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.233>
- Pickering, S.J., Mcconnell, J.M., Johnson, M.H., Braude, P.R., 1994. Use of a polymorphic dinucleotide repeat sequence to detect non-blastomeric contamination of the polymerase chain reaction in biopsy samples for preimplantation diagnosis. *Hum. Reprod.* 9, 1539–1545. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138745>
- Rabinowitz, M., Ryan, A., Gemelos, G., Hill, M., Baner, J., Cinnioglu, C., Banjevic, M., Potter, D., Petrov, D.A., Demko, Z., 2012. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil. Steril.* 97, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.11.034>
- Rauch, A., Rüschemdorf, F., Huang, J., Trautmann, U., Becker, C., Thiel, C., Jones, K.W., Reis, A., Nürnberg, P., 2004. Molecular karyotyping using an SNP array for genomewide genotyping. *J. Med. Genet.* <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.022855>
- Ray, P.F., Ao, A., Taylor, D.M., Winston And, R.M.L., Handyside, A.H., 1998. Assessment of the reliability of single blastomere analysis for preimplantation diagnosis of the $\Delta F508$ deletion causing cystic fibrosis in clinical practice. *Prenat. Diagn.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(199812\)18:13<1402::AID-PD500>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(199812)18:13<1402::AID-PD500>3.0.CO;2-T)
- Raziel, A., Friedler, S., Schachter, M., Kasterstein, E., Strassburger, D., Ron-El, R., 2002. Increased

- frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 78, 515–519. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03298-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03298-3)
- Rechitsky, S., Kuliev, A., Tur-Kaspa, I., Morris, R., Verlinsky, Y., 2004. Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. *Reprod. Biomed. Online.* [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62132-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62132-3)
- Renwick, P., Trussler, J., Lashwood, A., Braude, P., Ogilvie, C.M., 2010. Preimplantation genetic haplotyping: 127 diagnostic cycles demonstrating a robust, efficient alternative to direct mutation testing on single cells. *Reprod. Biomed. Online.* <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.01.006>
- Renwick, P.J., Trussler, J., Ostad-Saffari, E., Fassihi, H., Black, C., Braude, P., Ogilvie, C.M., Abbs, S., 2006. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping - A paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod. Biomed. Online* 13, 110–119. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62024-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62024-X)
- Rius, M., Daina, G., Obradors, A., Ramos, L., Velilla, E., Fernández, S., Martínez-Passarell, O., Benet, J., Navarro, J., 2011. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil. Steril.* 95, 413–416. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1051>
- Rius, M., Obradors, A., Daina, G., Cuzzi, J., Marqus, L., Calderón, G., Velilla, E., Martínez-Passarell, O., Oliver-Bonet, M., Benet, J., Navarro, J., 2010. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: First clinical application. *Hum. Reprod.* 25, 1824–1835. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq118>
- Robberecht, C., Vanneste, E., Pexsters, A., D'Hooghe, T., Voet, T., Vermeesch, J.R., 2010. Somatic genomic variations in early human prenatal development. *Curr. Genomics* 11, 397–401. <https://doi.org/10.2174/138920210793175967>
- Rodrigo, L., Mateu, E., Mercader, A., Cobo, A.C., Peinado, V., Milán, M., Al-Asmar, N., Campos-Galindo, I., García-Herrero, S., Mir, P., Simón, C., Rubio, C., 2014. New tools for embryo selection: Comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/517125>
- Rubio, C., Rodrigo, L., Pérez-Cano, I., Mercader, A., Mateu, E., Buendía, P., Remohí, J., Simón, C., Pellicer, A., 2005. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod. Biomed. Online* 11, 497–506. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61146-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61146-7)
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
- Saito, H., Ishida, G.M., Kaneko, T., Kawachiya, S., Ohta, N., Takahashi, T., Saito, T., Hiroi, M., 2000. Application of vitrification to human embryo freezing. *Gynecol. Obstet. Invest.* 49, 145–149.
- Sánchez-Castro, M., Jiménez-Macedo, A.R., Sandalinas, M., Blanco, J., 2009. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD. *Hum. Reprod.* 24, 1516–1521. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep037>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sauer, M. V., Paulson, R.J., Lobo, R. a, 1996. Oocyte donation to women of advanced reproductive age: pregnancy results and obstetrical outcomes in patients 45 years and older. *Hum. Reprod.* 11, 2540–3. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019155>
- Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., Stevens, J., Rawlins, M., Munne, S., 2009. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective

- trial. *Fertil. Steril.* 92, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.029>
- Scott, R.T., Upham, K.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Scott, K.L., Taylor, D., Tao, X., Treff, N.R., 2013a. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* 100, 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.035>
- Scott, R.T., Upham, K.M., Forman, E.J., Zhao, T., Treff, N.R., 2013b. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: A randomized and paired clinical trial. *Fertil. Steril.* 100, 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.039>
- Scriven, P.N., 2001. Robertsonian translocations--reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/16.11.2267>
- Scriven, P.N., Flinter, F.A., Khalaf, Y., Lashwood, A., Mackie Ogilvie, C., 2013. Benefits and drawbacks of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for reciprocal translocations: Lessons from a prospective cohort study. *Eur. J. Hum. Genet.* 21, 1035–1041. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.9>
- Scriven, P.N., Handyside, A.H., Mackie Ogilvie, C., 1998. Chromosome translocations: Segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 18, 1437–1449. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(199812\)18:13<1437::AID-PD497>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(199812)18:13<1437::AID-PD497>3.0.CO;2-P)
- Sermon, K., Goossens, V., Seneca, S., Lissens, W., De Vos, A., Vandervorst, M., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 1998. Preimplantation diagnosis for Huntington's disease (HD): Clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat. Diagn.* 18, 1427–1436. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0223\(199812\)18:13<1427::AID-PD493>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0223(199812)18:13<1427::AID-PD493>3.0.CO;2-3)
- Sermon, K., Lissens, W., Joris, H., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 1996. Adaptation of the primer extension preamplification (PEP) reaction for preimplantation diagnosis: Single blastomere analysis using short PEP protocols. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/molehr/2.3.209>
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Sher, G., Keskinetepe, L., Keskinetepe, M., Ginsburg, M., Maassarani, G., Yakut, T., Baltaci, V., Kotze, D., Unsal, E., 2007. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil. Steril.* 87, 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.108>
- Soler, A., Morales, C., Mademont-Soler, I., Margarit, E., Borrell, A., Borobio, V., Munõz, M., Sánchez, A., 2017. Overview of Chromosome Abnormalities in First Trimester Miscarriages: A Series of 1,011 Consecutive Chorionic Villi Sample Karyotypes. *Cytogenet. Genome Res.* <https://doi.org/10.1159/000477707>
- Spandorfer, S.D., Davis, O.K., Barmat, L.I., Chung, P.H., Rosenwaks, Z., 2004. Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 81, 1265–1269. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.09.057>
- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., Sermon, K., 2006. Optimization and evaluation of single-cell whole, genome multiple displacement amplification. *Hum. Mutat.* 27, 496–503. <https://doi.org/10.1002/humu.20324>
- Spits, C., Sermon, K., 2009. PGD for monogenic disorders: Aspects of molecular biology, in: *Prenatal Diagnosis*. pp. 50–56. <https://doi.org/10.1002/pd.2161>
- Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I., van Steirteghem, A., 2004. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: A prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 19, 2849–2858.

<https://doi.org/10.1093/humrep/deh536>

- Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P.L., Scaruffi, P., 2013. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum. Reprod.* 28, 2652–2660. <https://doi.org/10.1093/humrep/det314>
- Stouffs, K., Seneca, S., Lissens, W., 2014. Genetic causes of male infertility. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 75, 109–111. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2014.03.004>
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Katano, K., Suzumori, N., Kitaori, T., Mizutani, E., 2012. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 27, 2297–2303. <https://doi.org/10.1093/humrep/des179>
- Sutherland, G.R., Gardiner, A.J., Carter, R.F., 1976. Familial pericentric inversion of chromosome 19, inv(19) (p13q13) with a note on genetic counseling of pericentric inversion carriers. *Clin. Genet.* 10, 54–59. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1976.tb00009.x>
- Tachibana, M., Kuno, T., Yaegashi, N., 2018. Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos. *Reprod. Med. Biol.* <https://doi.org/10.1002/rmb2.12230>
- Tan, Y., Yin, X., Zhang, S., Jiang, H., Tan, K., Li, J., Xiong, B., Gong, F., Zhang, C., Pan, X., Chen, F., Chen, S., Gong, C., Lu, C., Luo, K., Gu, Y., Zhang, X., Wang, W., Xu, X., Vajta, G., Bolund, L., Yang, H., Lu, G., Du, Y., Lin, G., 2014. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *Gigascience* 3. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-3-30>
- Tan, Y.Q., Tan, K., Zhang, S.P., Gong, F., Cheng, D.H., Xiong, B., Lu, C.F., Tang, X.C., Luo, K.L., Lin, G., Lu, G.X., 2013. Single-nucleotide polymorphism microarray-based preimplantation genetic diagnosis is likely to improve the clinical outcome for translocation carriers. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/det271>
- Tarin, J.J., Handyside, A.H., 1993. Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil. Steril.* 59, 943–952. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55908-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55908-1)
- Taylor, T.H., Gitlin, S.A., Patrick, J.L., Crain, J.L., Wilson, J.M., Griffin, D.K., 2014. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum. Reprod. Update* 20, 571–581. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu016>
- Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjöld, M., Ponder, B.A.J., Tunnacliffe, A., 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13, 718–725. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90147-K](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90147-K)
- Therman, E., Susman, B., Denniston, C., 1989. The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. *Ann. Hum. Genet.* 53, 49–65. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1989.tb01121.x>
- Thornhill, A.R., DeDie-Smulders, C.E., Geraedts, J.P., Harper, J.C., Harton, G.L., Lavery, S.A., Moutou, C., Robinson, M.D., Schmutzler, A.G., Scriven, P.N., Sermon, K.D., Wilton, L., 2005. ESHRE PGD Consortium “Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS).” *Hum. Reprod.* 20, 35–48. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh579>
- Tobler, K.J., Brezina, P.R., Benner, A.T., Du, L., Xu, X., Kearns, W.G., 2014. Two different microarray technologies for preimplantation genetic diagnosis and screening, due to reciprocal translocation imbalances, demonstrate equivalent euploidy and clinical pregnancy rates. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 843–850. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0230-3>
- Traversa, M. V., Carey, L., Leigh, D., 2010. A molecular strategy for routine preimplantation genetic diagnosis in both reciprocal and Robertsonian translocation carriers. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 329–337. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq013>
- Treff, N.R., Fedick, A., Tao, X., Devkota, B., Taylor, D., Scott, R.T., 2013. Evaluation of targeted next-

- generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil. Steril.* 99. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.018>
- Treff, N.R., Northrop, L.E., Kasabwala, K., Su, J., Levy, B., Scott, R.T., 2011a. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. *Fertil. Steril.* 95. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.004>
- Treff, N.R., Su, J., Tao, X., Northrop, L.E., Scott, R.T., 2011b. Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq103>
- Treff, N.R., Tao, X., Ferry, K.M., Su, J., Taylor, D., Scott, R.T., 2012. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil. Steril.* 97. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.115>
- Treff, N.R., Tao, X., Schillings, W.J., Bergh, P.A., Scott, R.T., Levy, B., 2011c. Use of single nucleotide polymorphism microarrays to distinguish between balanced and normal chromosomes in embryos from a translocation carrier. *Fertil. Steril.* 96. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.038>
- Tulay, P., 2017. Chromosomal Abnormalities in Preimplantation Embryos and Detection Strategies in PGD and PGS, in: *Chromosomal Abnormalities - A Hallmark Manifestation of Genomic Instability.* <https://doi.org/10.5772/67419>
- van Echten-Arends, J., Mastenbroek, S., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J.C., Heineman, M.J., van der Veen, F., Repping, S., 2011. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: A systematic review. *Hum. Reprod. Update.* <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr014>
- Van Hemel, J.O., Eussen, H.J., 2000. Interchromosomal insertions: Identification of five cases and a review. *Hum. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s004390000398>
- Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., Fryns, J.P., Verbeke, G., D'Hooghe, T., Moreau, Y., Vermeesch, J.R., 2009. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat. Med.* 15, 577–583. <https://doi.org/10.1038/nm.1924>
- Veeck, L.L., Nagy, Z.P., Agarwal, A., al., et, Venturoli, S., Flamigni, C., Ragni, G., 1999. An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology. *Reprod. Biomed. Online* 19, 126–140. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2010.11.004>
- Verlinsky, Y., Dozortsev, D., Evsikov, S., 1994. Visualization and cytogenetic analysis of second polar body chromosomes following its fusion with a one-cell mouse embryo. *J. Assist. Reprod. Genet.* 11, 123–131. <https://doi.org/10.1007/BF02332089>
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Schoolcraft, W., Kuliev, A., 2001. Preimplantation Diagnosis for Fanconi Anemia Combined with HLA Matching. *Jama* 285, 3130–3133. <https://doi.org/10.1001/jama.285.24.3130>
- Verlinsky, Y., Tur-Kaspa, I., Cieslak, J., Bernal, A., Morris, R., Taranissi, M., Kaplan, B., Kuliev, A., 2005. Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients. *Reprod Biomed Online* 11, 219–225. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60961-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60961-3)
- Voet, T., Kumar, P., Van Loo, P., Cooke, S.L., Marshall, J., Lin, M.L., Esteki, M.Z., Van Der Aa, N., Mateiu, L., McBride, D.J., Bignell, G.R., McLaren, S., Teague, J., Butler, A., Raine, K., Stebbings, L.A., Quail, M.A., D'Hooghe, T., Moreau, Y., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Vermeesch, J.R., Campbell, P.J., 2013. Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkt345>

- Voullaire, L., Slater, H., Williamson, R., Wilton, L., 2000. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum. Genet.* 106, 210–217. <https://doi.org/10.1007/s004390051030>
- Wells, D., Alfarawati, S., Fragouli, E., 2008. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: Microarrays and CGH. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/molehr/gan062>
- Wells, D., Delhanty, J.D., 2001. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 7, 23–30. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(00\)01867-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(00)01867-0)
- Wells, D., Delhanty, J.D., 2000. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 1055–1062. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.11.1055>
- Wells, D., Escudero, T., Levy, B., Hirschhorn, K., Delhanty, J.D.A., Munné, S., 2002. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil. Steril.* 78, 543–549. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03271-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03271-5)
- Wells, D., Kaur, K., Grifo, J., Glassner, M., Taylor, J.C., Fragouli, E., Munne, S., 2014. Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J. Med. Genet.* 51, 553–562. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102497>
- Wells, D., Sherlock, J.K., Handyside, A.H., Delhanty, J.D., 1999. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res.* 27, 1214–8. <https://doi.org/10.1093/nar/27.4.1214>
- Werlin, L., Rodi, I., DeCherney, A., Marelllo, E., Hill, D., Munné, S., 2003. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology [5]. *Fertil. Steril.* [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00605-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00605-8)
- Werner, M., Reh, A., Grifo, J., Perle, M.A., 2012. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 817–820. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9781-3>
- Wilton, L., Thornhill, A., Traeger-Synodinos, J., Sermon, K.D., Harper, J.C., 2009. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum. Reprod.* 24, 1221–1228. <https://doi.org/10.1093/humrep/den488>
- Wolf, D.P., Mitalipov, N., Mitalipov, S., 2015. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.001>
- Yan, L., Huang, L., Xu, L., Huang, J., Ma, F., Zhu, X., Tang, Y., Liu, M., Lian, Y., Liu, P., Li, R., Lu, S., Tang, F., Qiao, J., Xie, X.S., 2015. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15964–15969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523297113>
- Yang, Z., Lin, J., Zhang, J., Fong, W.I., Li, P., Zhao, R., Liu, X., Podevin, W., Kuang, Y., Liu, J., 2015. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: A pilot study. *BMC Med. Genomics.* <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0110-4>
- Yin, X., Tan, K., Vajta, G., Jiang, H., Tan, Y., Zhang, C.C.C., Chen, F., Chen, S., Zhang, C.C.C., Pan, X., Gong, C., Li, X., Lin, C., Gao, Y., Liang, Y., Yi, X., Mu, F., Zhao, L., Peng, H., Xiong, B., Zhang, S., Cheng, D., Lu, G., Zhang, X., Lin, G., Wang, W., 2013. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biol. Reprod.* 88, 69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106211>
- Yokota, Y., Sato, S., Yokota, M., Ishikawa, Y., Makita, M., Asada, T., Araki, Y., 2000. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum. Reprod.*

<https://doi.org/10.1093/humrep/15.8.1802>

- Yokota, Y., Sato, S., Yokota, M., Yokota, H., Araki, Y., 2001. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil. Steril.* [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)01685-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01685-5)
- Zhang, C., Zhang, C., Chen, S., Yin, X., Pan, X., Lin, G., Tan, Y., Tan, K., Xu, Z., Hu, P., Li, X., Chen, F., Xu, X., Li, Y., Zhang, X., Jiang, H., Wang, W., 2013. A Single Cell Level Based Method for Copy Number Variation Analysis by Low Coverage Massively Parallel Sequencing. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054236>
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., Arnheim, N., 1992. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5847–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5847>
- Zheng, Y.-M., Wang, N., Li, L., Jin, F., 2011. Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1000196>
- Zinaman, M.J., Clegg, E.D., Brown, C.C., O'Connor, J., Selevan, S.G., 1996. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 65, 503–509. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)58144-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58144-8)

IX. Anexos

IX. ANEXOS

Consentimiento Informado

El/La Dr./Dra. especialista en
..... del centro
..... informa a:

D^a. (NOMBRE Y DOS APELLIDOS DE LA PACIENTE)

FECHA DE NACIMIENTO (EDAD)....., DNI Nº.....

Y DOMICILIO EN.....

D. (NOMBRE Y DOS APELLIDOS DEL PACIENTE)

FECHA DE NACIMIENTO (EDAD), DNI Nº.....

Y DOMICILIO EN.....

Hemos sido informados que por nuestros antecedentes personales o familiares existe riesgo de que podamos transmitir alguna enfermedad hereditaria o anomalía cromosómica a nuestra descendencia.

Con la finalidad de evitar en lo posible dicha transmisión, nos ha sido explicada la posibilidad de llevar a cabo, dentro de nuestro ciclo de fecundación in vitro (FIV), el estudio y diagnóstico de las alteraciones cromosómicas o genéticas de nuestros embriones.

Se nos ha informado sobre los procedimientos, pruebas diagnósticas que se pueden realizar, posibilidades de éxito, alternativas, limitaciones y riesgos.

La indicación médica del tratamiento viene determinada en nuestro caso por (marcar lo que proceda):

- Riesgo de aneuploidías o alteraciones en el número de cromosomas (PGT-A)
- Reorganizaciones cromosómicas estructurales (PGT-SR)
- Riesgo de transmisión de enfermedad hereditaria (indicar cuál) (PGT-M):
- Otra causa (indicar cuál):

1.-Objetivo

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT) tiene por objetivo la detección de anomalías cromosómicas o génicas en embriones, previa a su transferencia al útero de la mujer.

La técnica del PGT es el resultado de la combinación de:

- 1) la fecundación *in vitro*,
- 2) la biopsia de células embrionarias por medio de la micromanipulación,
- 3) las técnicas de diagnóstico genético

Su médico puede recomendarle el PGT si hay posibilidad de que sus embriones estén afectados de determinadas anomalías cromosómicas o génicas. Estas anomalías pueden:

- impedirla implantación de los embriones,
- provocar la pérdida del embarazo (abortos),
- dar lugar al nacimiento de un niño con problemas físicos y/o retraso mental,

- dar lugar al nacimiento de un niño afecto de una enfermedad hereditaria.

El PGT puede ayudar a prevenir estos resultados adversos identificando los embriones anormales/afectos durante su desarrollo en el laboratorio y antes de ser transferidos en un ciclo de FIV.

2.- Indicaciones

El PGT está indicado para la detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo posnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los pre-embryones no afectados para su transferencia.

Así mismo, el PGT está indicado en la detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del pre-embryón.

3.-Procedimiento

El proceso completo consta de seis fases diferentes, normalmente llevadas a cabo por diferentes especialistas y laboratorios.

3.1.-Fase previa: en esta fase se realiza un estudio de la historia clínica de la pareja, y, en determinadas ocasiones se recomienda realizar algunas otras pruebas diagnósticas previas al PGT. En algunos casos, es imprescindible realizar un estudio de Informatividad o un estudio pre-test previo al PGT con muestras biológicas de los progenitores y, en determinados casos, de otros familiares.

3.2.- Obtención de embriones: consiste en la obtención de los embriones mediante técnicas de Fecundación in Vitro (FIV). La Ley obliga a que se realice in vitro a pesar que, en algunos casos, la pareja no presente problemas de esterilidad. Esta fase se realiza en el centro de reproducción asistida (de ahora en adelante CRA).

3.3.-Biopsia celular: esta fase consiste en la extracción de una o varias células a través de un orificio practicado en la zona pelúcida. Esta parte del proceso es realizada por el CRA /Geniality (**táchese lo que no proceda**).

Este procedimiento se puede llevar a cabo en dos momentos del desarrollo embrionario:

- en día 3 de desarrollo embrionario: consiste en extraer un blastómero (una de las células que forman el embrión) a través de un orificio practicado en la zona pelúcida. Este procedimiento se lleva a cabo en el tercer día de desarrollo embrionario, cuando los embriones tienen entre 6-10 células. Durante el análisis del blastómero, el embrión se mantiene en cultivo en un incubador.

- en estadio de blastocisto: consiste en extraer una muestra del trofoectodermo cuando el embrión está en el quinto o sexto día de desarrollo embrionario. El embrión ha alcanzado el estadio de blastocisto y tiene aproximadamente unas 100 células. La biopsia se realiza en el trofoectodermo, que son las células que darán lugar a las estructuras extraembrionarias. Durante el análisis genético del tejido biopsiado, el blastocisto se mantiene en cultivo en un incubador o se criopreserva.

3.4.-Preparación celular: esta fase consiste en la introducción de la biopsia practicada dentro de un tubo, para su posterior análisis. Esta parte del proceso es realizada por el CRA / Geniality (**táchese lo que no proceda**).

3.5.- Análisis genético de la célula: la biopsia obtenida es procesada y sometida a estudio genético. Este análisis es realizado por Geniality. Existen diferentes tipos de análisis según la indicación del PGT.

3.6.-Transferencia embrionaria: el resultado del análisis genético es comunicado por Geniality al CRA. Los médicos del CRA, conjuntamente con la pareja consultante, deciden qué embriones van a ser transferidos en función de la constitución génica y/o cromosómica y las características de viabilidad embrionaria. Esta fase se realiza en el CRA.

Este consentimiento es para la tercera / cuarta / quinta fase (**táchese lo que no proceda**).

4.-Análisis genético

Las células biopsiadas se procesan mediante una técnica que permite una amplificación del ADN hasta producir una cantidad suficiente para ser analizado con las técnicas disponibles. El producto de amplificación puede seguir alguna de las siguientes vías en función del tipo de PGT:

- PGT mediante la técnica de NGS: permite valorar las anomalías cromosómicas numéricas y/o estructurales de la biopsia practicada. Se utiliza en embriones de parejas con un riesgo incrementado de tener embriones con un número de cromosomas anormal, así como en aquellas que son portadoras de anomalías cromosómicas numéricas o estructurales.
- PGT de enfermedades monogénicas (reacción en cadena de la polimerasa (PCR) clásica): permite determinar la presencia/ausencia de la alteración génica responsable de una enfermedad hereditaria. Se utiliza en embriones de parejas portadoras de enfermedades hereditarias.
- PGT mediante la técnica de Karyomapping: permite determinar la presencia/ausencia del/de los cromosoma/s a riesgo de presentar una alteración génica responsable de una enfermedad hereditaria o una reorganización cromosómica. También permite detectar, con la misma técnica, algunas anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidías) en las células analizadas.

El análisis de las células las destruye debido a que sus membranas se rompen para liberar el ADN y, por ello, no pueden utilizarse para otro fin, así como tampoco pueden ser devueltas al embrión.

5.-Limitaciones de la técnica

5.1.-PGT mediante NGS:

- Poliploidía: se da cuando los embriones presentan tres o más copias de su dotación cromosómica. Un 0.2% de los embriones poliploides pueden no ser detectados mediante NGS.
- Mosaicismo: es la co-existencia de varias líneas celulares con distinta dotación cromosómica dentro de un mismo embrión. Esto significa que podemos obtener un resultado normal para la muestra analizada, pero que otras células del embrión presenten anomalías. En biopsias en Día +3 no se detecta mosaicismo al analizarse una única célula del embrión. En biopsias de trofoectodermo, se detecta con fiabilidad utilizando la técnica de NGS (a partir de un 30% de células anormales). El mosaicismo es más frecuente en embriones de Día +3 que en el estadio de blastocisto. El grado de mosaicismo puede variar entre diferentes tejidos. El mosaicismo detectado en el trofoectodermo mediante el PGT puede no corresponderse con la masa celular interna.

La fiabilidad de la NGS es de aproximadamente el 98%.

Esta técnica puede disminuir considerablemente el riesgo de una pareja de tener un embarazo aneuploide y/o desequilibrado, pero no eliminarlo.

5.2.-PGT de Enfermedades Monogénicas:

El PGT realizado informará únicamente de la alteración que se está analizando, por lo que cualquier otra variante no sometida a análisis o de la que no hayamos sido informados, así como posibles alteraciones cromosómicas, no serán determinadas.

5.3.- PGT mediante Karyomapping:

El PGT realizado informará únicamente de la presencia del/de los cromosoma/s a riesgo de transmitir la alteración que se está analizando, por lo que cualquier otra mutación no sometida a análisis o de la que no hayamos sido informados, no serán determinadas. También se informará de las posibles alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploidías) encontradas. Sólo se pueden detectar mediante esta técnica algunas anomalías cromosómicas numéricas, por lo que la ausencia de anomalías no implica que el embrión sea euploide (para ello deberá combinarse con la técnica de NGS).

Se requiere el uso de la ICSI como método de fecundación en todos los casos de PGT para minimizar el riesgo de contaminación de la muestra. La ausencia de uso de esta metodología puede aumentar el riesgo de error.

6.-Riesgos

6.1.-Riesgo en la biopsia embrionaria

La biopsia del embrión no afectará el desarrollo del feto. Si un embrión es dañado durante el proceso de biopsia detendrá su crecimiento y no será apto para su transferencia. El riesgo de dañar el embrión durante la biopsia embrionaria es menor al 0.5%. La biopsia embrionaria en día+3 de desarrollo disminuye ligeramente la capacidad de implantación del embrión, pero la selección de embriones cromosómicamente normales mediante PGT puede compensar ampliamente cualquier efecto negativo de la biopsia embrionaria, así como también incrementar la posibilidad de que los embriones transferidos puedan implantar. Se ha descrito que la biopsia en estadio de blastocisto no afecta la viabilidad ni la capacidad de implantar del embrión.

6.2.-Riesgo en la preparación celular

Después de la biopsia embrionaria el blastómero o la biopsia de trofoectodermo se introduce en un pequeño tubo donde se llevará a cabo la amplificación de su ADN. Después de este proceso, las células ya no son viables y sólo pueden utilizarse para su análisis.

Algunas de las células en estudio pueden no dar lugar a resultado por problemas técnicos durante la preparación celular.

6.3.-Riesgo en el análisis

**Técnica de NGS:*

El riesgo de error clínico, es decir, la posibilidad de feto o niño afecto de una cromosomopatía tras PGT, es inferior al 0.5%. Este riesgo parece ser menor que cuando no se realiza PGT.

Algunos o todos los embriones en estudio pueden dar lugar a un no resultado, bien por la pérdida de la célula, bien por una baja calidad del ADN (sucede a menudo en células dañadas, apoptóticas o procedentes de embriones de baja calidad). Los embriones sin diagnóstico genético o con resultado no concluyente para alguno de los cromosomas pueden ser transferidos con pleno conocimiento y consentimiento de los pacientes, pero se perderán los posibles beneficios del PGT.

La utilización de la técnica NGS permite clasificar algunos embriones como mosaico. Únicamente ante la ausencia de embriones euploides para transferir, previo asesoramiento y tras la aceptación expresa de los pacientes, puede considerarse la transferencia de un embrión clasificado como mosaico, si bien se desconocen las implicaciones clínicas con los datos actuales. Se ha descrito que este tipo de embriones tienen menor potencial de implantación, mayor riesgo de aborto y pueden dar lugar a un recién nacido afecto de algún síndrome, pero también pueden dar lugar a embarazos evolutivos y recién nacidos sanos. En caso de consentir en la transferencia de un embrión mosaico, el diagnóstico prenatal mediante amniocentesis es imprescindible.

Puede ocurrir que el/los embriones normales no evolucionen en cultivo. También es posible que todos sus embriones sean cromosómicamente anormales. En estos casos no se realizará la transferencia embrionaria.

**Técnicas de PCR y Karyomapping:*

La precisión del PGT-M es $\geq 95\%$ en términos generales (varía en función de la técnica). Esto significa que puede ocurrir un error de diagnóstico. Este riesgo de error inferior al 5% incluye falsos positivos y falsos negativos. Además, alrededor de un 10% de los embriones analizados no se pueden diagnosticar debido a problemas técnicos o resultados inconcluyentes. En muchos casos esto es debido a fallos en la amplificación del ADN. No obstante, la posibilidad de conseguir un embarazo de un feto afecto tras PGT es menor que en una concepción natural.

Debido a la complejidad de las técnicas diagnósticas utilizadas, existe la posibilidad de no obtener diagnóstico genético en alguno o todos los embriones en estudio.

Los embriones sin diagnóstico genético concluyente o con diagnóstico de afecto serán considerados como embriones no viables desaconsejando su transferencia.

Puede ocurrir que el/los embriones no afectados no evolucionen en cultivo y no se disponga de embriones para ser transferidos.

Debido al riesgo de error de ambas técnicas, así como también a la presencia de otro tipo de anomalías en el embrión para las cuáles no se realiza el análisis, su embarazo ha de ser cuidadosamente monitorizado ecográficamente para controlar el crecimiento y desarrollo del feto. También se recomienda que en caso de embarazo se realice un diagnóstico prenatal. No existe garantía de que un niño nacido tras FIV-PGT sea normal.

Para ambas técnicas, los embriones no biopsiados y los no aptos para su transferencia se descartarán. En algunos casos, de forma aleatoria, serán descartados mediante re-análisis para control de calidad interno del test.

7.-Posibles beneficios

Los embriones aneuploides y/o desequilibrados y los afectados de enfermedades hereditarias son morfológicamente indistinguibles de los cromosómicamente normales o no afectados. Así pues, sin un diagnóstico genético, estos embriones pueden ser seleccionados para su transferencia por los embriólogos que llevan a cabo su ciclo de FIV en el Centro de Reproducción Asistida. Muchos de los embriones cromosómicamente anormales no llegan a implantar y si lo hacen son abortados espontáneamente poco después de la implantación. Si solamente se transfieren embriones cromosómicamente normales, seleccionados mediante un ciclo de FIV-PGT, tienen más posibilidades de implantar y llegar a término y se incrementa la probabilidad de concebir un niño sano.

El PGT de anomalías cromosómicas estructurales reduce la probabilidad de tener un aborto espontáneo debido a la presencia de una anomalía cromosómica estructural desequilibrada así como el nacimiento de un bebé afecto con una anomalía cromosómica estructural desequilibrada.

En el caso de parejas portadoras de enfermedades hereditarias, el beneficio del PGT es la disminución de la probabilidad de tener un hijo afecto de la enfermedad hereditaria de la que son portadores.

Someterse a un tratamiento de PGT no garantiza el nacimiento de un bebé normal.

El PGT no le causará ninguna molestia añadida a las que se experimentan durante un ciclo normal de FIV.

8.-Alternativas

Existen alternativas al ciclo de FIV-PGT como:

- Gestación natural seguida de diagnóstico prenatal.
- Utilización de gametos (ovocitos y/o semen) de donante
- Adopción legal

9.-Coste

El coste del PGT se ha de sumar al del ciclo de FIV. Consulte precios del coste actual del PGT a su Centro de Reproducción Asistida.

10.-Seguimiento

Le rogamos que en caso de embarazo nos haga llegar, o autorice para hacerlo al facultativo responsable de su ciclo de FIV-PGT, los resultados del diagnóstico prenatal (si se lo realiza) así como de los datos relacionados con el seguimiento de su embarazo y del parto. Esta información se mantendrá en estricta confidencialidad y solamente se utilizará para monitorizar los resultados del programa de PGT.

11.- Asesoramiento genético antes del PGT

Se recomienda reciba asesoramiento genético con un asesor o genetista clínico antes de iniciar su ciclo de FIV-PGT.

12.-Aspectos legales generales relacionados con la reproducción asistida y particulares sobre el diagnóstico y tratamiento preimplantacional

El marco jurídico regulador de la reproducción humana asistida está constituido básicamente por la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida.

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

También pueden utilizarse en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético, siempre que existan garantías diagnósticas y terapéuticas suficientes y sean debidamente autorizadas.

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

Por lo que se refiere al diagnóstico preimplantacional, la Ley en su Artículo 12 establece:

1. Los centros debidamente autorizados podrán practicar técnicas de diagnóstico preimplantacional para:

a) La detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo postnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los pre-embriones no afectos para su transferencia.

b) La detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del pre-embrión.

La aplicación de las técnicas de diagnóstico genético preimplantacional en estos casos deberá comunicarse a la autoridad sanitaria correspondiente, que informará de ella a la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

2. La aplicación de técnicas de diagnóstico genético preimplantacional para cualquiera otra finalidad no comprendida en el apartado anterior, o cuando se pretendan practicar en combinación con la determinación de los antígenos de histocompatibilidad de los pre-embriones in Vitro con fines terapéuticos para terceros, requerirá de la autorización expresa, caso a caso, de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, que deberá evaluar las características clínicas, terapéuticas y sociales de cada caso.

Además, en su Artículo 13 la Ley establece:

1. Cualquier intervención con fines terapéuticos sobre el pre-embrión vivo in vitro solo podrá tener la finalidad de tratar una enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas

2. La terapia que se realice en pre-embriones in Vitro sólo se autorizará si se cumplen los siguientes requisitos:

a) Que la pareja o, en su caso, la mujer sola haya sido debidamente informada sobre los procedimientos, pruebas diagnósticas, posibilidades y riesgos de la terapia propuesta y las haya aceptado previamente.

b) Que se trate de patologías con un diagnóstico preciso, de pronóstico grave o muy grave, y que ofrezcan posibilidades razonables de mejoría o curación.

c) Que no se modifiquen los caracteres hereditarios no patológicos ni se busque la selección de los individuos o la raza.

d) Que se realice en centros sanitarios autorizados y por equipos cualificados y dotados de los medios necesarios, conforme se determine mediante real decreto.

3. La realización de estas prácticas en cada caso requerirá de la autorización de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

Se considera infracción muy grave la selección del sexo o la manipulación genética con fines no terapéuticos o terapéuticos no autorizados (Artículo 26.2.c.10ª).

Finalmente, debe significarse la relevancia para esta técnica del Convenio de Oviedo sobre derechos humanos y biomedicina, de 1.997, que limita las pruebas predictivas de enfermedades genéticas a fines médicos o de investigación médica y con un asesoramiento genético apropiado.

Una vez leído, o nos ha sido leído, y comprendido este consentimiento quedamos informados de:

- 1) Que los procedimientos pueden ser cancelados en cualquier momento antes de su realización, bien por razones médicas, bien a petición de la interesada, siempre que no suponga daño alguno para los pacientes o los embriones viables producidos.
- 2) Que el PGT tiene beneficios y riesgos, algunos de los cuales son desconocidos actualmente.
- 3) Que es posible que no se obtenga resultado del PGT. Tendremos entonces la posibilidad de decidir si se realiza o no la transferencia de aquellos embriones de los que no se ha obtenido resultado alguno, pero entendemos que estos embriones tienen la misma posibilidad de ser aneuploides, desequilibrados o afectados de la enfermedad hereditaria como si fueran embriones no analizados. Entendemos también que el objetivo del PGT es mejorar nuestras posibilidades de obtener un embarazo libre de la anomalía genética para la cual se ha realizado, pero no ofrece una garantía absoluta de embarazo o de descendencia no afecta.
- 4) El coste económico del tratamiento.
- 5) Que el PGT no descarta la necesidad de realizar un diagnóstico prenatal clásico. La necesidad de este diagnóstico es la misma se realice o no el PGT. Entendemos que en caso de necesitar más información sobre el diagnóstico prenatal clásico podemos preguntar a nuestro obstetra o pedir un asesoramiento genético.
- 6) Que hemos comprendido las explicaciones que se nos han facilitado en lenguaje claro y sencillo, y que el facultativo que nos ha atendido nos ha permitido la oportunidad de preguntar sobre el procedimiento de PGT y el contenido de este consentimiento informado, así como aclarar todas las dudas que hayamos podido tener en relación al procedimiento del PGT. Que esta información se nos ha ofrecido con suficiente antelación para que hayamos podido reflexionar para decidir libremente.
- 7) La disposición del personal sanitario de este CRA así como de Geniality en caso que tengamos más preguntas sobre el PGT o deseamos ampliar cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente aclarado. Si así lo precisamos, podemos contactar con el personal de Geniality llamando al T: +34.911.266.963.
- 8) Comprendemos que en cualquier momento y sin dar ninguna explicación podemos revocar el consentimiento que ahora prestamos.

Autorización:

Autorizamos al personal de Geniality. a realizar las biopsias embrionarias y/o la preparación de éstas en nuestros embriones (**táchese lo que no proceda**).

Autorizamos al personal de Geniality a realizar el estudio genético propuesto de las biopsias embrionarias realizadas en nuestros embriones.

Sobre los embriones sin diagnóstico genético concluyente, que no sean evolutivos y que por tanto no vayan a ser analizados con posterioridad y los embriones con diagnóstico "patológico", considerados como embriones no viables, autorizo a que estos embriones, una vez anonimizados, puedan incluirse en posibles investigaciones sobre esta patología:

SI NO

Sobre el ADN sobrante de las células biopsiadas de los embriones incluidos en este programa de PGT, autorizo a que parte de este ADN, una vez anonimizado, pueda incluirse en posibles investigaciones sobre esta patología:

SI NO

Autorizamos al personal de Geniality la utilización de forma anónima de imágenes o datos obtenidos con finalidad de divulgación científica, comunicaciones, congresos y reuniones científicas, publicaciones y programas de difusión, etc:

SI NO

Autorizamos al personal de Geniality a acceder a datos de nuestra historia clínica relevantes para la realización del diagnóstico genético preimplantacional, datos del embarazo y seguimiento del parto.

Usted puede solicitar una copia de este consentimiento.

En _____ a _____ de _____ de _____

Fdo. El Facultativo informante

Fdo. La pareja

“APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO: en ejercicio de los derechos propios de los pacientes y para la revocación del presente consentimiento, queda a su disposición un escrito por medio del cual podrá ser ejercitado tal derecho en cualquier momento del procedimiento y del que quedará constancia en su historia clínica”.

POLÍTICA DE PRIVACIDAD

Conforme a la Ley 41/2002 Reguladora de la Autonomía del Paciente y a la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, el peticionario debe disponer del consentimiento del paciente para llevar a cabo las pruebas diagnósticas solicitadas y para el tratamiento de sus datos. De este modo, y como información a facilitar al paciente, hemos de comunicarles que los datos recogidos en el presente formulario serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley 15/1999, cuya titularidad corresponde a Geniality Diagnóstico Genético, S.L., con la finalidad de gestionar el estudio de diagnóstico en el formulario descrito, pudiendo ejercer el paciente en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, dirigiéndose a la siguiente dirección : Geniality Diagnóstico Genético SL, PTM-C/Faraday 7 28049 Madrid.