Estudio Genético Pre-implantatorio para aneuploidías (PGT-A): una revisión crítica actualizada

Cristian Álvarez Sedó

Director del Laboratorio de Embriología FERTILIA, Medicina Reproductiva. Yerba Buena, Tucumán.

Reproducción 2018;33:21-43

I.- Introducción

El éxito de la primera fecundación in vitro (FIV) realizada por Edwards y Steptoe (1978) es considerada un momento histórico en la reproducción humana asistida, a partir del cual se erigió un hito de esperanza para aquellas parejas/personas que buscan tener un hijo y no pueden conseguirlo de forma natural. En este sentido, la formación profesional, la introducción de tecnología, la criopreservación, los protocolos de estimulación, etc., significaron que luego de 40 años el principal objetivo de las unidades de fertilidad (centros de reproducción asistida) haya sido dirigir sus esfuerzos a aumentar las tasas de embarazo y por consiguiente las tasas de nacidos vivos. A pesar del evidente incremento de las tasas de embarazo y de nacidos vivos, la gestación múltiple, que afecta de manera significativa la salud de los fetos/RN y de las gestantes, es una de las principales desventajas de los tratamientos de reproducción asistida (TRA). Si bien es cierto que el esfuerzo para reducir la cantidad de embriones transferidos ha tenido un impacto saludable en la incidencia de los embarazos múltiples, este, lamentablemente, parece ser insuficiente (SART, 2014, 2015).

Actualmente los esfuerzos están abocados a la búsqueda de un marcador o marcadores de calidad embrionaria con el fin de realizar una mejor selección del embrión para su transferencia. Los métodos clásicos de selección de embriones basaban sus criterios en las tasas de división y de la morfología embrionaria (número de células, simetría, fragmentos, etc.), realizadas mediante observaciones periódicas del embrión. Muchos autores han considerado que, si bien es cierto que la morfología embrionaria es una herramienta útil y no invasiva, esta presenta limitaciones como la subjetividad del operador, además del hecho de no estar necesariamente relacionado con la naturaleza cromosómica del embrión. De esta manera, varios grupos han defendido los estudios genéticos preimplantatorios para aneuploidías (PGT-A) como un método eficaz para seleccionar "el embrión único ideal" para su transferencia. Sin embargo, cabe destacar que los que practican este tipo de procedimientos han publicado que siempre existe un riesgo de que los embriones teóricamente euploides (número de cromosomas normales) no siempre lleguen a

Correspondencia: *Cristian Álvarez Sedó*
Correo electrónico: cras21@gmail.com

implantarse (Harton y col. 2013). De hecho, las ventajas y las dificultades del PGT-A como método de selección de embriones han sido debatidas enérgicamente en varios artículos y congresos científicos. Sin embargo, hoy en día, el debate ya no parece centrarse en si la aneuploidía es perjudicial para el desarrollo embrionario, sino más bien en si los métodos actuales de PGT-A son capaces de determinar con precisión si un embrión es cromosómicamente normal, aneuploide o mosaico. El hecho de que la transferencia de embriones en mosaico haya resultado en embarazos viables suma a la complejidad del debate (Greco y col. 2015; Munné y col. 2017). Claramente, pensar en que el embrión y su naturaleza cromosómica es lo único indispensable para lograr una adecuada implantación no hace más que ahondar en el equívoco, ignorar el factor endometrial (receptividad del endometrio), así como otros factores, implica desconocer el importante rol de endometrio en la implantación; sin embargo, este tópico no es el que nos lleva a hacer esta revisión.

En este sentido, el presente artículo tiene como objetivo realizar una revisión crítica de lo publicado y debatido a la fecha respecto de los beneficios y desventajas de la elección de embriones mediante PGT-A desde diferentes puntos de vista: técnico, clínico, económico, biológico.

II.- PGT-A como método de selección embrionaria

II.A) Historia

En sus inicios el PGT-A fue duramente criticado, tanto desde un punto de vista clínico como técnico. De esta manera, los críticos del PGT-A mencionaban que los primeros trabajos publicados en la década de los 90 e inicios del 2000 eran considerados de bajo nivel de evidencia (reporte de casos, estudios de cohorte, estudios comparativos no aleatorizados) (Gianaroli y col. 1997; Munne y col. 1999, 2003; Kahraman y col. 2000). Años después, en 2014, Mastenbroek y Repping publicaron un análisis respecto de la efectividad del PGT-A, y además de manifestar la debilidad de los trabajos por sus diseños, criticaron el bajo número de pacientes, así como que el principal resultado clínico analizado fuera la tasa de implantación. Para estos autores, esta forma de medir la efectividad de la técnica resultaba insuficiente, ya que cuando se pretende evaluar la eficacia de los tratamientos en parejas infértiles, los resultados a evaluar deberían ser la tasa de embarazo en curso o idealmente la tasa de nacido vivo por ciclo iniciado y acumulado. Este valor sería de mucha importancia al momento de evaluar la real eficacia de la metodología, ya que entrarían en juego todas aquellas pacientes que iniciaron un tratamiento y no fueron susceptibles de tener un embrión euploide o, en su defecto, ni un embrión para biopsiar (Mastenbroek y col. 2005). Para profundizar esta crisis del entonces PGS, un trabajo prospectivo aleatorizado correctamente diseñado y publicado por Mastenbroek (Mastenbroek y col. 2007) no solo demostró que el PGT-A no era capaz de mejorar los resultados clínicos, sino que más bien las tasas de embarazo evolutivo fueron significativamente menores en comparación con pacientes de fecundación in vitro (FIV) sin PGT-A.

Posteriormente a esa publicación, las diferentes sociedades científicas de la especialidad (como ASRM-American Society of Reproductive Medicine, BFS-British Fertility Society, ACOG-American College of Obstetricians and Gynecologists) establecieron en sus respectivas guías, que el PGT-A no presentaba evidencia clínica suficiente para justificar su uso rutinario en los procedimientos de FIV (ASRM 2007, ACOG 2009). A partir de este momento, el PGT-A sufrió un duro golpe en su esencia y objetivo, y por lo tanto en su credibilidad; sin embargo, siempre hubo personas que persistieron en su ejecución. Años después, varios trabajos intentaron poner de manifiesto que los inconvenientes del PGT-A en su versión 1.0 fueron principalmente técnicos; tal es así, que algunos autores publicaron que el estadio de día 3 del desarrollo embrionario no era el adecuado para realizar el estudio. Esto se debía a que existía una limitación biológica al no poder estudiar más de una blastómera y el posible daño que se generaba en el embrión, y por consiguiente la detección del mosaicismo no era fácilmente realizable (Brown, 2014). Por otro lado, la técnica molecular empleada, como era el caso del FISH (Hibridación in situ fluorescente), presentaba una dificultad en

la propia técnica, sumado al limitado número de cromosomas a estudiar (Van Echten-Arends y col. 2011, Geraedts y Sermon, 2016). La posibilidad del cultivo prolongado hasta el estadio de blastocisto (día 5, 6 e incluso 7), la biopsia realizada con láser, y el avance de las técnicas moleculares (microarreglos, secuenciación de nueva generación, etc.) permitieron la aparición de la nueva versión del PGT-A: la versión 2.0.

Es importante finalizar esta primera parte señalando algunos aspectos a partir de los cuales los detractores del PGT-A (antes PGS) se basan para demostrar que este procedimiento aún no es sustentable y consistente para su realización en la práctica diaria de TRA. Es así, que Gleicher y Orvieto (2017) manifiestan que el PGT-A es un procedimiento que aún no justifica su ejecución, basados en: (i) La mayoría de los ciclos de fecundación in vitro (FIV) fracasan debido a los embriones aneuploides. (ii) La "eliminación" de estos embriones antes de su transferencia mejorarán los resultados de FIV. (iii) Una sola biopsia de trofoectodermo (BTE) en la etapa de blastocisto es representativa de todo el TE. (iv) La ploidía del TE representa de forma fiable al macizo celular interno (ICM). (v) La ploidía no cambia a partir de la etapa de blastocisto.

II.B) Aspectos técnicos de la biopsia

El PGT-A se refiere a la posibilidad de detectar aneuploidías cromosómicas, especialmente en pacientes con edad materna avanzada (EMA) o antecedentes de pérdida recurrente de embarazo (PRE), punto que trataremos más adelante cuando evaluemos los aspectos clínicos. Con los avances en el cultivo prolongado de embriones in vitro, las opciones para realizar la biopsia embrionaria han avanzado desde el cuerpo polar (PB), 1 a 2 blastómeras en la etapa de clivaje (día 3 del desarrollo), a varias células del TE en la etapa de blastocisto. Del mismo modo, como mencionamos anteriormente, los avances han sido significativos en las técnicas moleculares utilizadas para el análisis genético y cromosómico (a partir de pequeñas cantidades de ADN), incluida la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación in situ fluorescente (FISH), tecnologías de microarreglos (microarray), incluyendo los microarrays de polimorfismo de nucleótido único (SNP) y los microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) y por último la secuenciación de nueva generación (NGS).

II.B.1) Biopsia de cuerpo(s) polar(es)

Después del PGT-A 1.0, había quedado claro que la etapa de clivaje no era la etapa óptima para realizar la biopsia, especialmente porque se demostró que la biopsia en la etapa de clivaje era significativamente perjudicial para el potencial de implantación embrionaria, mientras que la biopsia en el estadio de blastocisto no parecía ser nociva (Scott y col. 2013). Una alternativa existente, pero no del todo bien estudiada, ha sido la biopsia del cuerpo polar (PB). Las opciones disponibles son biopsia solo del primer cuerpo polar (CPI), solo del segundo cuerpo polar (CPII) o la biopsia simultánea o secuencial de ambos CP (Magli y col. 2011). El uso clínico de la biopsia de cuerpo polar se informó por primera vez en 1990, cuando se demostró que no existían efectos adversos en las tasas de fecundación posteriores o en el desarrollo embrionario hasta la etapa de clivaje en día 3. El principal inconveniente del estudio cromosómico de los cuerpos polares es que solo permite la verificación de aneuploidías meióticas maternas, mientras que no permite identificar el error mitótico paterno o postzigótico. A menudo los cuerpos polares pueden estar fragmentados y esta situación puede dar lugar a errores (Geraedts y Sermon, 2016). Además, a veces la cantidad de ADN obtenido de cada cuerpo polar es tan pequeña, que puede estar sujeta a errores como el "allele drop-out" en la PCR. Por estas razones, la biopsia de CP no se usa de manera amplia.

II.B.2) Biopsia en estadio de clivaje (día 3)

La biopsia de una blastómera parece ser ventajosa en comparación con la biopsia de cuerpo polar, esto debido a que tanto la genética materna como la paterna pueden analizarse en el embrión. La biopsia en estadio de clivaje se realiza normalmente en el día 3 del desarrollo embrionario, con un embrión de al menos 6 blastómeras. La zona pelúcida puede ser aperturada mediante el uso de

ácido, láser o mecánicamente, y normalmente se utiliza un medio de cultivo libre de Ca++ y Mg++ con el fin de disminuir la adhesión célula-célula, y así facilitar que la blastómera seleccionada sea liberada (Cimadomo y col. 2016). Respecto del uso de este tipo medio de cultivo sin Ca++ ni Mg++, existen estudios controversiales en el modelo de ratón, en los cuales se observó que existiría una afectación a nivel de citoesqueleto. Por consiguiente, el impacto sobre la subsiguiente compactación embrionaria podría estar comprometida (Pey y col. 1998).

La biopsia de blastómera se realiza principalmente siguiendo 3 métodos para la apertura de la zona pelúcida: asistida por láser (Feichtinger y col. 1992), mecánica (Cohen y col. 1990), y la realizada por ácido Tyrodes (Cohen y col. 1991). Actualmente el uso del método asistido por láser representa el 75% de todos los procedimientos de biopsia declarados en Recopilación de datos del consorcio de ESHRE PGD XII (Moutou y col. 2014). Sin embargo, en manos entrenadas, aparentemente los tres los métodos no parecen tener impacto en los resultados clínicos aleatorizados y controlados publicados sobre embriones de la misma cohorte (Jones y col. 2006; Geber y col. 2011). En este sentido, la razón de la prevalencia del uso del láser como método de biopsia reside en la estandarización y reproducibilidad del método para realizar el agujero en la zona pelúcida, y que al mismo tiempo es menos dependiente del operador en comparación con el uso de ácido Tyrodes. Por otro lado, el uso del láser parece ser más preciso, la eclosión asistida por láser requiere menos tiempo y tal vez un período de entrenamiento más corto. El agujero creado por el uso de ácido Tyrodes depende de variables tales como la cantidad de solución depositada, el tiempo de exposición y las habilidades del operador; por el contrario, pocos disparos preestablecidos son suficientes de acuerdo al método asistido por láser.

Una vez realizada la biopsia, esta puede verse afectada por problemas asociados con el análisis de las células individuales desde el punto de vista técnico (por ejemplo, alta tasa de falla de amplificación) (Brodie y col. 2012) y biológico. En particular, el mosaicismo cromosómico (presencia de células con diferentes cariotipos dentro del mismo embrión) parece alcanzar su nivel más alto en esta etapa del desarrollo, el cual puede llegar a alcanzar un 60% en su máximo valor reportado (Munné y col. 1995; Wells y Delhanty, 2000). Sin embargo, esto no quiere decir que el "problema" del mosaicismo es esquivo para estadios más avanzados como el día 5 (blastocisto), punto que será tratado de manera especial más adelante. Para compensar la posibilidad del mosaicismo en día 3, fue propuesta la biopsia de dos blastómeros. Sin embargo, esta estrategia podría implicar una disminución significativa de la masa embrionaria (alrededor del 25%) y, a su vez, podría afectar los resultados clínicos debido al retraso del desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto, disminuyendo las tasas de implantación y embarazo (Cohen y col. 2007). Finalmente, en un estudio reciente, Scott (Scott y col. 2013) demostró que la biopsia en día 3 podría generar hasta un 39% de reducción en la tasa de implantación.

II.B.3) Biopsia de trofoectodermo (Blastocisto)

La estrategia de realizar la biopsia en el estadio de blastocisto fue un avance importante en la FIV moderna. Fue reportado por primera vez por De Boer (De Boer y col. 2004), y los primeros reportes de nacimientos luego de la BTE fueron reportados en el año 2005 (Kokkali y col. 2005; McArthur y col. 2005). Algunos estudios clínicos reconocieron prontamente su valor, por lo que en la actualidad el reemplazo gradual de la BTE fue relativamente rápido. La fortaleza de la BTE reside en su mayor robustez técnica y biológica. Esto implica una menor influencia de errores en el procedimiento y un menor impacto del mosaicismo (20-30%) en el análisis molecular. El hecho de obtener un blastocisto en cultivo y su consecuente transferencia, incrementa de manera significativa la tasa de nacidos vivos por transferencia en comparación con los embriones de día 2-3 (Glujovsky y col. 2016).

Para realizar la biopsia en el estadio de blastocisto, se requieren altos estándares de calidad en el cultivo y en el proceso de criopreservación, ya que esta última es una herramienta fundamental en los programas de PGT-A, dado que la mayoría de

unidades de fertilidad derivan las células a laboratorios de genética reproductiva para ser analizadas. En este sentido la vitrificación de blastocistos ha permitido: disminuir los procesos de degradación celular luego de la misma y que la tasa de sobrevida pueda llegar a alcanzar niveles de hasta el 95% (Cobo y col. 2012; Capalbo y col. 2015).

La biopsia en la etapa de blastocisto se caracteriza por realizarse en una población heterogénea de embriones en términos de morfología y tasa de desarrollo, y, por consiguiente, a la fecha, dos métodos diferentes para realizar la biopsia han sido publicados. El primer método ha sido descrito por McArthur (McArthur y col. 2005), e implica realizar el agujero en la zona pelúcida en el día 3 del desarrollo embrionario. Posteriormente, una consecuente eclosión no fisiológica en la etapa de blastocisto hace que el procedimiento de biopsia sea más fácil; sin embargo, puede ocurrir que el macizo celular interno (MCI) se localice en la apertura de la zona, lo cual dificulta la biopsia y en muchos casos la imposibilita. Una alternativa podría ser realizar el agujero en la zona pelúcida en día 4, ya que en este momento es potencialmente previsible la ubicación del MCI y por consiguiente evitar realizar el agujero cercanamente a ese punto; sin embargo, hay quienes piensan que retirar al embrión una vez más (día 4) no sería recomendable para el adecuado desarrollo del mismo. El segundo método fue descrito por Capalbo y sus colegas (Capalbo y col. 2014), e implica la apertura simultánea de la zona y la BTE. El embrión quedaría teóricamente en un cultivo inalterado hasta el día 5, día 6, o incluso el día 7, y posteriormente se hace una biopsia exclusivamente después de alcanzar expansión completa; sin embargo, el adelgazamiento de la zona pelúcida podría significar un reto técnico para los embriólogos, ya que se debe evitar dañar las células del TE. Finalmente, dos aspectos fundamentales respecto de la BTE: 1) ¿Porque podemos biopsiar el TE y extrapolarlo al MCI?. Esto habla de la concordancia cromosómica entre el MCI y el TE; en este sentido se ha publicado que existiría una alta correlación entre la ploidía entre ambos tipos celulares (Johnson y col. 2010). Sin embargo, estudios recientes sobre mosaicismo han revelado que esta correlación podría verse alterada y por consiguiente generar severas dudas respecto del PGT-A (Capalbo y col. 2014). 2) Otro punto importante a favor de la BTE tiene que ver con la baja tasa de no amplificación del ADN, esto producto de una mayor cantidad de células aisladas. Así, en laboratorios con buenos estándares de calidad (biopsia y biología molecular) este valor debería estar cercano al 1-3% (Capalbo y col. 2014). Esto favorecería la posibilidad de seguir adelante en los estudios moleculares mediante cualquiera de sus plataformas. En resumen, en la Tabla 1 podemos observar los aspectos más relevantes de la biopsia en cuerpo polar, embrión clivado y blastocisto.

II.C) Aspectos técnicos del análisis cromosómico molecular

En este apartado brindaremos información detallada sobre las plataformas moleculares existentes para el análisis cromosómico en el estudio de embriones humanos preimplantatorios.

II.C.1) Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)

Las trisomías autosómicas son el grupo de anomalías cromosómicas más comunes en abortos espontáneos en parejas con cariotipo normal (26,8%), seguidos de poliploidías (9,8%) y la monosomía X (8,6%) (Hassold y col. 1996). En estudios sobre abortos espontáneos, la trisomía en el cromosoma 16 ha sido la más frecuentemente encontrada, seguida por los cromosomas 15, 22, 21 (Stephenson y col. 2002). En este sentido, con el objetivo de disminuir el riesgo de trisomías en la descendencia, el FISH fue empleado para la detección de aneuploidías en los cromosomas X, Y, 13, 18, 21 (Munné y col. 1993). Asimismo a inicios de la década del 2000, los cromosomas 1, 15, 16, 17 y 22 también fueron incluidos en la plataforma (Munné y col. 2002). Finalmente, hasta 13 cromosomas fueron incluidos en tres rondas de hibridación (Munné y col. 2003). Al igual que en el cariotipo convencional, la tasa de detección del FISH se encuentra alrededor de 5Mb (Geraedts y Sermon, 2016).

Un desafío común que enfrentan muchas unidades de fertilidad es definir qué plataforma de

***Tabla 1.** Aspectos a favor y en contra sobre los diferentes momentos de biopsia para realizar el PGT-A.*

Biopsia/estadio	A favor	En contra
Cuerpo polar	Muy aceptada desde un punto de vista legal en aquellos países donde no se puede biopsiar células del propio embrión	Es necesario idealmente la biopsia de ambos cuerpos polares. Fragmentación de CP dificulta la técnica de biopsia. Disminución de la tasa de amplificación. Exclusión del análisis del ADN paterno.
Blastómera	Técnica muy estandarizada. Entrenamiento técnico rápido. Puede realizarse sin necesidad de láser.	Riesgo de no amplificación y una alta tasa de artefactos técnicos. Remoción de entre 12,5% y 25% de la masa embrionaria. Impacto negativo sobre el desarrollo embrionario. Impacto negativo sobre las tasas de implantación embrionaria. Mayor número de embriones a estudiar. Altos niveles de mosaicismo.
Trofoectodermo	Remoción de una baja proporción de células del total de blastocisto. Remoción de células del TE, no del MCI. Exacta, confiable y reproducible. No tiene impacto sobre la viabilidad embrionaria y la sobrevida post criopreservación.	Uso necesario del láser. Mosaicismo.

screening usarán para la realización del PGT-A. Hay ciertas tecnologías, como el FISH, que ya no son recomendables para su uso de acuerdo con la literatura médica actual. Esto probablemente se deba a que todas las plataformas de screening deberían ser capaces de detectar los 23 pares de cromosomas, a fin de aumentar significativamente la eficacia en la identificación de aneuploidías cromosómicas. En este sentido, la gran mayoría de empresas destinadas al screening genético preimplantatorio dejaron de lado el FISH como método estándar. A la limitada cantidad de cromosomas a estudiar, se sumó la dificultad técnica, cierto grado de subjetividad, y el tiempo invertido en el procesamiento, etcétera.

II.C.2) Microarreglos

La amplificación del genoma completo (de sus siglas en inglés –WGA–"Whole genome amplification"), se traduce a la amplificación de una a dos copias del genoma; esto es capaz de generar múltiples copias del ADN extraído de las células embrionarias en poco tiempo, por lo tanto resulta en "cantidad suficiente" de ADN para realizar el PGT-A (Spits y col. 2006). Dependiendo de la aplicación que se usará posteriormente, el ADN post-amplificado puede ser empleado en el análisis de los 23 pares de cromosomas mediante: hibridación genómica comparada en metafase (mCGH) (Wells y col. 1999); microarreglos de hibridación genómica comparada (aCGH) (Wells y col. 2008); microarreglos de polimorfismos de nucleótido único (aSNP) (Harper y Harton, 2010); detección basada en PCR (Treff y col. 2012); y la secuenciación de nueva generación (NGS) (Fiorentino y col. 2014; Kung y col. 2015).

Todos estos métodos se han utilizado para estudiar la aneuploidía completa o parcial para los 23 pares de cromosomas. El umbral de detección más bajo para las anomalías segmentarias es diferente para los distintos métodos, y por lo tanto el tamaño mínimo considerado para el PGT-A 2.0 puede variar ampliamente (Tabla 2). Además, con respecto al mosaicismo evaluado en muestras multicelulares, los diferentes métodos moleculares tienen diferentes niveles de detección. Esto es

Tabla 2. Límites de detección para anomalías segmentarias en el estudio del genoma humano.

Metodología	Límite de detección (Mb)
mCGH	5-20
aCGH (BAC)	5-10 (24 Sure – Illumina)
aSNP	3,5 (GeneChip 262K – Affymetrix)
PCR cuantitativa	Desconocido
NGS	5 (VeriSeq MiSeq – Illumina) 1 (HiSeq – Illumina)

importante ya que es una cuestión en debate si la aneuploidía en él TE es un fiel reflejo de las tasas de anomalías en el MCI (Capalbo y col. 2013).

La hibridación genómica comparada convencional (CGH) fue la primera de las metodologías de screening cromosómico completo (de sus siglas en inglés –CCS– "Comprehensive Chromosome Screening"), esta metodología involucra el aislamiento y etiquetado del ADN obtenido de una biopsia de blastómera mediante sondas fluorescentes y el mismo se compara con el ADN de un individuo con cariotipo normal. Tanto el ADN de prueba como el de referencia se hibridan a nivel de cromosoma metafásicos durante aproximadamente 3 a 5 días (Wilton y col. 2001). Esta metodología se denomina comúnmente mCGH (proviene de hacer la hibridación en el estado cromosómico de metafase). El índice de detección de esta metodología está alrededor de 5 a 20 Mb (dependiendo de la plataforma empleada). A pesar de tener un límite de detección similar al cariotipo convencional y el FISH, el punto a favor de la técnica es el poder explorar la totalidad de los cromosomas de la blastómera.

El mCGH convencional fue rápidamente reemplazado por microarreglos basados en CGH (aCGH), que implican la hibridación de ADN en un microarreglo que contiene aproximadamente 3000 a 4000 fragmentos de ADN humano, y la intensidad de ambas señales de hibridación se miden objetivamente mediante una formula logarítmica (log2Ratio) (Handyside, 2013). La tasa de detección del aCGH es de aproximadamente 5-10 Mb (Alfarawati y col. 2011) y permite la detección de aneuploidías cromosómicas completas y aneuploidías segmentarias mayores de 10 Mb (Geraedts y Sermon, 2016). Una limitación de aCGH es el límite universal utilizado para asignar el estado de aneuploidía, lo que podría conducir a falsos positivos (Capalbo y col. 2015). Según estos autores, el aCGH fue desarrollado para investigar la genética del cáncer, partiendo de grandes cantidades de ADN que hibridan en el microarreglo durante aproximadamente 72 horas, en comparación con las pequeñas cantidades disponibles de ADN para el PGT-A, y teniendo un corto tiempo de hibridación (4 a 12 horas). A pesar de esto, en esas circunstancias, la BTE con aCGH ha demostrado ser altamente sensible (98,8%) y específica (99,6%) para la detección de aneuploidías cromosómicas (Capalbo y col. 2015).

Los SNPs (Polimorfismo de nucleótido único) son pares de nucleótidos únicos (A, T, C, o G) en el ADN genómico. Estos son altamente variables dentro de una determinada especie. En el contexto del PGT-A, los SNP son generalmente evaluados en aquellos segmentos codificantes no exónicos del genoma. Los microarreglos de SNPs en el PGT-A típicamente evalúan aproximadamente 300.000 SNP en todo el genoma (Treff y col. 2010; Handyside, 2011). Los microarreglos de SNPs proporcionan un genotipo (AA, AB o BB) para cada muestra analizada y se comparan estos resultados con un genoma humano de referencia.

Estos microarreglos pueden identificar aneuploidías cromosómicas completas y también puede identificar aproximadamente 250 anomalías cromosomas estructurales comunes en todo el genoma. Sin embargo, tanto el aCGH como el aSNP tienen una limitante muy importante, el hecho de no poder detectar anomalías estructurales balanceadas. Asimismo, hay cientos de anomalías cromosómicas estructurales de novo que están por debajo del límite de resolución de los 300.000 SNP utilizados para el PGT-A, lo que podría desempeñar un papel significativo en las tasas de implantación, abortos involuntarios, o dar a luz a un bebé con un síndrome genético grave. Además, estos microarreglos de SNP poseen una capacidad

limitada para identificar triploidías, sin embargo, pueden identificar disomías uniparentales (DUP). Los microarreglos de SNP pueden identificar el mosaicismo si las células de TE biopsiadas y analizadas son suficientes. Una limitación del aSNP para PGT-A ha sido descrita por algunos laboratorios de referencia, la cual es la incapacidad de su algoritmo para identificar variantes de número de copias (aneuploidías) cuando el varón y la mujer están relacionados (consanguinidad). Por lo tanto, si existe consanguinidad en la pareja, ningún resultado de aneuploidía puede ser informado.

Las plataformas de aCGH pueden amplificar ADN y completar todo su análisis en 12-15 horas. Esto es un muy ventajoso sobre el aSNP, ya que este procedimiento toma aproximadamente de 30 a 40 h para completar el análisis. Como mencionamos anteriormente, tanto el aSNP como el aCGH, no pueden diferenciar entre 46, XX de 69, XXX o 46, XY de 69, XXY.

En general, cuando el aCGH fue utilizado para PGT-A por los laboratorios comerciales, estos sabían que solo era útil para identificar aneuploidías cromosómicas completas, ya que en teoría no fue diseñado o validado para identificar anomalías cromosómicas estructurales ni mosaicos. En este sentido, la plataforma 24Sure V3 (Illumina) fue diseñada para la detección de anomalías con ganancia o pérdidas cromosómicas completas; sin embargo, la plataforma 24Sure + (Illumina), al poseer una mayor densidad de fragmentos de ADN en el microarreglo, pudo ser empleada con éxito en la detección de anomalías cromosómicas estructurales, principalmente en translocaciones robertsonianas (Fiorentino y col. 2011). Respecto del mosaicismo, el aCGH ha demostrado tener una capacidad limitada para identificarlo dentro de una muestra de TE.

II.C.3) PCR cuantitativa o PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa de tipo cuantitativa (qPCR) se desarrolló como un método de PCR más rápido para identificar aneuploidías en los 24 cromosomas. Esta metodología fue validada para el análisis de las BTE (PGT-A) (Treff y col. 2012). En esta técnica, al igual que las anteriores, existe un primer paso de preamplificación, seguido por una PCR de tipo multiplex. Las ventajas de la qPCR incluyen un breve tiempo de análisis, el cual es de aproximadamente 4 horas, que permite, de ser necesario, la transferencia de embriones en el mismo ciclo de FIV. Los valores de corte para determinar aneuploidías mediante esta metodología son bastante específicos, lo que resulta en una alta precisión diagnóstica de 98,6% (Treff y col. 2012). Se ha demostrado que la tasa de error después de CCS por qPCR puede llegar a ser del 0,21% por cada embrión designado como euploide (Werner y col. 2014). La qPCR presenta limitaciones en relación con el pequeño número de muestras que se pueden estudiar simultáneamente. Asimismo, la qPCR tampoco puede detectar aneuploidías segmentarias/estructurales.

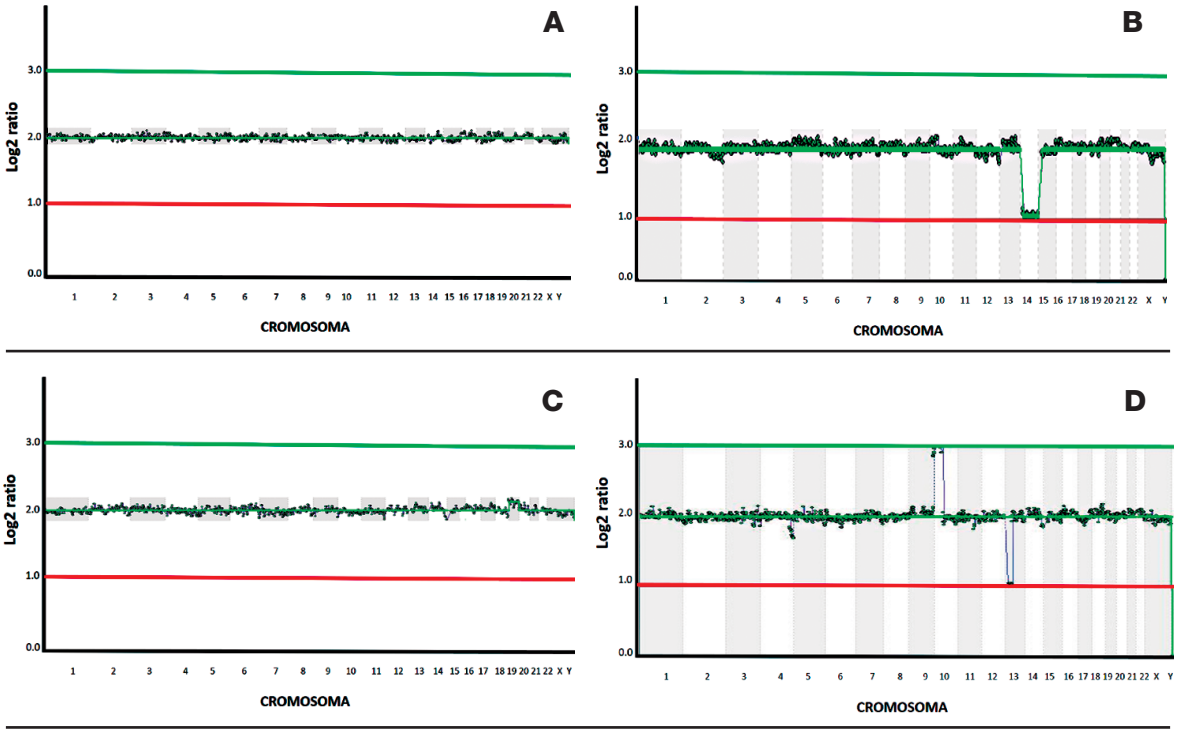
II.C.4) Secuenciación de nueva generación (NGS)

La secuenciación de nueva generación (NGS) es una tecnología que requiere previamente la amplificación del ADN a fin de optimizarla y reducir la introducción de artefactos durante el proceso de secuenciación. De persistir artefactos luego de la amplificación de ADN, estos pueden ser identificados y ser eliminados con ayuda del algoritmo bioinformático. En la actualidad, existen principalmente dos plataformas de NGS para PGT-A. Estas son la plataforma MiSeq de Illumina y la plataforma PGM de Thermo-Fisher Scientific. Después de la amplificación de ADN, aproximadamente 50 ng de cada muestra de ADN se digieren enzimáticamente en millones de fragmentos. Estos fragmentos son posteriormente preparados para ser parte de la biblioteca genómica. Después de la preparación de la biblioteca, un paso de PCR en emulsión se realiza en el caso del PGM, o un paso de PCR tipo puente en el caso del MiSeq. Al completar estos pasos, existen diferencias significativas en la secuenciación real de los fragmentos de ADN. En este sentido, para MiSeq, ocurre una secuenciación por síntesis. Es decir, la adición de nucleótidos genera cambios fluorescentes en los extremos de secuenciación y estos son detectados por cámaras de fotos. Posteriormente, un algoritmo traduce estos cambios lumínicos en la aparición secuencial de nucleótidos. En el caso del PGM, emplea la capacidad de detección de

los iones hidrógeno que son liberados cuando un nucleótido es agregado a la secuencia mediante la acción de la enzima ADN polimerasa durante la secuenciación. La liberación de protones causa un ligero cambio en el pH del medio de reacción, el cual es detectado por un sensor. Ambas plataformas (MiSeq y PGM) secuencian el genoma completo, sin embargo, la plataforma de Illumina es considerada como de mayor resolución (hr-NGS): en este sentido, la plataforma de Illumina puede llegar a producir 25 millones de lecturas por corrida (15GB de información), mientras que el PGM produce 4 millones de lecturas por corrida (2GB de información) (Buermans y Den Dunnen, 2014). Este aspecto es fundamental al momento de "hilar fino" cuando es importante establecer ganancias o pérdidas cromosómicas límites (ejemplo en el caso de mosaicismo, translocaciones, etc.) (Figura 1). Por otro lado, la plataforma PGM permite analizar hasta 60 muestras de ADN, mientras que la de MiSeq puede analizar hasta 22 muestras, diferencia que está inversamente relacionada con la capacidad de producir datos de secuenciación (Buermans y den Dunnen, 2014). Finalmente, ambas plataformas de NGS brindan información simultánea de la cantidad de número de copias de ADN mitocondrial, el cual ha sido propuesto como un marcador de selección de embrionaria dentro una población de blastocistos euploides con el objetivo de incrementar la tasa de implantación (Fragouli y col. 2015; Diez-Juan y col. 2015; Álvarez Sedo y col. 2017), sin embargo, esta aplicación se encuentra en revisión, ya que existen publicaciones que muestran lo contrario (Klimczak y col. 2018). La plataforma MiSeq puede identificar aneuploidías cromosómicas completas, mosaicismo (20-80%) y ADN mitocondrial, y también permite la detección de translocaciones cuando el desbalance es mayor a 10Mb (Fiorentino y col. 2014). Un trabajo donde se evaluó la tasa de error de las plataformas MiSeq y PGM encontró que esta fue del 0,8% y 1,7%, respectivamente (Quail y col. 2012).

El uso de NGS fue validado clínicamente en un estudio de PGT-A (doble ciego y prospectivo) en el cual se comparó el NGS vs. aCGH después

Figura 1. A) Perfiles de NGS donde se muestra un perfil de un embrión en D5 euploide (46XX), B) monosomía 14 (45XX), C) Trisomía mosaico 19 (22%), D) Translocación desbalanceada t (10:13) (46XX).



de una BTE (Fiorentino y col. 2014). En este estudio se hizo una comparación pareada para ambas técnicas, y los resultados revelaron una concordancia del 99,5% (intervalo de confianza del 95% [IC] 96,8- 99,9). Así también, en este estudio se evidenciaron altas tasas de embarazo clínico y de implantación (63,8% y 62,0%, respectivamente). Finalmente, en las Tabla 3 y 4, se resumen las fortalezas y debilidades de las técnicas moleculares empleadas en el PGT-A (adaptado de Brezina y col. 2016).

II.D) Mosaicismo

La adecuada transmisión de la información genética es vital para el desarrollo embrionario humano. La ocurrencia de una segregación cro-

***Tabla 3.** Cuadro comparativo (fortalezas y debilidades) de las metodologías moleculares empleadas para el desarrollo del PGT-A.*

	aSNP	aCGH	qPCR	NGS (MiSeq)	NGS (baja densidad)	NGS (PGM)
Aneuploidías completas	+	+	+	+	+	+
Mosaicismo	+	+/-	-	+	-	+
Triploidías	+/-	-	+	+	-	+
Grandes deleciones o duplicaciones (> 50Mb)	+	-	-	+/-	-	+
Inserciones / Deleciones (1Mb)	+ (Depende del tamaño y de la localización cromosómica)	-	-	+ (No se recomienda su uso para defectos en genes únicos)	-	+
Número de copias mitocondriales	+	-	-	+	-	+
Disomía uniparental	-	-	+	+	-	+

***Tabla 4.** Cuadro comparativo: costo, complejidad, duración, limitaciones entre las metodologías moleculares empleadas para el desarrollo del PGT-A.*

Metodología	Costo de inversión	Complejidad	Duración de procesamiento (h)	Anomalías detectadas	Resolución
aCGH	Medio	Media	+/- 12	Aneuploidías completas (+++) Mosaicismo (+)	Media
aSNP	Alto	Alta	Hasta 72	Aneuploidías completas (+++) Origen parental (+++) Mosaicismo (+)	Alta
qPCR	Bajo	Baja	4	Aneuploidías completas (+++) DUP (+)	Baja
NGS	Alto	Alta	< 12hs	Aneuploidías completas Mosaicismo (+++) Número de copias de ADN mitocondrial (++) Translocaciones (++)	Alta

mosómica aberrante durante la gametogénesis o la división somática produce aneuploidías, las cuales generalmente producen consecuencias nocivas para la viabilidad celular (Santaguida y Amon, 2015). La mayoría de las aneuploidías embrionarias pueden surgir durante la formación/maduración del ovocito, y esto se ha evidenciado con la disminución de la fertilidad femenina relacionada con el incremento de la edad (Webster y Schuh, 2017). Aunque su prevalencia es menor, existe evidencia de que los errores mitóticos también son comunes durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Munné y col. 1994; Vanneste y col. 2009). Estos errores producen dos o más células con un cariotipo diferente dentro de un mismo embrión, fenómeno denominado mosaicismo cromosómico. En relación con los mecanismos que dan su origen, la información conocida es acotada, lo más resaltante es acerca de su consecuencia para la supervivencia embrionaria; sin embargo, los avances tecnológicos en genómica molecular han dado nueva evidencia sobre estos temas. En este sentido, creemos que este conocimiento es fundamental para mejorar el asesoramiento respecto de la transferencia de embriones detectados como mosaicos en PGT-A.

Los estudios de PGT-A han revelado que más de la mitad de los embriones en etapa de clivaje albergan anormalidades cromosómicas, que van desde la ganancia o pérdida de cromosomas individuales hasta aberraciones complejas que afectan a muchos cromosomas de manera simultánea. Las anomalías meióticas, que surgen abrumadoramente en el ovocito en comparación con los espermatozoides, aumentan en frecuencia de un 20% a más del 60% con el aumento de la edad materna (McCoy y col. 2015). Además, en este mismo estudio se evidenció que el >25% de los embriones (día 3) presentaban anomalías mitóticas (mosaicismo), sin embargo, este valor no variaba en relación a la edad materna.

II.D.1) Tipos de mosaicismo

Los mosaicos pueden clasificarse en varios grupos: el primer grupo, denominado mosaico aneuploide, se define como una mezcla de complementos aneuploides distintos (es decir, sin células diploides) y se estima que afecta al 15% de los embriones en fase clivaje (Van Echten-Arends, 2011). Este tipo de mosaicismo ocurre cuando un error mitótico surge en un embrión previamente afectado por error un meiótico o cuando un error mitótico durante el primer clivaje embrionario produce dos células hijas con aneuploidías distintas. Esto contrasta con la clase más común de mosaico, el diploide-aneuploide, que se ha estimado que afecta aproximadamente a la mitad de los embriones en etapa de clivaje (Van Echten-Arends, 2011), aunque otros reportes de datos y enfoques describen una incidencia algo menor. Los mosaicos diploides-aneuploides comprenden una mezcla de células normales y aneuploides, y generalmente surgen debido a un error mitótico en una célula que desciende de un cigoto diploide. Muy raramente, el mosaicismo diploide-aneuploide puede surgir cuando la diploidía es rescatada por un error mitótico en una célula descendiente de una aneuploide (Barbash-Hazan, 2009). El tercer grupo es denominado mosaicos ploides, también llamados embriones mixoploides; estos comprenden una mezcla de células con diferentes múltiplos del número de cromosomas haploides (n = 23 para humanos). Estos pueden incluir cualquier combinación de haploidía (n), diploidía (2n) y poliploidía (>2n) dentro del mismo embrión. Mientras que los primeros estudios de PGT-A documentaron una alta frecuencia de mosaicos diploides-tetraploides en la etapa de clivaje (15%) (Bielanska y col. 2002), las plataformas moleculares modernas son incapaces de detectar este fenómeno, lo cual ha dificultado su cuantificación.

Finalmente, la última clase de mosaicismo, que no se excluye mutuamente de los grupos anteriores, está definida no solo por la presencia o ausencia de células diploides, pero sí por su característica cromosómica severa. Los embriones mosaicos caóticos muestran un patrón severo de irregularidad y presentan múltiples cromosomas afectados y cada célula que posee un conjunto de cromosomas aparentemente aleatorios. Esta forma de mosaicismo sigue siendo el menos comprendido a pesar de su prevalencia en la etapa de clivaje (25%) (Bielanska y col. 2002), aunque los criterios y estimaciones varían según los estudios. En la Figura 2 se resume lo explicado en esta sección.

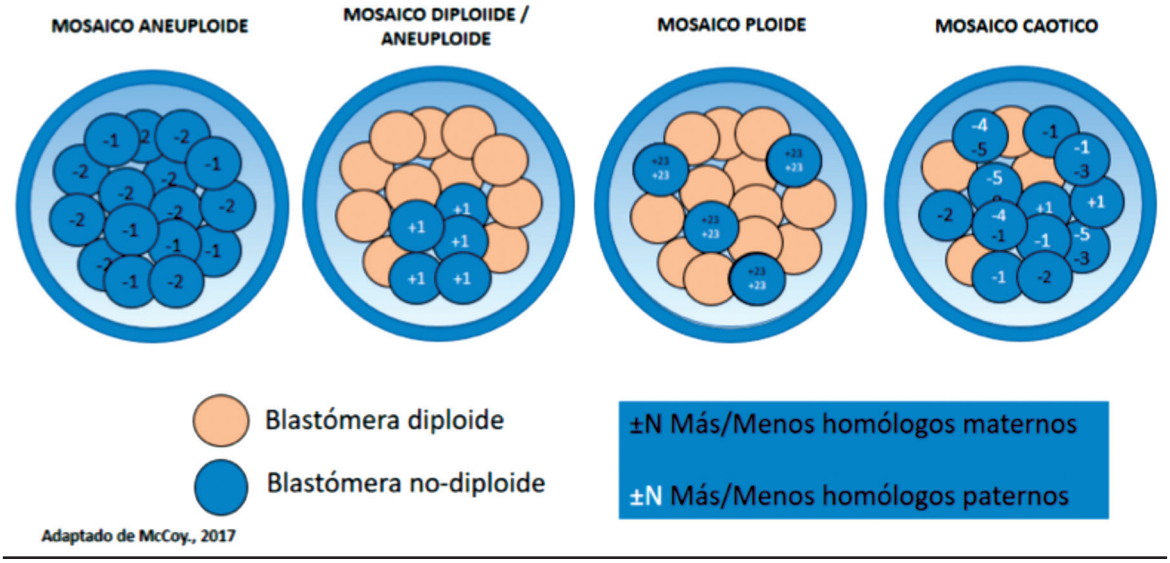
II.D.2) Factores que podrían generar defectos mitóticos

La baja rigurosidad del control en ciclo celular ha sido propuesta como una posible causa de la formación de errores mitóticos (mosaicos) en los embriones preimplantatorios. Esto se basa en los siguientes argumentos: el desarrollo en la etapa de clivaje se caracteriza por la división celular con poco crecimiento celular, de tal manera que la mórula de 16-32 células ocupa aproximadamente el mismo volumen que el zigoto original. Como el genoma embrionario es en gran parte inactivo hasta la etapa de cuatro a ocho células, el clivaje inicial se encuentra bajo el control del ARN y proteínas maternas provistas en el ooplasma (Vassena y col. 2011). La oscilación de ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (Cdks) son reguladores esenciales del ciclo celular. Recientes estudios han utilizado perfiles de expresión génica en células individuales para identificar genes (maternos) expresados de manera diferencial entre embriones mosaicos aneuploide/euploide y en embriones normales. Así, se evidenció que los embriones destinados a la detención mostraron perfiles de desregulación en genes implicados en el control del ciclo celular y control mitótico (CDK1, CDK2, CHEK2, BUB1, BUB3, BRCA1 y ATR) (Yanez y col. 2016).

Otros estudios también han revelado que los embriones en la etapa de clivaje pueden mostrar un "debilitamiento" de los puntos de control de la mitosis, lo que podría facilitar divisiones de escisión rápida. Estos incluyen los puntos de control G1 y G2. En células adecuadamente maduras estos puntos de control sirven para detectar ADN dañado o inadecuadamente replicado, lo cual gatilla una señal para proteínas efectoras que detienen el ciclo celular e inician la apoptosis o la reparación del ADN. Cuando los puntos de control se debilitan, es posible que el ciclo celular pase a la fase M antes de que los cromosomas se repliquen por completo, se alinean en el huso mitótico o se eliminan los daños en el ADN. Así, basándose en la pérdida cromosómica de manera excesiva en comparación con la ganancia, el retraso de la etapa de anafase ha sido relacionada a este evento, siendo este mecanismo el causante de la mayoría de errores mitóticos en embriones preimplantatorios, lo cual explica hasta el 50% de mosaicismo evidenciado por la técnica de FISH (Coonen y col. 2004). Estudios recientes realizados mediante aSNP revelaron un exceso de pérdida cromosómica hasta de cuatro veces en comparación con la ganancia cromosómica entre embriones con errores mitóticos (McCoy y col. 2015).

Por otro lado, el sistema de control del huso

Figura 2. *Tipo de mosaicismo que afectan a embriones pre-implantatorios.*



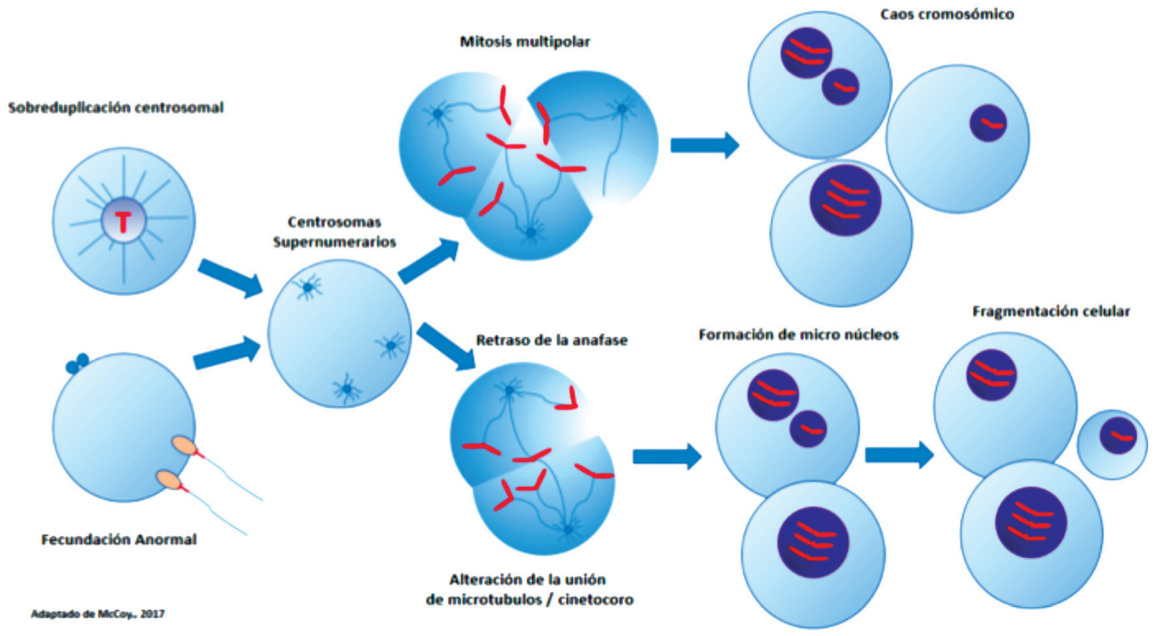
mitótico también ha sido propuesto como un punto crítico en la generación de errores mitóticos. Así, un inadecuado mecanismo de control en el huso mitótico puede conllevar a errores a nivel del cinetocoro (sitio de unión de las cromátidas a los microtúbulos del huso) y los microtúbulos. Esto desencadenaría una conexión fallida de la cromátida hermana al huso mitótico y por lo tanto ambas cromátidas hermanas quedarían fijadas al mismo polo del huso (Gordon y col. 2012).

Un aspecto muy interesante relacionado con este tema es que los cromosomas son susceptibles a daños severos en el ADN, lo cual puede comprometer su capacidad para formar un cinetocoro funcional y por lo tanto someterse a una segregación adecuada (Vázquez-Diez y col. 2016). Las formas de daño en el ADN incluyen roturas de doble cadena, cuyo mecanismo de reparación puede contribuir a la formación de patrones de mosaicos principalmente segmentarios (Vanneste y col. 2009).

Otros defectos relacionados con la formación de mosaicismo son los concernientes a las aberraciones del centrosoma y del huso mitótico. El papel fundamental del centrosoma para asegurar la fidelidad mitótica ha sido reconocido desde hace muchos años atrás. El centro organizador de microtúbulos (MTOC) es quien coordina la formación del huso bipolar; cada vez es más evidente que alteraciones en el centrosoma frecuentemente contribuyen a errores mitóticos catastróficos en embriones en la etapa de clivaje, los cuales subyacen al mosaicismo caótico. Los ovocitos, a diferencia de los espermatozoides, pierden sus centriolos por completo durante la ovogénesis; sin embargo, retienen los ARNm y proteínas centrosomales, incluyendo la gama tubulina. En muchas especies, el papel del centrosoma es reemplazado por un MTOC acentriolar, el cual es funcionalmente equivalente al ocurrido durante la meiosis femenina (Holubcová y col. 2015). Es interesante señalar que, en este mismo trabajo se demostró que los humanos somos una excepción a este hecho, es decir que los ovocitos humanos organizan el huso meiótico en ausencia de cualquier MTOC detectable, con cromosomas que sirven asimismo como sitios de nucleación de microtúbulos (Holubcová y col. 2015). Esta distinción fue usada para dar respuesta hipotética a la inestabilidad inherente del huso meiótico del ovocito, con un 44% de husos que atraviesan una etapa apolar y un 38% que pasan por una etapa multipolar prolongada antes de establecer la orientación bipolar. Sorprendentemente, el 72% de los ovocitos con husos multipolares transitorios presentaron un retraso de la etapa de anafase causada por una alta frecuencia de alteraciones en la unión del huso al cinetocoro, lo que se reflejó en una inadecuada segregación cromosómica. Luego de la fecundación, el centriolo espermático sufre un proceso de duplicación, principalmente regulada por una proteína ovocitaria (PLK4). La cantidad de esta proteína es finamente regulada luego de la fecundación. Así, un ligero incremento en la expresión génica asociada a esta proteína puede llevar a la formación de múltiples pro-centriolos (Habedanck y col. 2005). La formación supernumeraria de centriolos conlleva a la aparición extra de centrosomas, lo cual generaría husos mitóticos multipolares. Cuando esto ocurre durante la mitosis, los cromosomas se segregan de manera aleatoria a cualquiera de los polos formados en las células hijas, llevando a un estado aneuploide caótico. Deficiencias en PLK4 han sido relacionadas con la incapacidad de los embriones en estadio de clivaje de alcanzar el estadio de blastocisto, así como la presencia de perfiles aneuploides tipo caóticos (McCoy y col. 2015). En la Figura3, se muestra una referencia a lo explicado en este apartado.

Finalmente, el hallazgo del mosaicismo entre los embriones producidos por FIV plantea ciertas preguntas sobre la presencia de este fenómeno en embarazos en la población general sin FIV. Siendo sinceros, el desarrollo embrionario preimplantatorio in vivo sigue siendo una “caja negra”, sin embargo, algunos estudios han abordado indirectamente estas preguntas mediante el estudio sobre la incidencia de aneuploidías en diferentes protocolos de estimulación ovárica, condiciones de cultivo para FIV y diferentes poblaciones de pacientes. Inicialmente, un estudio encontró una variación significativa de las tasas de mosaicismo en cuatro centros de FIV (11% a 52%), así como diferencias dentro de un mismo centro de FIV después de

***Figura 3.** Modelos que explican la inducción de aneuploidías mitóticas producto de alteraciones centrosomales.*



un cambio en el protocolo de estimulación hormonal (Munné y col. 1997). Sin embargo, estudios recientes contradicen estas conclusiones, no detectando un impacto significativo de la estimulación hormonal sobre las tasas de anormalidades cromosómicas (Labarta y col. 2012; Hong, 2016). Si bien es cierto que la razón de esta discrepancia sigue sin ser clara, los estudios recientes se basan en poblaciones más grandes y emplean metodologías de detección de PGT-A mejorados.

II.D.3) Efectos de mosaicismo en el desarrollo embrionario

El error mitótico y el mosaicismo cromosómico se reconocen cada vez más como características generalizadas de desarrollo embrionario preimplantatorio. La pregunta es sin duda ¿bajo qué circunstancia esta situación (mosaico) es importante o relevante? Si bien el progreso en este aspecto ha sido gradual, los estudios recientes están brindando evidencia acerca de esta situación frente al PGT-A.

El mosaicismo desde la etapa de clivaje hasta la etapa de blastocisto sufre una disminución y esta se correlaciona directamente con el número de cromosomas afectados (Vega, y col. 2014). Existen trabajos publicados donde los embriones en la etapa de clivaje muestran una mayor incidencia de complejos aneuploides caóticos (25%) en comparación con los embriones en la etapa de blastocisto (10%) (McCoy y col. 2015). Tres modelos que no son mutuamente excluyentes podrían explicar la creciente frecuencia de células diploides en el estadio de clivaje en comparación hasta el blastocito. El primer modelo es la selección de mortalidad temprana en contra de embriones con un alto nivel de mosaicismo. Algunos estudios apoyan este modelo al demostrar que los embriones detenidos están fuertemente enriquecidos por un mosaicismo cromosómico, en consecuencia con un mayor índice de mortalidad ocurrido antes de la formación del blastocisto (Rubio y col. 2007; Santos y col. 2010). En otras circunstancias, los embriones mosaicos que no se detienen antes de la formación del blastocisto pueden sufrir tasas de implantación disminuidas (Fragouli y col. 2015). Teniendo en cuenta estas observaciones, las pautas para la selección de embriones en PGT-A tienen tradicionalmente recomendada la no transferencia de embriones mosaico. En la práctica,

biopsias de embriones con un genotipo mosaico a menudo se clasificaban como normales o anormales según criterios aún poco estandarizados. Sin embargo, con una adecuada tasa de detección, se ha acordado recientemente categorizar al mosaico como una tercera entidad, es decir, ni euploide ni aneuploide.

Los nacimientos de niños "euploides" luego de la transferencia deliberada de blastocistos con naturaleza mosaico han desatado una gran discusión frente a esta entidad (Greco y col. 2015; Gleicher y col. 2016). Asumiendo la adecuada precisión técnica de los resultados del PGT-A, estos informes resaltan el potencial de algunos embriones mosaico para "autocorregirse" de manera efectiva liberándose del mosaicismo. Estas observaciones son consistentes con un segundo modelo, llamado agotamiento clonal, por el cual las células aneuploides se eliminan activamente dentro de embriones de mosaico, mitigando su impacto. Un estudio reciente utilizó un modelo de ratón para proporcionar un soporte empírico para esta hipótesis, demostrando que los embriones en mosaico pueden ser rescatados por células diploides si se presentan con suficiente frecuencia (≥50%) (Bolton y col. 2016). Este experimento también reveló que el destino de las células aneuploides depende del tipo de célula afectada. Así, las aneuploidías que se producen en el TE se toleraron de mejor manera en relación con los del MCI; cuando ocurrieron en este último, los embriones se eliminaron por apoptosis antes de su implantación (Bolton y col. 2016). Si bien esto es esclarecedor, las conclusiones derivadas de los estudios con ratones no deberían aplicarse directamente al modelo humano, ya que el 80% de los embriones de ratón forman blastocistos de manera in vitro mientras que solo el 30-50% de los embriones humanos lo logran.

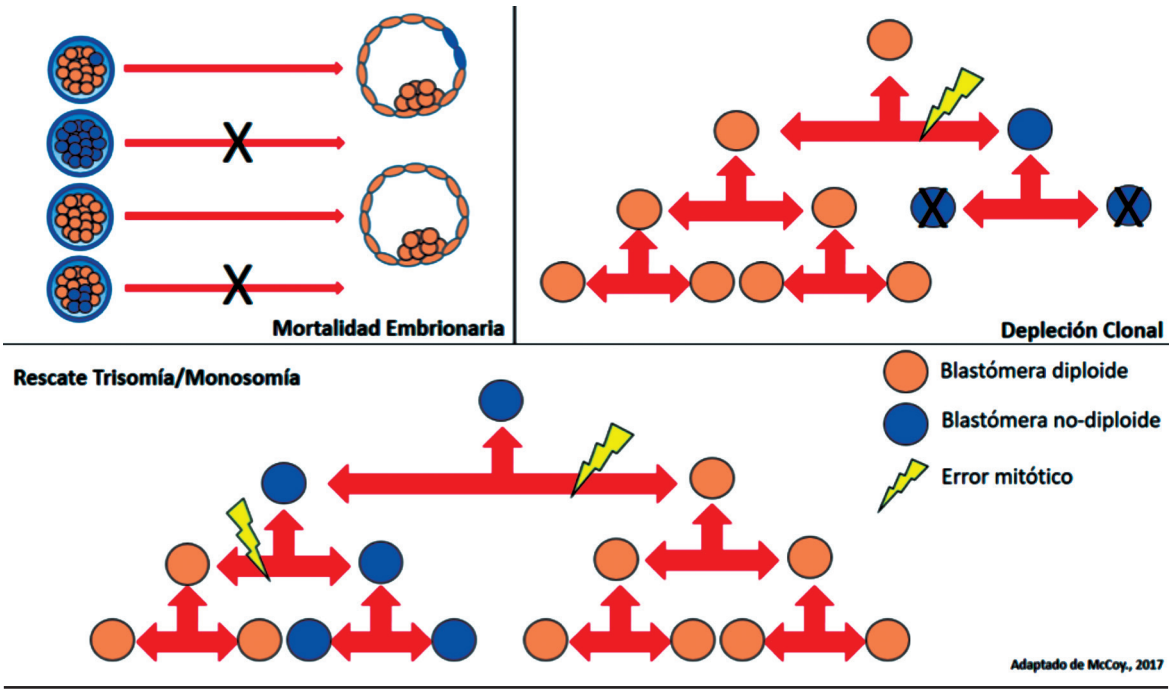
Finalmente, un modelo que potencialmente contribuye a la disminución de la frecuencia de células aneuploides en mosaico en embriones preimplantatorios es el de rescate trisómico/monosómico, por lo que una línea celular aneuploide (de cualquier origen meiótico o mitótico) se corrige mediante un error mitótico que rescata la diploidía. El rescate de la trisomía implica la pérdida de cromosomas mitóticos mientras que el rescate monosómico implica una ganancia cromosómica de tipo mitótico. La incidencia de este fenómeno no ha sido adecuadamente cuantificada, ya que los trabajos que intentaron evaluarla no excluyeron la posibilidad de mosaicismo, error de muestreo, y/o la depleción clonal, lo que podría explicar la diploidía en un embrión con una detección previa aneuploide. Un posible resultado del rescate trisómico o monosómico es la disomía uniparental (DUP), en la que el error mitótico produce una célula diploide que contiene dos cromosomas paternos o maternos. Aunque a menudo es compatible con la vida, la DUP se asocia con una variedad de trastornos clínicos según los cromosomas específicos que han sido afectados (Eggermann y col. 2015). Sin embargo, la DUP es detectada solo en el 3% de biopsias de embriones de día 3 y en menos del 1% en BTE (McCoy y col. 2015). En la Figura 4 se presentan un resumen de lo mostrado en este apartado.

II.D.4) Transferir o no embriones mosaico

La capacidad de NGS para detectar el mosaicismo se demostró en un estudio de casos y controles en el que se seleccionaron muestras de ADN de blastocitos identificados como euploides por la técnica de aCGH, que resultaron en un aborto espontáneo o en el nacimiento de un niño vivo, y que fueron luego reanalizados por NGS. De los blastocistos diagnosticados euploides por aCGH que resultaron en aborto, el 13,6% fueron diagnosticados como mosaicos y el 5,2% fueron diagnosticados como poliploides por la técnica de NGS (Maxwell y col. 2016).

Recientemente, Munné (2018) subscribió una nota editorial en donde hace hincapié en la evidencia publicada sobre los blastocistos clasificados como mosaicos en ciclos de PGT-A, generalmente obtenidos a través de aCGH o NGS. Este hecho ha producido dos principales eventos: el primero, el hecho de que algunos de estos embriones logren implantación (aunque en menor frecuencia que un embrión no mosaico) y dar lugar a niños nacidos euploides; y segundo, producir abortos (en mayor frecuencia que los producidos por embriones euploides) (Fragouli y col. 2017; Greco

***Figura 4.** Modelos que explican la disminución del mosaicismo desde embriones clivados a blastocistos durante el desarrollo pre-implantatorio.*



y col. 2015; Munné y col. 2017; Spinella y col. 2018). En su momento, la Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGDIS), y el Consenso de Controversias en Diagnóstico Genético Preconcepcional, Preimplantatorio y Prenatal (CoGEN) recomendaron priorizar los embriones euploides sobre los embriones mosaico para su transferencia, y solo considerar su transferencia cuando no hay embriones euploides disponibles. Hasta la fecha, poco más de 100 embarazos se han informado luego de la transferencia de embriones mosaico, de los cuales 80 están en curso y son aparentemente normales, pero este es un número insuficiente para evaluar el riesgo de que dichos embriones produzcan un bebé anormal. Así, Gratti y col. (2018) propone que la probabilidad de que un embarazo sea mosaico es del 2,1%, pero de esos, solo el 0,2% afecta al feto mientras que el resto está confinado a la placenta.

Respecto de la transferencia de embriones mosaicos, se han hecho recomendaciones con respecto a qué tipo de mosaicos podrían ser transferidos. Así, el PGDIS desalienta la transferencia de mosaicos que incluyen cromosomas compatibles con la vida, como es el caso de las trisomías mosaicos de los cromosomas X, Y, 13, 18, 21, o monosomías mosaico 45, XO, así como también aquellos asociados a la DUP (cromosomas 7, 14, 15) o aquellos relacionados con una restricción en el crecimiento intrauterino (cromosoma 16). Tanto el PGDIS como el CoGEN plantean que, en el caso de proceder a transferir embriones mosaicos, se tendría que favorecer a aquellos mosaicos monosómicos sobre los de tipo trisómicos; esto se encuentra fundado en que a excepción del XO, el resto de las monosomías completas raramente llegan a implantar (excepto la monosomía 21). Hay que resaltar que estas guías fueron las primeras en aparecer después de la introducción de hr-NGS, y por lo tanto fueron las primeras en plantear la toma de precauciones respecto de la transferencia de mosaicos.

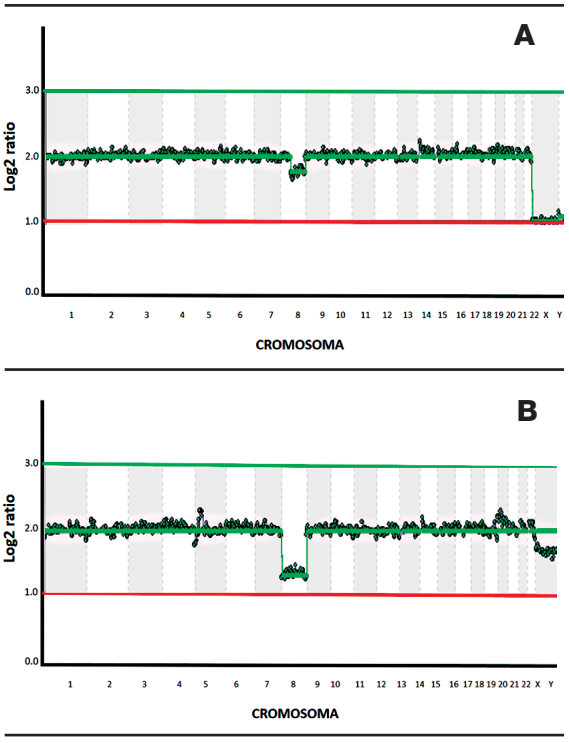
Recientemente un grupo de investigación italiano (Grati y col. 2018) ha reportado un nuevo sistema de puntuación para el mosaicismo, el cual se basa en la observación del riesgo y evidencia que pueda llegar a generar una trisomía en mosaico (que pueda afectar al feto), o aquellos que están involucrados en las DUP o aquellos relacionados

en abortos espontáneos. El riesgo fue determinado tomando en consideración el resultado de más de 72.000 embarazos evaluados por análisis de vellosidades coriónicas y 3800 pérdidas de embarazos que fueron evaluados a través del análisis de los productos de concepción. Los investigadores computaron un score o puntaje basado en un cálculo matemático a fin de determinar el riesgo de que un mosaico esté fuertemente relacionado con la formación de un feto afectado, DUP o un aborto, con un valor de 5; caso contrario, en aquellos mosaicos donde su transferencia no conferiría un riesgo, se le asignó un valor de 0. Utilizando este sistema, este trabajo brindó como resultado: puntuación de 5 para las trisomías en mosaico 13, 14, 16, 18, y 21, y 45 X; un puntaje intermedio entre 4 y 5 para las trisomías cromosómicas 8, 20, 47, XXX y 47, XXY; un puntaje de 3 para mosaicos en trisomías 6, 9 y 15; una puntuación de 2 para los mosaicos en trisomías de los cromosomas 2, 7, 11, 17 y 22; un puntaje de 1 para las trisomías en mosaico 47, XYY, 4 y 5; y una puntuación de cero (0) para mosaicos trisómicos en los cromosomas 1, 3, 10, 12 y 19. En comparación con las directrices PGDIS y CoGEN, este parece ser un enfoque mejorado, ya que incluye un riesgo específico para cada cromosoma.

En relación con el porcentaje de mosaicismo presente en el blastocisto, también se ha reportado que podría tener implicancia en la mayor o menor posibilidad de implantación y embarazo evolutivo. Así, hay quienes consideran un valor del corte el 50% de mosaico (Spinella y col. 2018) o aquellos que consideran distintos a los mosaicos de 20-40% de aquellos de 40-80% (Munné y col. 2017) (Figura 5). En este sentido, se recomienda transferir aquellos mosaicos con menor nivel de mosaicismo presente. Asimismo, si el mosaicismo se presenta en forma segmentaria, esto podría representar una chance similar de implantación en comparación con aquellos embriones euploides (Fragouli y col. 2017).

Finalmente, es importante que todo laboratorio que realice PGT-A y que utilice una plataforma de NGS de alta resolución tenga presente que el mosaicismo es parte de los resultados esperados. Por lo tanto, es importante que todos los grupos

Figura 5. A) Perfiles de NGS donde se muestra un perfil de un embrión con mosaicismo en el cromosoma 8 del 25%, B) perfil de un embrión con mosaicismo en el cromosoma 8 del 75%. Ambos mosaicos se muestran en monosomía.



tengan en cuenta sus políticas de información/reporte, así como de transferencia de embriones mosaicos de forma previa a la realización de las pruebas. Consideramos importante que aquellos grupos que promuevan la transferencia de embriones mosaico lo hagan de una manera adecuada, es decir documentando los estudios prenatales pertinentes, así como también documentar al nacimiento del bebé un examen físico y un cariotipo (idealmente molecular) del detalle del mosaico transferido. En relación con el asesoramiento genético pre y post PGT-A, consideramos que es de suma importancia para dar tranquilidad tanto al centro como a la pareja que lo realiza. En ese sentido, los pacientes deben conocer de forma fehaciente los riesgos a los cuales se someten al transferir este tipo de embriones. El mosaicismo es solo uno de los muchos desafíos en el asesoramiento genético que los laboratorios, centros y pacientes deberán enfrentar debido al aumento del uso de

nuevas tecnologías genómicas en medicina reproductiva. Será imperativo para los laboratorios PGT-A e IVF en colaborar en el diseño de protocolos de asesoramiento antes y después de las pruebas genéticas en pacientes infértiles.

II.E) Aspectos clínicos

Como mencionamos al inicio de esta revisión, desde el primer nacimiento de FIV en el año 1978, diferentes tecnologías, como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el cultivo extendido a la etapa de blastocisto y la criopreservación (vitrificación) ayudaron de manera significativa a mejorar las tasas de embarazo en los tratamientos de FIV. Sin embargo, la alta proporción de aneuploidías observadas en embriones humanos dan como resultado una disminución en las tasas de implantación o un incremento de la tasa de pérdidas tempranas del embarazo. Se estima que hasta el 50%-60% de las pérdidas de embarazos en el primer trimestre se deben a aneuploidías embrionarias (Maxwell y col. 2016). La aneuploidías embrionarias aumentan con la edad materna, y este aspecto es una consideración importante, ya que hoy en día las mujeres retrasan su maternidad y son típicamente mayores cuando buscan quedar embarazas de manera natural o mediante tratamientos de fertilidad. Por lo tanto, el concepto de que las tasas de embarazo pueden mejorarse transfiriendo solo embriones euploides en el útero podría resultar en una mayor tasa de implantación y menor tasa de aborto espontáneo gracias al PGT-A. Sin embargo, este aspecto clínico es de los más criticados de esta metodología.

Para validar clínicamente el PGT-A, es crucial, como mencionamos al inicio, evaluar las tasas de embarazos y nacidos vivos por ciclo iniciado y acumulada, y no así por transferencia. Sin embargo, esta limitante es aún permanente en los trabajos publicados. En ese sentido la tasa de embrazo evolutiva o la tasa de nacido vivo por transferencia es el mejor valor que puede considerarse para hablar de éxito del PGT-A por diferentes autores. Así, en un grupo de mujeres de EMA, la transferencia de blastocistos euploides, pero que su ploidía fue confirmada por aCGH después de una biopsia en día 3, demostró una mejor tasa de implantación (52,8% vs. 27.6%) y tasa de nacidos vivos por transferencia (64,7% vs. 27,4%) (Rubio y col. 2017). Por otro lado, es un estudio retrospectivo, cuando se comparó la transferencia de un único embrión con o sin CCS, mediante la BTE y evaluación rápida con qPCR, resultó tener una mayor tasa de embarazo en curso (55,0% vs. 41,8%) y una menor tasa aborto involuntario (10,5% vs. 24,8%) (Forman y col. 2012). En un ensayo controlado y aleatorizado con 72 pacientes que se sometieron CCS con qPCR, las tasas de implantación fueron más altas en el grupo de CCS (79,8%) en comparación con los controles (63,2%) (RR 1,26, IC 95% 1,04-1,39), y el porcentaje de nacidos vivos fue 66,4% y 47,9%, respectivamente (RR 1,39; 95% CI 1,07-1,60) (Scott y col. 2013). Sin embargo, este trabajo junto con los otros trabajos prospectivos aleatorizados publicados (Yang y col. 2012; Forman y col. 2013) y analizados por Dahdouh (Dahdouh y col. 2015) en un meta-análisis, fueron realizados en una población no seleccionada de pacientes, por lo que si bien es cierto que el beneficio del PGT-A queda plasmado en los resultados, no interviene necesariamente un grupo en particular de pacientes beneficiadas.

El grupo de pacientes de EMA se muestra como un grupo susceptible de realizar PGT-A, sabiendo que en mujeres fértiles donantes de óvulos (jóvenes) la tasa de aneuploidía está cerca del 30-40%, mientras que en mujeres de 41-42 años, ronda el valor del 80% (Ata y col. 2012). Por lo que someter a este grupo de mujeres a PGT-A podría favorecer principalmente dos aspectos: incrementar la tasa de embarazo evolutivo por transferencia y disminuir la tasa de aborto temprano, planteándose el concepto de que, si una mujer de EMA logra tener un embrión euploide, su tasa de embarazo evolutivo es similar a la de una mujer joven (Harton y col. 2013). Sin embargo, al parecer vuelve a surgir el hecho de que las tasas de embarazo acumulado realmente aumentan con el PGT-A, y la verdad es que no es así. A pesar de que las tasas de embarazo acumulado son similares entre hacer o no PGT-A, se puede argumentar el hecho de que realizar PGT-A previene de manera significativa la posibilidad de un aborto y por consiguiente pre-

vendría el efecto psicológico negativo que puede ocasionar en la pareja. A pesar de esta última frase, que suena bastante lógica, hay quienes manifiestan que no es suficiente para someter a una pareja a un tratamiento de PGT-A. Cabe destacar que en este grupo de pacientes (EMA), la posibilidad de no tener un embrión euploide para transferir está cerca del 31% (Munne y Cohen., 2017). Hay que resaltar que aún hacen falta estudios bien diseñados en otros grupos de interés del PGT-A, como lo son la falla reiterada de implantación (FRI) y el grupo de pacientes con aborto recurrente (AR). En este sentido, existe una cantidad de trabajos retrospectivos y de cohorte que muestra o no el beneficio del PGT-A, aunque, no existen aún trabajos bien diseñados que lo sustenten.

Finalmente, respecto de la "seguridad" del PGT-A, cabe mencionar que en un estudio realizado en 88.010 nacidos vivos únicos después de ciclos de FIV con PGT-A o sin PGD (87,571), no se encontró un mayor riesgo perinatal en los ciclos de PGT-A (Sunkara y col. 2017). De igual manera, no se demostrado que exista un impacto negativo de la biopsia de células embrionarias sobre los siguientes parámetros: crecimiento, peso al nacimiento, hospitalizaciones o malformaciones congénitas en un seguimiento de hasta 2 años luego del nacimiento de niños nacidos por PGT-A (Desmyttere y col. 2009; Desmyttere y col. 2012). Estos estudios, en cierta manera, demuestran un grado de seguridad de la técnica.

III) Conclusiones

1.- El PGT-A no mejora la calidad embrionaria, es un método de selección de embriones en donde la calidad proviene de diversos factores (edad, el cultivo, etcétera.).
2.- La correcta medición de éxito para el PGT-A debería ser la tasa de embarazo evolutivo o nacido vivo por ciclo iniciado y acumulado.
3.- La manera más aceptada de realizar el PGT-A es mediante una biopsia en blastocisto (día 5, 6 o 7) y el uso del láser.
4.- El NGS se presenta como la metodología más precisa para la realización del CCS para PGT-A, sin embargo, hay que recordar que tiene como punto crítico la información del mosaicismo.
5.- El mosaicismo en blastocistos es una realidad dentro los resultados del PGT-A, por consiguiente, el establecimiento de normas para su información y posible transferencia deben quedar claramente establecidas por los centros que la realizan, así como el asesoramiento hacia el paciente de manera previa y posteriormente al estudio.
6.- Dependiendo del tipo de mosaicismo, el impacto sobre el desarrollo embrionario puede ser tan deletéreo que produzca la muerte embrionaria o que sea tan "leve" que por diversos mecanismos produzca una implantación y desarrollo gestacional normal. En revisión.
7.- Se deben realizar mayores esfuerzos en aquellos grupos que promueven la transferencia deliberada de embriones mosaico, la adecuada documentación de los eventos ocurridos durante la gestación y al momento del nacimiento, con el fin de determinar correctamente el impacto del mosaicismo.
8.- A excepción del grupo de pacientes con EMA, el PGT-A carece de trabajos clínicos bien diseñados que puedan sostener su ejecución de manera sistemática y eficiente en otros grupos de pacientes (FRI, AR, ovodonación).

Bibliografía consultada

- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P y col. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. Hum Reprod 2011; 26 (6): 1560-1574.
- Alvarez Sedó C, Bilinski M, Lorenzi D y col. Blastocyst mitochondrial DNA quantification and its association with female age, aneuploidy and implantation. JBRA 2017; 21 (2): 142-160.
- Ata B, Kaplan B, Danzer H y col. Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related with the number of embryos generated. Reprod Biomed Online 2012; 24: 614-620.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG committee opinion No. 430: preimplantation genetic screening for aneuploidy. Obstet Gynecol 2009; 113: 766-767.

- Barbash-Hazan S. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. Fertil Steril 2009; 92, 890-896.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A y col. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. Hum Reprod 2002; 17, 413-419.
- Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N y col. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. Nat Commun 2016; 7: 11165.
- Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: What technology should you use and what are the differences? J Assist Reprod Genet 2016; 33 (7): 823-832.
- Brown S. After 20 years, preimplantation genetic screening is in a new technology phase. Focus on Reproduction January 2014: 14-15.
- Brodie D, Beyer CE, Osborne E y col. Preimplantation genetic diagnosis for chromosome rearrangements, one blastomere biopsy versus two blastomere biopsy. J Assist Reprod Genet. 2012; 29 (8): 821-827.
- Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochim Biophys Acta 2014; 1842 (10):1932-1941.
- Capalbo A, Wright G, Elliott T y col. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows a high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. Hum Reprod 2013; 28 (8): 2298-2307.
- Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D y col. Correlation between the standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. Hum Reprod 2014; 29 (6): 1173-1181.
- Capalbo A, Treff N, Cimadomo D y col. Comparison of array comparative genomic hybridization and cuantitative realtime PCR-based on an aneuploidy screening of blastocyst biopsies. Eur J Hum Gen 2015; 23 (7): 901-906.
- Capalbo A, Rienzi L. Mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. Fertil Steril 2017; 107 (5): 1098-1106.
- Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM y col. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. Biomed Res Int 2016; 2016: 7193075.
- Cobo A, de los Santos MJ, Castell`o D. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. Fertili Steril 2012; 98 (5): 1138.e1-1146.e1.
- Cohen J, Elsner C, Kort H y col. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. Hum Reprod 1990; 5 (1): 7-13.
- Cohen J, Alikani M, Malter HE y col. Partial zona dissection or subzonal sperm insertion: microsurgical fertilization alternatives based on evaluation of sperm and embryo morphology. Fertil Steril 1991; 56 (4): 696-706.
- Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. Fertil Steril 2007; 87 (3): 496-503.
- Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC y col. Anaphase lagging mainly explains the chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. Hum Reprod 2004; 19: 316-324.
- Dahdouh EM, Balayla J, García-Velasco JA. Comprehensive chromosome screening improves an embryo selection: a meta-analysis. Fertil Steril 2015; 104 (6): 1503-1512.
- De Boer KA, Catt JW, Jansen RP y col. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. Fertil Steril 2004; 82 (2): 295-298.
- Desmyttere S, De Schepper J, Nekkebroeck J y col. Two-year auxological and medical outcome of singletons born after embryo biopsy applied in preimplantation genetic diagnosis or preimplantation genetic screening. Hum Reprod 2009; 24 (2): 470-476.
- Desmyttere S, De Rycke M, Staessen C y col. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD. Hum Reprod 2012; 27 (1): 288-293.
- Diez-Juan A, Rubio C, Marin C y col. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. Fertil Steril 2015; 104 (3): 534-541.
- Eggermann T, Soellner L, Buiting K y col. Mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis. Trends Mol Med 2015; 21: 77-87.
- Feichtinger W, Strohmer H, Radner KM. Erbium YAG laser for micromanipulation of oocytes and spermatozoa. Lancet 1992; 340 (8811): 115-116.
- Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S y col. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. Hum Reprod 2011; 26 (7): 1925-1935.
- Fiorentino F, Biricik A, Bono S y col. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. Fertil Steril 2014; 101 (5): 1375-1382.
- Forman EJ, Tao X, Ferry KM y col. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. Hum Reprod 2012; 27 (4): 1217-1222.
- Forman EJ, Hong KH, Ferry KM y col. In vitro fertilization with a single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. Fertil Steril 2013; 100: 100-107. e1.
- Fragouli E, Wells D. Mitochondrial DNA Assessment to Determine Oocyte and Embryo Viability. Semin Reprod Med 2015; 33 (6): 401-409.
- Fragouli E. The developmental potential of mosaic embryos. Fertil Steril 2015; 104: e96.

- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K y col. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts. Hum Genet 2017; 136: 805-819.
- Geber S, Bossi R, Lisboa CB y col. Laser confers a less embryo exposure than the acid tyrode for embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis cycles: a randomized study. Reprod Biol Endocrinol 2011; 9: 58.
- Geraedts J, Sermon K. Preimplantation genetic screening 2.0: the theory. Mol Hum Reprod 2016; 22 (8): 839-844.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP y col. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. Fertil Steril 1997; 68: 1128-1131.
- Gleicher N, Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. J Ovarian Res 2017; 10 (1): 21.
- Gleicher N, Vidali A, Braverman JA y col. Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by the degree of the mosaicism of human embryos. Reprod Biol Endocrinol 2016; 14: 54.
- Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM y col. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst Rev 2016; (6): CD002118.
- Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. Nat Rev Genet 2012; 13: 189-203. Grati F, Gallazzi G, Branca L y col. An evidence based-scoring system for prioritizing mosaic aneuploid embryos following preimplantation genetic screening. Reprod Biomed Online 36; 4: 442-449.
- Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. N Engl J Med 2015; 373: 2089-2090.
- Habedanck R, Stierhof YD, Wilkinson CJ y col. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. Nat Cell Biol 2005; 7: 1140-1146.
- Handyside AH. PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: seeing the wood and the trees. Reprod Biomed Online 2011; 23 (6): 686-691.
- Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. Fertil Steril 2013; 100 (3): 595-602.
- Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. Fertil Steril 2010; 94 (4): 1173-1177.
- Harton GL, Munné S, Surrey M y col. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. Fertil Steril 2013; 100: 1695-1703.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K y col. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. Environ Mol Mutagen 1996; 28 (3): 167-175.
- Holubcová Z, Blayney M, Elder K y col. Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. Science 2015; 348: 1143-1147.
- Hong KH. Natural is not better: gonadotropin stimulation does not increase aneuploidy or diminish implantation rates of euploid embryos. Fertil Steril 2016; 106: e197-e198.
- Johnson DS, Gemelos G, Baner J y col. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. Hum Reprod 2010; 25 (4): 1066-1075.
- Jones AE, Wright G, Kort HI y col. Comparison of laser-assisted hatching and acidified Tyrode's hatching by the evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomized trial. Fertil Steril 2006; 85 (2): 487-491.
- Kahraman S, Bahce M, Samli H y col. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. Hum Reprod 2000; 15: 2003-2007.
- Klimczak AM, Pacheco LE, Lewis KE y col. Embryonal mitochondrial DNA: relationship to the embryo quality and the transfer outcomes. J Assist Reprod Genet. 2018. In press.
- Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J y col. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major. Hum Reprod 2005; 20 (7): 1855-1859.
- Kung A, Munné S, Bankowski B y col. Validation of the next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos. Reprod Biomed Online 2015; 31 (6): 760-769.
- Labarta E, Bosch E, Alamá P y col. Moderate ovarian stimulation does not increase the incidence of human embryo chromosomal abnormalities in in vitro fertilization cycles. J Clin Endocrinol Metab 2012; 97 (10): E1987-1994.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT y col. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. Fertil Steril 2005; 84 (6): 1628-1636.
- Magli MC, Montag M, Köster M y col. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects. Hum Reprod 2011; 26 (11): 3181-3185.
- Mastenbroek S, Repping S. Preimplantation genetic screening: back to the future. Hum Reprod 2014; 29 (9): 1846-1850.
- Mastenbroek S, Bossuyt PMM, Heineman MJ y col. Design and analysis of a randomized controlled trial studying preimplantation genetic screening. Hum Reprod 2005; 20: 2362-2363.
- Mastenbroek S, Twisk M, Van Echten-Arends J y col. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. N Engl J Med 2007; 357: 9-17.

- Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B y col. 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 2016; 106 (6): 1414-1419.e5.
- McCoy RC. Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities are the Norm. Trends Genet 2017; 33 (7): 448-463.
- Moutou C, Goossens V, Coonen E y col. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. Hum Reprod 2014; 29 (5): 880-903.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z y col. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. Hum Reprod 1993; 8 (12): 2185-2191.
- Munné S, Weier HU, Grifo J y col. Chromosome mosaicism in human embryos. Biol Reprod 1994; 51 (3): 373-379.
- Munné S, Alikani M, Tomkin G y col. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil Steril 1995; 64 (2): 382-391.
- Munné S, Magli C, Adler A y col. Treatment-related to the chromosome abnormalities in human embryos. Hum Reprod 1997; 12: 780-784.
- Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P y col. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. Hum Reprod 1999; 14: 2191-2199.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T y col. Chromosome mosaicism in cleavage-stage of the human embryos: evidence of a maternal age effect. Reprod Biomed Online 2002; 4 (3): 223-232.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T y col. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Reprod Biomed Online 2003; 7: 91-97.
- Munné S, Blazek J, Large M y col. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected by high resolution of the Next Generation Sequencing. Fertil Steril 2017; 108: 62-71.
- Munné S, Cohen J. Advanced maternal age patients benefit from preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Fertil Steril 2017; 107 (5): 1145-1146.
- Munné S. Origins of mosaicism and criteria for the transfer of mosaic embryos. Reprod BioMed Online, 2018; 36 (4): 369-370.
- Pey R, Vial C, Schatten G y col. Increase of intracellular Ca2+ and relocation of E-cadherin during experimental decompaction of mouse embryos. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95 (22): 12977-12982.
- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee Opinion. Fertil Steril 2007; 88: 1497-1504.
- Quail MA, Smith M, Coupland P y col. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics 2012; 13: 341.
- Rubio C, Rodrigo L, Mercader A y col. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. Prenat Diagn 2007; 27: 748-756.
- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L y col. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in an advanced maternal age: a randomized, controlled study. Fertil Steril 2017; 107 (5): 1122-1129.
- Santaguida S y Amon A. Short and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. Nat Rev Mol Cell Biol 2015; 16: 473-485.
- Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS y col. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of day 4, 5 and 8 human embryos. Hum Reprod 2010; 25: 1916-1926.
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ y col. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. Fertil Steril 2013; 100 (3): 624-630.
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ y col. 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 2013; 100 (3): 697-703.
- Society for Assisted Reproductive Technology (SART). Final clinic summary report for 2014 and preliminary clinic summary report for 2015. Disponible en: https://www.sartcorsonline.com
- Society for Assisted Reproductive Technology (SART). Clinic summary report for 2015. Disponible en: https://www.sartcorsonline.com
- Spinella F, Fiorentino F, Biricik A y col. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. Fertil Steril 2018; 109: 77-83.
- Spits C, Le Caignec C, De Rycke M y col. Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. Nat Protoc 2006; 1 (4): 1965-1970.
- Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. 1978. Lancet 12; 2 (8085): 366.
- Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. Hum Reprod 2002; 17 (2): 446-451.
- Sunkara SK, Antonisamy B, Selliah HY y col. Pre-term birth and low birth weight following preimplantation genetic diagnosis: analysis of 88 010 singleton live births following PGD and IVF cycles. Hum Reprod 2017; 32 (2): 432-438.
- Treff NR, Levy B, Su J y col. SNP microarray-based on 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. Mol Hum Reprod 2010; 16 (8): 583-589.
- Treff NR, Tao X, Ferry KM y col. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. Fertil Steril 2012; 97 (4): 819-824.

- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C y col. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. Nat Med 2009; 15: 577-583.
- van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B y col. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. Hum Reprod Update 2011; 17: 620-627.
- Vassena R, Boué S, González-Roca E y col. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. Development 2011; 138: 3699-3709.
- van Echten-Arends J. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. Hum Reprod Update 2011; 17: 620-627.
- Vázquez-Diez C. Micronucleus formation causes a perpetual unilateral chromosome inheritance in mouse embryos. Proc Natl Acad Sci USA 2016; 113: 626-631.
- Vega M, Breborowicz A, Moshier EL y col. Blastulation rates decline in a linear fashion from euploid to aneuploid embryos with single versus multiple chromosomal errors. Fertil Steril 2014; 102: 394-398.
- Webster A y Schuh M. Mechanisms of aneuploidy in human eggs. Trends Cell Biol 2017; 27: 55-68.
- Werner MD, Leondires MP, Schoolcraft WB y col. Clinically recognizable error rate after the transfer of comprehensive chromosomal screened euploid embryos is low. Fertil Steril 2014; 102 (6): 1613-1618.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH y col. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization. Nucleic Acids Res 1999 Feb 15; 27 (4): 1214-1218.
- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. Mol Hum Reprod 2000; 6 (11): 1055-1062.
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. Mol Hum Reprod 2008; 14 (12): 703-710.
- Wilton L, Williamson R, McBain J y col. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. N Engl J Med 2001; 345 (21): 1537-1541.
- Yanez LZ, Han J, Behr BB y col. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. Nat Commun 2016; 7: 10809.
- Yang Z, Liu J, Collins GS y col. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. Mol Cytogenet 2012; 5: 24.