

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE ANEUPLOIDÍAS: INDICACIONES, TÉCNICAS Y ESTRATEGIAS

Mariona Rius Mas ^{1,2}, Laura Marquès Soler ¹ y Joaquina Navarro Ferreté ²

¹Centre de Reproducció Assistida Clínica Sagrada Família

²Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona

e-mail: mrius@reproduccion-asistida.com; mariona.rius@uab.cat

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) fue desarrollado para poder seleccionar embriones libres de enfermedades monogénicas en un estadio previo a la implantación (Handyside et al., 1990). Para ello se requiere un procedimiento de fecundación *in vitro* que permita generar los embriones en el laboratorio.

Teniendo en cuenta que la aneuploidía es una de las causas más evidentes del fallo reproductivo humano y es responsable de síndromes compatibles con la vida, el concepto de selección preimplantacional pronto se adaptó para la detección de pérdidas o ganancias cromosómicas en los embriones, dando lugar al DGP para el cribaje de aneuploidías o PGS (*Preimplantation Genetic Screening*). El objetivo del PGS es incrementar la tasa de implantación, disminuir la tasa de aborto y evitar el nacimiento de individuos afectados por cromosopatías en pacientes con especial riesgo.

Las primeras aplicaciones del PGS fueron llevadas a cabo por Verlinsky et al. (1995) y Munne et al. (1995) y consistieron en el análisis de los cromosomas cuyas alteraciones producen síndromes viables, es decir, X, Y, 13, 18 y 21, más el cromosoma 16, la alteración del cual se halla frecuentemente en abortos.

Desde de las primeras aplicaciones, el PGS se ha convertido en un análisis rutinario para pacientes en los que se sabe que la aneuploidía es uno de los factores causantes de la infertilidad. En la última recopilación de datos de la *European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium* se contabilizan 16342 casos de PGS desde Enero de 1997 hasta Diciembre de 2007 (Harper et al., 2010). Sin embargo, la tasa global de implantación de los embriones transferidos después de ser

seleccionados es del 15% (embriones que muestran latido cardíaco respecto a los transferidos). Aunque cabe tener en cuenta que los datos proceden de centros de distintos países, con políticas de transferencia diferentes, esta realidad queda lejos de las esperanzas depositadas inicialmente en el PGS. De hecho, en los últimos años se ha generado una controversia en torno a la utilidad de esta estrategia: mientras algunos autores publican un incremento en la tasa de implantación de embriones de pacientes sometidos al PGS (Gianaroli et al., 1997; Munne et al., 1999, 2003), otros ponen de manifiesto que este sistema no es capaz de mejorar los resultados en mujeres de menos de 36 años (Staessen et al., 2008) o que incluso los empeora en mujeres de edad avanzada (Staessen et al., 2004; Mastenbroek et al., 2007; Hardarson et al., 2008).

Evaluando los resultados globales obtenidos hasta hoy, pues, es necesario hacer una reflexión sobre las estrategias utilizadas en el PGS, incidiendo en puntos esenciales como qué pacientes pueden beneficiarse del diagnóstico, qué técnica es la más idónea para el análisis cromosómico o en cuál estadio celular debe hacerse la biopsia.

INDICACIONES PARA EL PGS

EDAD MATERNA AVANZADA

Es bien sabido que a medida que aumenta la edad de la madre disminuye la tasa de implantación. Se han propuesto varios factores que podrían estar implicados en dicho declive, de los cuales los dos más aceptados son la disminución de la receptividad del útero y el envejecimiento de los ovocitos (Meldrum, 1993). No obstante, se han descrito tasas de embarazo elevadas en mujeres de edad avanzada receptoras de ovocitos de donantes jóvenes (Abdalla

et al., 1993; Sauer et al., 1996), por lo que el primer factor no quedaría claramente asociado a este fenómeno. En cambio, 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 (Nicolaidis y Petersen, 1998; Pellestor et al., 2003, 2005; Fragouli et al., 2006). Además, se han observado altas tasas de aneuploidía (40-80%) en embriones derivados de este grupo de pacientes (Gianaroli et al., 1997, 1999; Staessen et al., 2004; Platteau et al., 2005), independientemente de la morfología embrionaria. Por consiguiente, en mujeres de edad avanzada existe un elevado riesgo de no implantación, de aborto o incluso de tener descendencia que padezca síndromes originados por alteraciones cromosómicas. De hecho, se ha descrito un incremento exponencial de la incidencia del síndrome de Down con el aumento de la edad de la madre (Hassold y Jacobs, 1984). El riesgo también aumenta para el resto de trisomías viables (las de los cromosomas 13, 18, X e Y) (Warburton, 1986).

Parece evidente, pues, que la selección de embriones libres de alteraciones cromosómicas es una condición clave para aumentar el éxito reproductivo en este grupo de pacientes. Sin embargo, los resultados de distintos estudios clínicos aleatorizados (*randomized controlled trials*, RCT) de PGS en mujeres de edad avanzada son dispares: mientras algunos autores describen un claro incremento de la tasa de embarazo (Schoolcraft et al., 2010), otros no encuentran argumentos a favor del diagnóstico en términos de resultados clínicos por ciclo iniciado (Staessen et al., 2004; Mastenbroek et al., 2007; Hardarson et al., 2008; Schoolcraft et al., 2010). Sin embargo, algunos de estos estudios han sido

criticados por su diseño, es decir, por no incluir los pacientes adecuados, por el método de análisis utilizado, etc. (Munne et al., 2007). Como veremos más adelante, la estrategia utilizada para el cribado de aneuploidías puede influir enormemente en los resultados obtenidos.

ABORTOS DE REPETICIÓN

El término "abortos de repetición" se asigna a parejas que han sufrido dos o más abortos consecutivos. La prevalencia de este fenómeno en la población es del 1% y en el 50% de los casos no existe una causa aparente (Li et al., 2002). La presencia de alteraciones cromosómicas numéricas en abortos espontáneos (Hassold et al., 1980), así como su elevada incidencia (50-60%) en embriones de parejas con abortos de repetición no explicados (Pellicer et al., 1999; Rubio et al., 2003; Munne et al., 2005) hace pensar que, en estos casos, la aplicación del PGS podría ser beneficiosa. De todos modos, los estudios realizados hasta el momento son controvertidos y no está claro que la tasa de aborto pueda reducirse únicamente mediante una selección cromosómica (Werlin et al., 2003; Rubio et al., 2005; Munne et al., 2005), puesto que otros factores como la morfología embrionaria, la receptividad del endometrio o el sistema inmunitario podrían estar también implicados.

FALLOS RECURRENTES DE IMPLANTACIÓN

El término "fallos recurrentes de implantación" se asigna a pacientes que han realizado tres o más ciclos de FIV sin éxito o que no han conseguido el embarazo después de la transferencia de 10 embriones de buena calidad (en distintos ciclos de FIV) (ESHRE PGD Consortium Steering Committee, 2002). Del mismo modo que en los abortos de repetición, se cree que pueden existir muchos factores causantes del fallo implantatorio. La elevada incidencia de aneuploidía es uno de ellos, pero también lo son una receptividad endometrial disminuida, patologías uterinas o incluso una técnica de transferencia embrionaria inadecuada (Donoso et al., 2007). Se encuentran pocos datos publicados, pero existe controversia: algunos estudios no

muestran mejoría en los resultados clínicos del PGS (Gianaroli et al., 1999; Munne et al., 2003; Harper et al., 2006), mientras que otros describen tasas de implantación más elevadas (Pehlivan et al., 2003; Platteau et al., 2006).

FACTOR MASCULINO

El PGS también se recomienda a dos grupos en los que la aneuploidía parece tener un origen claramente masculino. El primer grupo es el de pacientes con azoospermia, obstructiva o no obstructiva, en los embriones derivados de los cuales se ha observado una elevada incidencia de alteraciones cromosómicas (Platteau et al., 2004; Rubio et al., 2005). El segundo grupo es el de pacientes con teratozoospermia severa, puesto que se ha detectado un número incrementado de aneuploidías en sus espermatozoides (Bernardini et al., 1998; Calogero et al., 2003). De todas formas, prácticamente no existen estudios que demuestren el efecto positivo del PGS sobre la tasa de implantación y embarazo en estos casos y, en consecuencia, se trata de una indicación minoritaria.

En cambio, el PGS sí se aplica a pacientes con resultados previos de Hibridación *in situ* Fluorescente (*Fluorescent in situ Hybridization*, FISH) alterada en espermatozoides o bien con resultados previos de meiosis alterada (Sanchez-Castro et al., 2009; Barri et al., 2005), independientemente de la calidad seminal.

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL PGS

HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE

En la mayoría de centros donde se practica el PGS, la estrategia más comúnmente utilizada es la biopsia de uno o dos blastómeros de los embriones en el día+3 del desarrollo y su posterior análisis citogenético mediante FISH. Esta técnica permite identificar algunos cromosomas predeterminados en el núcleo interfásico de la célula fijada. Consiste en la hibridación de sondas de DNA específicas (complementarias a determinadas regiones cromosómicas conocidas) marcadas con fluorocromos de colores distintos. Se trata de un procedimiento rápido y

sencillo, ya que el tiempo de hibridación puede durar entre una y 14 horas, aproximadamente, y el análisis de los resultados se lleva a cabo de forma muy ágil. Otra de las ventajas de la técnica es que permite identificar y localizar la presencia del material cromosómico *in situ*, es decir, en la muestra examinada; esto permite re-biopsiar una segunda célula para evitar embriones sin diagnóstico. Pero la FISH también presenta limitaciones: para poder aplicarla es necesario fijar previamente el material nuclear en un portaobjetos. Este proceso requiere gran habilidad y experiencia, de lo contrario, puede ocasionar pérdidas de cromatina, que se interpretarán como falsas pérdidas cromosómicas. Además, el hecho de que la FISH detecte un único *locus* en cada cromosoma hace la estrategia menos robusta y más susceptible de producir errores de diagnóstico. En ocasiones, las señales fluorescentes pueden ser difíciles de interpretar: por ejemplo, señales dobles pueden corresponder a regiones replicadas de un cromosoma y, en consecuencia, tratarse de disomías; o bien a duplicaciones cromosómicas, que producen trisomías. Asimismo, solapamientos de DNA pueden ser interpretados como falsas monosomías.

Por los motivos anteriores, se recomienda llevar a cabo el reanálisis de los núcleos con señales dudosas utilizando sondas distintas a las iniciales. Esta estrategia ha permitido disminuir la tasa de error de la FISH hasta el 4,7%, siempre que se desarrolle el proceso en condiciones óptimas (Colls et al., 2007).

De todos modos, la mayor limitación de la técnica es el número de cromosomas que se pueden analizar en un PGS, un máximo de 13 (Abdelhadi et al., 2003), aunque rutinariamente se suelen estudiar 9 cromosomas (Pujol et al., 2003). Es decir, entre 11 y 15 de los 24 tipos de cromosomas existentes (1-22, X e Y) quedan sin analizar. Esto es debido a la restricción en el número de fluorocromos disponibles y a la probabilidad de solapamiento de las señales (Wilton, 2005). Por lo tanto, es necesario hacer varias rondas de hibridación para poder analizar más de cinco cromosomas (el número de

cromosomas que se puede estudiar en una sola ronda), aunque se ha descrito que en la tercera ronda se daña ya gran parte de la cromatina (Liu et al., 1998). Así pues, no es posible examinar todo el complemento cromosómico de una célula mediante la FISH.

Éste podría ser el principal motivo por el cual la tasa de implantación de los embriones seleccionados y transferidos después del PGS es menor que la esperada, como hemos apuntado anteriormente, del 15% según los datos recopilados por la ESHRE PGD Consortium (Harper et al., 2010). Y es por eso que la tendencia actual en el PGS es pasar a la utilización de técnicas que permitan estudiar simultáneamente los 22 cromosomas autosómicos más los dos sexuales.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA

La Hibridación Genómica Comparada (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) es una de las técnicas mejor establecidas para el análisis completo del cariotipo humano. Fue descrita por Kallioniemi et al. en 1992 como método para detectar marcadores cromosómicos en el DNA tumoral. Posteriormente, su procedimiento se adaptó para el análisis de desequilibrios cromosómicos presentes en células aisladas, previa amplificación de su DNA (Voullaire et al., 1999; Wells et al., 1999).

El fundamento de la CGH reside en hibridar de forma competitiva, es decir, con una proporción 1:1, el DNA de una muestra problema (p.e., un blastómero aislado) y el de una célula control (p.e., un fibroblasto euploide) sobre metafases de linfocitos euploides (46,XY) fijadas en un portaobjetos. Antes de la hibridación, las muestras de DNA se marcan fluorescentemente con dos colores distintos, por ejemplo, en verde el DNA control y en rojo el DNA problema. Para la interpretación de los resultados es necesario disponer de un programa informático con el que capturar una docena de imágenes de metafases hibridadas por cada célula problema, realizar su cariotipo y evaluar la ratio entre las dos fluorescencias hibridadas en cada uno de los cromosomas. Si la intensidad de la fluorescencia para un cromosoma en concreto es igual en las dos muestras

(control y problema), este cromosoma se visualiza en la metafase de color amarillo/naranja (verde + rojo). En cambio, si la intensidad de fluorescencia de la muestra problema es superior a la de la muestra control (rojo > verde) el cromosoma metafásico en cuestión se observará más rojo. Por el contrario, si la intensidad de fluorescencia de la muestra problema es inferior a la de la muestra control (rojo < verde) el cromosoma metafásico en cuestión se observará más verde. A partir de los resultados obtenidos, el programa informa de las ganancias y pérdidas de cualquier cromosoma, de modo que se obtiene un diagnóstico citogenético completo de la célula problema.

Así pues, la CGH permite analizar todos los cromosomas y en toda su longitud, siendo su límite de resolución de 10-20 Mb, por lo que, aparte de las alteraciones que afectan a todo el cromosoma, se pueden detectar también alteraciones parciales de los cromosomas. Además, la CGH aplicada al análisis de una sola célula tiene una gran ventaja: la célula analizada se introduce en un tubo de PCR para su lisis y posterior amplificación en vez de ser fijada en un portaobjetos. El éxito de diagnóstico mediante esta técnica es aproximadamente del 94% (Gutierrez-Mateo et al., 2004; Schoolcraft et al., 2010).

Sin embargo, la CGH también presenta limitaciones. Una de ellas es el hecho de que no permite detectar cambios de ploidía (triploidías, tetraploidías, etc.) ni tampoco permite distinguir entre euploidía y presencia de alteraciones cromosómicas equilibradas (aunque éstas no tienen significancia clínica). En cuanto al procedimiento, esta técnica requiere una gran especialización del personal que la realiza, tanto para el procesado de las muestras como para el análisis de los resultados. En la CGH convencional el tiempo necesario para llevar a cabo todo el proceso es de aproximadamente cuatro días, ya que la hibridación transcurre durante 40-72h; lo que implica la criopreservación de los embriones biopsiados en el PGD de blastómeros en día+3 y la transferencia de los seleccionados en un ciclo adicional posterior. Aunque las técnicas de vitrificación han incrementado el éxito de la criopreservación y la supervivencia de los embriones después de la descongelación,

la situación ideal es evitar este proceso en el ciclo de FIV con PGS. Con esta finalidad, se ha desarrollado hace poco una versión modificada de la CGH convencional, la CGH rápida (Rius et al., 2010, 2011) con la que se obtienen los resultados en poco más de 24 horas, gracias a una reducción del tiempo de hibridación hasta 12 horas. Esta técnica rinde un éxito de diagnóstico del 94% (Rius et al., 2010). Al obtener los resultados el día+4, se puede realizar la transferencia "en fresco" de los embriones seleccionados en el mismo ciclo de FIV, evitando la criopreservación y el retraso de la transferencia embrionaria.

MICROARRAYS

Recientemente, la metodología de la CGH convencional se ha adaptado a la tecnología de los *microarrays*, lo que ha originado una nueva variedad de la CGH, el *array*-CGH (Hu et al., 2004; Le Caigne et al., 2006; Wells et al., 2008). Con esta estrategia, los DNAs problema y control no se hibridan sobre metafases de linfocitos fijadas en un portaobjetos común, sino que se utiliza un portaobjetos en el que se han adherido secuencias de DNA que cubren todo el genoma. Por tanto, el resultado de la CGH se obtiene evaluando la fluorescencia hibridada en cada uno de los puntos que contiene el *microarray*. Esta tecnología tiene dos ventajas respecto a la CGH convencional:

En primer lugar, la resolución es más elevada, ya que viene dada por el tamaño de las secuencias adheridas en el portaobjetos. Aun así, los criterios de análisis disponibles hasta el momento únicamente permiten detectar con seguridad alteraciones que involucren unas 10 Mb del cromosoma (Hellani et al., 2008; Vanneste et al., 2009). En segundo lugar, la duración del proceso puede llegar a ser de 16-18 horas y el análisis de los resultados se hace de forma automatizada, por lo que, al igual que con la CGH rápida, se puede hacer la transferencia de los embriones seleccionados durante el mismo ciclo de FIV. Actualmente ya se han llevado a cabo algunas aplicaciones clínicas del *array*-CGH (Hellani et al., 2008; Fishel et al., 2010) con resultados esperanzadores, a la vez que se avanza en la validación de la metodología (Gutierrez-Mateo et al., 2010) para asegurar la fiabilidad del diagnóstico en el PGS. El éxito de

diagnóstico mediante *array*-CGH es del 89% (Gutierrez-Mateo et al., 2010).

Otro sistema desarrollado con *microarrays* es el del *array*-SNPs, que puede ofrecer un análisis más completo del DNA problema (Handyside et al., 2009). Esta técnica utiliza un portaobjetos en el que se han adherido secuencias de DNA polimórficas, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), que se encuentran repartidas por todo el genoma. Con los *array*-SNPs, no sólo se puede determinar el número de copias de un cromosoma, sino que además se obtiene una "huella dactilar" única del DNA analizado, que identifica el genotipo de la muestra problema. En este caso, el DNA control y el problema se hibridan separadamente en distintas áreas de SNPs de un mismo portaobjetos y se puede utilizar el mismo fluorocromo para marcarlos. El número de copias de cada cromosoma se calcula comparando 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., 2010). Esta metodología podría tener un gran potencial de aplicación, pero a día de hoy una de las limitaciones más importantes es la falta de precisión en el diagnóstico. Para solucionar este problema, es necesario analizar un gran número de SNPs y realizar un procesamiento estadístico de los datos. Además, para poder comprender y valorar los resultados es necesario el análisis del DNA parental, lo que supone un proceso previo añadido. La complejidad del sistema hace que de momento su coste sea muy elevado y quede limitado a una pequeña parte de pacientes.

ESTADIO CELULAR Y MOSAICISMO

Uno de los temas más polémicos en el campo del PGS, a parte de la técnica utilizada, es el estadio celular en el cual debe realizarse el diagnóstico. Y la controversia ha surgido, principalmente, debido a la existencia de mosaicismo. El mosaicismo es la presencia de dos o más líneas celulares cromosómicamente distintas en un mismo embrión, y es un fenómeno muy común en embriones humanos (Munne et al., 1994a; Vanneste et al., 2009). Recopilando varios estudios de FISH, se ha visto que la proporción de embriones que presentan mosaicismo se encuentra entre el 25% y el 60%

(Bielanska et al., 2002; Wilton, 2005). Aunque se cree que este fenómeno podría tener un predominio en embriones en estadio de día+3, se ha observado tanto en embriones de 6-8 células (Munne et al., 1994b; Delhanty et al., 1997), como en blastocistos (Evsikov y Verlinsky, 1998; Coonen et al., 2004; Daphnis et al., 2008). Por el hecho de que la célula diagnosticada puede tener una dotación cromosómica distinta a la del resto, el mosaicismo es uno de los principales obstáculos del PGS en embriones.

Una de las estrategias que está tomando de nuevo fuerza en el PGS es el análisis del primerysegundocorpúsculos polares (1CP, 2CP) (Verlinsky et al., 2001; Wells et al., 2002; Obradors et al., 2008, 2009; Kuliev et al., 2011). Estas dos células tienen una dotación cromosómica complementaria a la del ovocito en estadio de metafase II (MII), por lo que con su análisis se obtiene un diagnóstico indirecto de la composición cromosómica del ovocito. El estudio del gameto femenino se basa en que aproximadamente el 90% de las aneuploidías encontradas en los embriones son de origen materno (Nicolaidis y Petersen, 1998). Las principales ventajas de esta estrategia son que se analiza una célula que no interfiere en el desarrollo embrionario y, tanto con FISH como con CGH, se evita la criopreservación. Pero no pueden detectarse ni los errores cromosómicos de origen paterno, ni los errores mitóticos producidos en la etapa poszigótica, que generan mosaicismo en el embrión.

Sin embargo, la estrategia más comúnmente utilizada para el PGS en la actualidad es el análisis de blastómeros de los embriones en día+3. De hecho, según los datos recopilados por el ESHRE PGD Consortium (Harper et al., 2010), en el 83% de los casos de PGS se ha utilizado la biopsia de blastómero. Esta estrategia permite detectar alteraciones cromosómicas de origen tanto paterno como materno, así como posibles anomalías generadas en las primeras divisiones mitóticas del embrión.

Para poder detectar el mosaicismo, se ha propuesto realizar la biopsia y el análisis de dos blastómeros (Baart et al., 2006). Aunque se han descrito tasas de implantación aceptables siguiendo este método (Van de Velde et al., 2000), otros

estudios recomiendan una estrategia menos invasiva, biopsiando un solo blastómero, ya que la biopsia de más de una célula puede comprometer la viabilidad del embrión (Goossens et al., 2008; De Vos et al., 2009).

Por otro lado, algunos autores argumentan que la constitución cromosómica de los blastómeros de embriones en día+3 podría no representar correctamente la del embrión que implanta (en estadio de blastocisto) (Li et al., 2005; Fragouli et al., 2008; Barbash-Hazan et al., 2009). En esta línea, se ha postulado que algunos embriones mosaicos con células euploides y aneuploides podrían llevar a cabo una autocorrección de las alteraciones cromosómicas mediante el crecimiento preferencial de las células euploides sobre las aneuploides, durante los primeros estadios de la embriogénesis y después de la implantación (Li et al., 2005; Barbash-Hazan et al., 2009). Contrariamente, otros estudios sugieren que estos embriones podrían acumular más alteraciones cromosómicas causadas por errores mitóticos (Munne et al., 2005; DeUgarte et al., 2008).

Independientemente de si existe corrección o acumulación de errores cromosómicos, recientemente se ha promocionado el análisis del trofoectodermo de blastocistos como estrategia de PGS, con el fin de obtener el diagnóstico del embrión en el momento más próximo a la implantación. En este caso, se podrían analizar varias células utilizando la FISH (McArthur et al., 2005), hecho que permitiría una mayor detección del mosaicismo. Pero consustancial a la FISH, reside el problema de la limitación en el número de cromosomas estudiados. Utilizando la CGH convencional, rápida o el *array*-CGH, se logra un análisis completo del cariotipo, aunque las 5-10 células del trofoectodermo que se obtienen por biopsia se procesan y analizan conjuntamente (Fragouli et al., 2008; Schoolcraft et al., 2010). Por un lado, el análisis de varias células juntas ofrece un diagnóstico más robusto; por otro lado, al obtener un resultado que representa una media de las distintas células, tampoco se puede descartar la presencia de mosaicismo. Se ha postulado que, con este método, sólo se detecta la aneuploidía que realmente podría tener una repercusión en el desarrollo del

embrión, y que alteraciones presentes en una frecuencia menor a un tercio de las células (no detectables mediante CGH) no tendrían relevancia clínica (Fragouli et al., 2008). Si esta hipótesis se confirma, el PGS aplicado al trofoectodermo podría representar una potente herramienta de selección embrionaria. Aparte, hay que tomar en consideración que el PGS aplicado a blastocistos no es apropiado para pacientes que producen embriones con poco potencial de desarrollo *in vitro* y se requiere la optimización del laboratorio de FIV para cultivar con éxito los embriones hasta el estadio de blastocisto. Otra limitación de esta estrategia es que requiere la criopreservación de los embriones biopsiados mientras se obtienen los resultados.

Como hemos visto, el diagnóstico de aneuploidías puede ser beneficioso en casos de edad materna avanzada, abortos de repetición, fallos repetidos de implantación y casos de factor masculino severo. Pero se debe tener en cuenta que existen muchos factores que contribuyen al éxito del PGS. Aunque tradicionalmente se ha utilizado la FISH como método de análisis por su sencillez y rapidez, la limitación en el número de cromosomas examinados ha hecho que se desarrollen otras estrategias para el estudio de todo el complemento cromosómico, como la CGH y su versión rápida, el *array*-CGH o el *array*-SNPs. Estas técnicas pueden aplicarse tanto para el análisis del primer y segundo corpúsculos polares, de blastómeros o bien de algunas células del trofoectodermo de los blastocistos. Cada estrategia presenta ventajas y desventajas respecto a las demás, si bien es verdad que ninguna de ellas evita el obstáculo del mosaicismo. La realización de estudios clínicos aleatorizados en que se prueben las nuevas metodologías, confirmarán si estas técnicas contribuyen a aumentar el éxito del PGS, incrementando la tasa de implantación de los embriones seleccionados y transferidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA et al. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod* 1993;8:1512-1517.

Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T and Munne S. Preimplantation genetic

diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 2003;6:226-231.

Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006;21:223-233.

Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril* 2009;92:890-896.

Barri PN, Vendrell JM, Martinez F, Coroleu B, Aran B and Veiga A. Influence of spermatogenic profile and meiotic abnormalities on reproductive outcome of infertile patients. *Reprod Biomed Online* 2005;10:735-739.

Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 1998;13:3406-3413.

Bielanska M, Tan SL and Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002;17:413-419.

Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R and Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online* 2003;6:310-317.

Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J and Munne S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril* 2007;88:53-61.

Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M et al. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2004;19:316-324.

Daphnis DD, Fragouli E, Economou K, Jerkovic S, Craft IL, Delhanty JD et al. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:117-125.

De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P et al. Impact of

cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod* 2009;24:2988-2996.

Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH and Winston RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997;99:755-760.

DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D and DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2008;90:1049-1054.

Donoso P, Staessen C, Fauser BC and Devroey P. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. *Hum Reprod Update* 2007;13:15-25.

ESHRE PGD Consortium Steering Committee (2002) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III. *Hum Reprod* 2001;17:233-246.

Evsikov S and Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998;13:3151-3155.

Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy—the future of IVF? *Fertil Steril* 2010;93:1006 e1007-1006 e1010.

Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC et al. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006;21:2319-2328.

Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB and Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod* 2008;23:2596-2608.

Gianaroli L, Magli MC, Munne S, Fiorentino A, Montanaro N and Ferraretti AP. Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod* 1997;12:1762-1767.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP and Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing *in vitro* fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999;72:837-844.

- Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2008;23:481-492.
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004;19:2118-2125.
- Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2010; [Epub ahead of print]
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K and Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-770.
- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2009;47:651-658.
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008;23:2806-2812.
- Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C et al. ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod* 2006;21:3-21.
- Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod* 2010;25:2685-2707.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980;44:151-178.
- Hassold TJ and Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 1984;18:69-97.
- Hu DG, Webb G and Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2004;10:283-289.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-821.
- Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, Spivakova J and Cieslak Janzen J. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 2011;22:2-8.
- Le Caignec C, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Thienpont B, Debrock S et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e68.
- Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A and Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril* 2005;84:1395-1400.
- Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E and Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 2002;8:463-481.
- Liu J, Tsai YL, Zheng XZ, Yazigi RA, Baramki TA, Compton G et al. Feasibility study of repeated fluorescent in-situ hybridization in the same human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1998;4:972-977.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9-17.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA and Jansen RP. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 2005;84:1628-1636.
- Meldrum DR. Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertil Steril* 1993;59:1-5.
- Munne S, Weier HU, Grifo J and Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994a;51:373-379.
- Munne S, Grifo J, Cohen J and Weier HU. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 1994b;55:150-159.
- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J and Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 1995;10:1014-1020.
- Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999;14:2191-2199.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91-97.
- Munne S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005;84:331-335.
- Munne S, Gianaroli L, Tur-Kaspa I, Magli C, Sandalinas M, Grifo J et al. Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertil Steril* 2007;88:781-784.
- Nicolaidis P and Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998;13:313-319.
- Obradors A, Fernandez E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D et al. 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* 2008;23:1949-1956.
- Obradors A, Fernandez E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martinez-Fresno M, Benet J et al. Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2009;91:933 e931-937.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simon C et al. Impact of

- preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online* 2003;6:232-237.
- Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C and Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003;112:195-203.
- Pellestor F, Anahory T and Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:206-212.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Minguez Y, Gimenez C, Egozcue J et al. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999;71:1033-1039.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I et al. Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 2004;19:1570-1574.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I and Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. *Fertil Steril* 2005;84:319-324.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I and Devroey P. Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening? *Reprod Biomed Online* 2006;12:334-339.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M et al. Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 2003;11:325-336.
- Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marques L, Calderon G et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 2010;25:1824-1835.
- Rius M, Daina G, Obradors A, Ramos L, Velilla E, Fernandez S et al. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;95:413-416.
- Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003;18:182-188.
- Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendia P et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005;11:497-506.
- Sanchez-Castro M, Jimenez-Macedo AR, Sandalinas M and Blanco J. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD. *Hum Reprod* 2009;24:1516-1521.
- Sauer MV, Paulson RJ and Lobo RA. Oocyte donation to women of advanced reproductive age: pregnancy results and obstetrical outcomes in patients 45 years and older. *Hum Reprod* 1996;11:2540-2543.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG and Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010;94:1700-1706.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M et al. 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* 2004;19:2849-2858.
- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I et al. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 2008;23:2818-2825.
- Treff NR, Northrop LE, Kasabwala K, Su J, Levy B and Scott RT, Jr. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. *Fertil Steril* 2010; [Epub ahead of print]
- Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2000;20:1030-1037.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577-583.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in situ hybridization. *Hum Reprod* 1995;10:1923-1927.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M et al. Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183 Suppl 1:S47-49.
- Voullaire L, Wilton L, Slater H and Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999;19:846-851.
- Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. *Perinatal Genetics: diagnosis and treatment*. In: Porter L, Willey A (eds), Academic press, New York 1986;133-148.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH and Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1214-1218.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD and Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;78:543-549.
- Wells D, Alfarawati S and Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:703-710.
- Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Mareello E, Hill D and Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003;80:467-468.
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005;11:33-41.



¿Sabe que
están haciendo
sus embriones
mientras duerme?



EmbryoScope™ Embryo Monitoring System

Monitorización continua de los embriones en cultivo



EmbryoViewer™ Workstation

Sistema de gestión de datos en 4D



EmbryoSlide® Culture Dish

Condiciones de cultivo controladas

Sistema de Time-lapse

Observación permanente de los embriones para una mejor toma de decisiones

Cultivo sin interrupciones

Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado

Evaluación flexible

En cualquier momento, en cualquier lugar, no se pierda nada

Información completa en 4D

Haga un mejor análisis teniendo toda la información

OLYMPUS

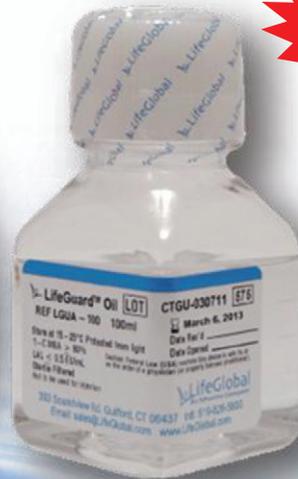
Your Vision, Our Future


UNISENSE®
FERTILITECH

Nuevo **Global Total™**, suplementado con Albúmina enriquecida con α y β Globulinas



Nuevo **LifeGuard™** Aceite de alta calidad con alta viscosidad para proteger el embrión humano



Sistema S3 para la Vitrificación de Blastocistos Humanos:

- No contiene DMSO
- Glicerol y Etileno Glicol, como Crioprotectores. Global w/ Hepes, como medio base
- Sistema de sellado cerrado, con pajuelas convencionales



Pipetas ICSI



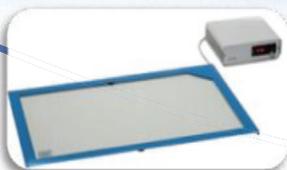
Agujas Punción OPS



Catéter de Transferencia Full Echo



Catéter de Transferencia Pearl Tip



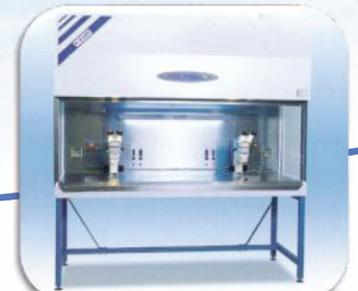
Placas Calefactadas



Selladora por ultrasonidos



Baño en seco



Estación de trabajo