

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Programa Oficial de Doctorat de Biomedicina i Biotecnologia



**MEJORA EN LA DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y
ESPECIFICIDAD DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO
PREIMPLANTACIONAL EN BIOPSIAS DE BLASTÓMERA Y DE
TROFOECTODERMO EN EMBRIONES HUMANOS**

Trabajo de Tesis Doctoral presentado por:

Pere Mir Pardo

Codirectores:

Dra. Carmen Rubio Lluesa y Dr. Carlos Simón Vallés

Valencia, Diciembre de 2017

D^a. Carmen Rubio Lluesa, Doctora en Ciencias Biológicas, y

D. Carlos Simón Vallés, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Mejora en la detección de aneuploidías y especificidad del diagnóstico genético preimplantacional en biopsias de blastómera y de trofoectodermo en embriones humanos”, ha sido realizado por D. Pere Mir Pardo bajo nuestra supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia, a 21 de Diciembre de 2017.

Fdo. D^a. Carmen Rubio Lluesa

Fdo. D. Carlos Simón Vallés

Fdo. Pere Mir Pardo

AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral sin agradecimientos es como un jardín sin flores...pero para mí, en esta tesis lo es más si cabe (y aunque no lo parezca, sí cabe...lo siento, soy así, por suerte sin remedio ☺). Ahora que veo la tesis escrita, he sentido que esta tesis (y lo acontecido a su alrededor) refleja bastante mi *modus vivendi*.

Un claro ejemplo de ello es que estoy escribiendo los agradecimientos justo 10 minutos antes de enviar la versión final a imprenta, tratando únicamente de expresar lo que siento, y no lo que debería decir o lo que esperáis que escriba.

Como en mi vida, esta tesis es el resultado del esfuerzo de muchas personas, y por suerte infinita para mí, es el resultado de varias personas excepcionalmente admirables y bondadosas, que me han hecho creer que esto merecía la pena cuando, personalmente, ya estaba decidido a no seguir adelante con todo esto.

De lo que más orgulloso me siento en mi vida es de la familia que tengo, de verdad, puede sonar un clásico, pero no lo es, es verdad verdadera. Sin ellos, y sin su capacidad de aguantarme y entenderme (eso dicen ellos), esta tesis (como vida) no habría sido posible: **moltíssimes gràcies família...sabeu que sou lo millor del món, i que gran part d'este llibret és vostre també**. Pero soy mucho más afortunado aún, pues mi familia también la componen un montón de amigas y amigos, y esa parte de mi familia también ha tenido que soportarme y también cree entenderme. Además, esta tesis ha sido tan larga, que hasta cambié de compañera de viaje: deseo darle las gracias muy especialmente por haber sabido estar en cada momento donde debía (o donde las circunstancias permitían), pero sobre todo por estar en el día a día haciendo y convenciendo para que esto fuese posible, y ayudando de manera incondicional: **eternamente gracias**.

Indiscutiblemente, tampoco sería posible sin la ayuda inestimable de las biopsiadoras, esas embriólogas estupendas que nos han proveído de muestras (cuando parecía que ya estaban todas las muestras...hacía falta alguna más); y sin la ayuda de todas las compañeras de trabajo que han ayudado en mayor o menor medida a contribuir a los resultados de la tesis (¡cuánta faena os he dado...pero aquí tenemos la tesis finalmente!). De entre mis compañeras, quiero resaltar un nombre: **Carmen**. Tú eres artífice de esta tesis, desde el principio, tanto de esta tesis como de la mayoría de mis éxitos profesionales. Ejemplar como persona, como compañera, y como jefa. Para ti solo puede haber palabras de gratitud, y lo puedes comprobar en todas las buenas personas que te rodean. No hay manera de definir la bondad y el buen hacer de tu persona de otra manera: simplemente Carmen.

Finalmente, y no por ello menos importante, quiero agradecer a mis directores de tesis: Dra. Carmen Rubio Lluesa y Dr. Carlos Simón Vallés; por todo el esfuerzo realizado para la consecución de la tesis.

Como podéis ver, esto no es un “gracias“ forzado, si no un “¡¡¡MUCHÍSIMAS GRACIAS!!!” muy real y con todo mi sentimiento. Ya solo nos queda celebrarlo juntos, y seguir disfrutando la vida cada día. Família, sabeu que dia que passa no torna.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Incidencia de aneuploidías en la especie humana	
1.1.1 En embriones humanos preimplantacionales	
1.1.2 En abortos espontáneos	
1.1.3 En recién nacidos vivos	
1.2 Evolución metodológica del Diagnóstico Genético Preimplantacional para aneuploidías (DGP-A)	
1.2.1 Tipos de biopsia embrionaria	
1.2.2 Tecnologías de análisis cromosómico	
1.3 Limitaciones del DGP-A	
1.3.1 Cantidad de material genético disponible para el análisis	
1.3.2 Técnica de análisis	
1.3.3 Tipo de biopsia	
1.3.4 Mosaicismo embrionario	
1.4 Indicaciones clínicas actuales del DGP-A	
1.4.1 Edad materna avanzada	
1.4.2 Parejas con fallo repetido de implantación	
1.4.3 Parejas con abortos recurrentes	
1.4.4 Factor masculino	
1.4.5 Parejas con trisomía previa	
1.4.6 Pacientes con buen pronóstico reproductivo	
2. OBJETIVOS	29
3. METODOLOGÍA	32
3.1 Diseño experimental	
3.2 Ciclo de Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) y cultivo embrionario	
3.3 Técnicas de biopsia	
3.3.1 Biopsia embrionaria en día 3	
3.3.2 Biopsia embrionaria en día 4	
3.3.3 Biopsia de trofoectodermo	
3.4. Técnicas de análisis de aneuploidías	
3.4.1 Análisis de blastómeras individuales mediante FISH	
3.4.2 Reanálisis de células de blastocisto mediante FISH	
3.4.3 Análisis de biopsia embrionaria y reanálisis de blastocisto entero mediante array-CGH	

4. RESULTADOS	45
4.1.1. Evaluación de la incorporación de rehibridaciones en el diagnóstico mediante de FISH de biopsias embrionarias de día 3	
4.1.2. Comparación de la tasa de falsos positivos de la técnica de FISH en biopsias de día 3, con y sin rehibridaciones	
4.2.1. Evaluación de la capacidad de detección de aneuploidías de la técnica de array-CGH en embriones inicialmente biopsiados en día 3 y analizados con FISH.	
4.2.2. Comparación de la tasa de falsos positivos de la técnica de array-CGH <i>versus</i> la técnica de FISH en biopsia embrionaria en día 3.	
4.3.1. Comparación de la tasa de falsos positivos en DGP-A mediante técnica array-CGH en biopsias de día 3 <i>versus</i> biopsias de trofoectodermo. Análisis según el diagnóstico de cada embrión.	
4.3.2. Comparación de la tasa de falsos positivos en DGP-A mediante técnica array-CGH en biopsias de día 3 <i>versus</i> biopsias de trofoectodermo. Análisis según el resultado por cromosoma.	
5. DISCUSIÓN	61
5.1. Acerca del diseño	
5.2. Acerca de la tecnología aplicada en DGP-A	
5.3. Acerca del tipo de biopsia embrionaria	
5.4. Impacto del mosaicismo en los resultados de DGP-A	
6. CONCLUSIONES	69
7. REFERENCIAS	73
8. Glosario de abreviaturas	81

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Incidencia de aneuploidías en la especie humana

La presencia de aneuploidías en la especie humana es conocida desde 1959 cuando se detectaron las primeras aneuploidías asociadas a síndromes con defectos congénitos (Jacobs *et al.* 1959). Desde entonces, las aneuploidías han sido descritas en las diferentes etapas del desarrollo desde la formación de gametos, pasando por embriones, hasta llegar al individuo adulto (Hassold *et al.* 1996).

Actualmente, se sabe que, a diferencia del resto de mamíferos, la incidencia de aneuploidías en la especie humana es sorprendentemente común, lo cual enfatiza la importancia de su conocimiento y manejo a nivel clínico. La existencia de alteraciones cromosómicas va disminuyendo progresivamente durante el desarrollo, primeramente, debido a detenciones durante el desarrollo temprano del embrión, y posteriormente durante el desarrollo fetal. Aun así, al menos un 5% de gestaciones clínicamente reconocibles presentan algún tipo de aneuploidía, siendo responsables de que la mayoría de estas gestaciones terminen en aborto antes de la semana 12-14 de gestación, salvo casos en los que dicha aneuploidía es compatible con la vida. En estos casos, es responsable del nacimiento de niños con defectos congénitos (Jacobs *et al.* 1974, Nielsen *et al.* 1991, Hassold *et al.* 2001).

1.1.1 En embriones humanos preimplantacionales

El embrión humano es resultado de la unión de un gameto masculino y otro femenino, por lo tanto, si al menos uno de ellos es cromosómicamente anormal, el embrión resultante será cromosómicamente anormal. La tasa de aneuploidías en embriones humanos preimplantacionales es realmente complicada de calcular, y en la literatura, dependiendo de la técnica de análisis y del grupo de individuos incluidos en el estudio, el rango de aneuploidías encontrado es altamente variable (5%-90%) (Capalbo *et al.* 2017a). La tasa de aneuploidías en embriones se estimó inicialmente con los primeros estudios realizados mediante la técnica de FISH (de sus siglas en inglés de *fluorescence in situ hybridization*). Posteriormente, otros autores argumentaron que mediante esta técnica, sobre todo si no se trabaja de la manera sistemática adecuada, se diagnosticaba un número de aneuploidías mayor del realmente presente en los embriones analizados (Colls *et al.*, 2007), debido principalmente a artefactos creados por la manera de trabajar con esta técnica en el diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías (DGP-A), y que por tanto no todos estos resultados mediante FISH eran válidos para estimar la tasa real de aneuploidías ni la tasa real de falsos positivos de dicha técnica en DGP-A (Simpson 2008, Rubio *et al.*, 2009).

Debido a esta situación, para estimar la tasa de aneuploidías en embriones humanos, es preferible basarse en los datos aportados por los trabajos más recientes, los cuales han sido realizados con técnicas que permiten el análisis de aneuploidías en todos los cromosomas humanos simultáneamente, como array-CGH (en inglés *Array-Comparative Genomic Hybridization*) o NGS (en inglés *Next Generation Sequencing*) y que además presentan una alta tasa de concordancia entre el resultado de la biopsia embrionaria y el resultado del reanálisis del resto del embrión (Simpson *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta el hecho diferencial que la edad materna representa en la tasa de aneuploidías, procedemos a analizar los resultados de dichos trabajos en dos grupos:

- Pacientes “jóvenes” sin indicación clínica para DGP-A (mujeres en principio menores de 35 años), en las cuales se esperaría una tasa de aneuploidías menor. Podemos encontrar en la

literatura incidencia de aneuploidías en blastocistos en el rango de: 28,6% (edad media $32,2\pm 0,5$) (Scott *et al.*, 2013a), 31,1% (edad media $35,1\pm 3,9$) (Forman *et al.*, 2013), hasta 44,9% (media de edad $31,2 \pm 2,5$) (Yang *et al.*, 2012).

- Pacientes con indicación clínica para DGP-A. Las indicaciones clínicas actuales para DGP-A se detallarán a continuación, y en todos estos grupos, la tasa media de aneuploidías en embriones de esas pacientes es superior a la observada en grupos de pacientes jóvenes. La edad materna es la condición que más influye en la tasa de aneuploidías, pudiendo llegar hasta valores en torno al 85% en pacientes con edad superior a 42 años (Franasiak *et al.*, 2014).

1.1.2 En abortos espontáneos

El estudio más amplio de diagnóstico prenatal con 46.939 casos de gestaciones analizadas mediante amniocentesis o vellosidades coriales, muestra una incidencia global de aneuploidías del 1,5%, que casi se duplica en el grupo de pacientes mayores de 35 años (Bianco *et al.*, 2006). En general, entre un 10-15% de gestaciones terminan en aborto, y en torno al 50% de estos casos son debidos a la presencia de aneuploidías en el feto (Lathi *et al.*, 2011). De hecho, la causa más frecuente de abortos idiopáticos recurrentes es la presencia de aneuploidías en el feto (Warren *et al.*, 2008, Hodes-Wertz *et al.*, 2012). Tal y como hemos citado en el apartado anterior, la presencia de aneuploidías en abortos también está directamente relacionada con la edad materna, siendo mayor cuanto mayor es la edad de la gestante (Hassold *et al.* 1980, Nybo-Andersen *et al.* 2000, Bianco *et al.*, 2006, Campos-Galindo *et al.*, 2015).

Estos datos coinciden con los resultados de un reciente estudio en el que se analizaron los restos abortivos en parejas de un programa de fecundación in vitro (FIV) con transferencia de blastocistos de buena morfología. En este estudio, la presencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos es del 80.6%, siendo aneuploidías el 75.2% de ellas (70.7% trisomías y 4.5% monosomías), mientras que el 2.4% de casos presentaban anomalías cromosómicas estructurales, 1.1% mosaicismo embrionario, 1% poliploidía y el restante 1% anomalías mixtas (Segawa *et al.* 2017). La media de edad de las 1030 pacientes incluidas en este estudio fue de 39 ± 3.4 años (siendo el rango entre 25 y 46 años), y sus causas de infertilidad eran desconocidas en un 61.7% de los casos, factor masculino en un 27.6% y aborto de repetición en un 10.7% (considerado como 2 o más abortos) (Segawa *et al.* 2017).

1.1.3 En recién nacidos

Los trabajos iniciales de frecuencia de defectos congénitos en recién nacidos estimaban una tasa de estas anomalías en torno al 4% (Jacobs *et al.*, 1974). Con los datos recopilados hasta la actualidad, se ha descrito que entre el 2% al 4% de nacidos presentan algún defecto congénito (Harris *et al.*, 2017). En este estadio del desarrollo, las aneuploidías son la causa más frecuente de defectos congénitos y de retraso mental (Hassold *et al.*, 2001), pero no todos ellos son debidos a anomalías cromosómicas. Las aneuploidías más comúnmente encontradas en recién nacidos vivos son las relacionadas con los cromosomas sexuales (X e Y), en concreto la trisomía XXY con una prevalencia de 1/500 (0,2%) nacidos vivos (Visoosak *et al.*, 2006), y la monosomía para el cromosoma X con una prevalencia de 32/10,000 (0,03%) (Gravholt *et al.*, 1996); así como la trisomía para el cromosoma 21, con un riesgo en población general de 1/800 nacidos vivos (0,125%) (Roizen and Patterson, 2003) (Tabla 1). Estas aneuploidías compatibles con la vida también pueden encontrarse en mosaicismo en el nacido vivo y en individuos adultos (Roizen and Patterson, 2003).

Recientemente, la disponibilidad de estudios de GWAS (*genome-wide association study*), ha revelado la presencia de mosaicismo afectando a regiones cromosómicas pequeñas. En concreto, el metaanálisis más reciente que recopila datos de 127.179 individuos adultos muestra una tasa de alteraciones estructurales en autosomas mayores de 2 Mb de 0,73% (Machiela *et al.*, 2015).

Estadio del desarrollo		Incidencia aneuploidías	Aneuploidías más frecuentes	Método análisis	Año del estudio	Referencias
Gametos	Espermatozoide	1-4%	Disomías XY, +13, +21, +22	FISH	1990 - actualidad	Rodrigo <i>et al.</i> , 2004; Templado <i>et al.</i> , 2011
	Óvulo	20-70%	Disomías +15, +16, +17, +18, +21, +22	FISH / array-CGH	1990 - actualidad	Obradors <i>et al.</i> , 2011; Montag <i>et al.</i> , 2013
Embrión preimplantacional	Biopsia blastómera	30-90%*	Trisomías +15, +16, +21, +22	array-CGH	2000 - actualidad	Kelts <i>et al.</i> , 2013; Rodrigo <i>et al.</i> , 2014
	Biopsia trofoectodermo	25-85%*	Trisomías +15, +16, +21, +22	array-CGH	2000 - actualidad	Yang <i>et al.</i> , 2012; Franasiak <i>et al.</i> , 2014
Abortos espontáneos	Población general	>35%	Monosomía X; trisomías +15, +16, +21, +22	Cariotipo / array-CGH	1970- actualidad	Hassold <i>et al.</i> , 1996; Sugiura-Ogasawara <i>et al.</i> , 2012
	Pacientes de FIV	28-80%	Monosomía X; trisomías +15, +16, +21, +22	Cariotipo / array-CGH	2000- actualidad	Campos-Galindo <i>et al.</i> , 2015; Segawa <i>et al.</i> , 2017
Muerte perinatal		4%	Monosomía X; trisomías +13, +18, +21, XXX, XXY	Cariotipo	1970-1980	Jacobs <i>et al.</i> , 1992; Hassold <i>et al.</i> , 1996
Nacido vivo		0,4%	Trisomías XXY, XXX, XYY, +13, +18, +21; monosomía X	Cariotipo	1960-1980	Hassold <i>et al.</i> , 1996

Tabla 1. Resumen de la incidencia de aneuploidías encontradas en los distintos estadios del desarrollo en la especie humana. Modificado y actualizado a partir de Nagaoka *et al.*, 2012. *Estos rangos de aneuploidías corresponden a las tasas de aneuploidías máximas y mínimas publicadas para los trabajos citados en cada uno de los tipos de biopsia, teniendo en cuenta todos los rangos de edad y análisis mediante la técnica de array-CGH que permite analizar todos los cromosomas.

1.2. Evolución metodológica del Diagnóstico Genético Preimplantacional para aneuploidías (DGP-A)

La misión principal del DGP consiste en la detección precoz de ciertas anomalías genéticas (bien cromosómicas, bien génicas). Esta detección precoz ocurre en embriones preimplantacionales mediante el análisis de una biopsia embrionaria. Tras el análisis de dicha biopsia, los embriones diagnosticados como genéticamente anormales serán descartados, y únicamente los embriones genéticamente normales para el análisis en cuestión serán transferidos al útero materno, evitando de esta manera una gestación que presente la citada anomalía genética.

La primera publicación sobre el uso de DGP fue en 1989 (Handyside *et al.*, 1989). Este primer diagnóstico tuvo el objetivo de evitar la herencia de una enfermedad monogénica ligada al cromosoma X mediante la técnica de PCR (de las siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). Inicialmente, el DGP fue desarrollado para evitar la herencia de enfermedades monogénicas, y progresivamente, se fueron desarrollando nuevas estrategias de análisis centradas en la detección de mutaciones y marcadores genéticos ligados a enfermedades monogénicas, con el fin de evitar su herencia y prevenir así la aparición de una enfermedad concreta en la descendencia de parejas con este riesgo (Sermon *et al.* 2004, Verlinsky *et al.* 2004). Posteriormente en el ámbito del análisis preimplantacional de embriones, se desarrolló otra estrategia distinta para lograr el diagnóstico cromosómico centrado en el análisis de aneuploidías (DGP-A, también conocido como PGS de sus siglas en inglés de *Preimplantation Genetic Screening*, o PGD-AS de sus siglas en inglés de *Preimplantation Genetic Diagnosis-Aneuploidy Screening*).

El DGP-A fue introducido en el campo de las técnicas de Reproducción Asistida con el fin de mejorar las tasas de embarazo de ciertos grupos de pacientes con peor pronóstico reproductivo. Inicialmente, se analizaron los cromosomas implicados en detención del crecimiento fetal, cuyas aneuploidías habían sido detectadas en restos abortivos, pero también se incluían cromosomas implicados en aneuploidías causantes de síndromes de recién nacido vivo con patología, como son el Síndrome de Patau (trisomía del cromosoma 13), Síndrome de Edwards (trisomía del cromosoma 18), Síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21), y los síndromes asociados a aneuploidías para los cromosomas sexuales X e Y (Jacobs *et al.*, 1974, Hassold *et al.* 1996, Stephenson *et al.*, 2002). Sin DGP-A, la única estrategia para evitar el nacimiento de niños con estos síndromes sería el diagnóstico prenatal, y si tras el diagnóstico prenatal el feto es diagnosticado como genéticamente anormal, la única opción para evitar el síndrome en cuestión sería la interrupción médica de la gestación (Simpson *et al.*, 2017). Por contra, si estas aneuploidías pudieran ser detectadas con anterioridad a la gestación, podrían seleccionarse embriones sin aneuploidías, y evitar de esta manera el acontecimiento del aborto.

Para realizar un caso de DGP-A es imprescindible que los pacientes sean sometidos a técnicas de reproducción asistida, en concreto, un ciclo completo de DGP-A comprende los siguientes pasos:

1. Estimulación ovárica,
2. Aspiración folicular para la obtención de ovocitos,
3. Fecundación (es recomendable que sea mediante ICSI (de sus siglas en inglés de *intracytoplasmic sperm injection*) en vez de FIV (fecundación *in vitro*) para evitar contaminación por presencia de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida,
4. Cultivo *in vitro* de embriones,

5. Biopsia embrionaria: biopsia de blastómera en día 3 de desarrollo, o de trofoectodermo en día 5 y/o día 6,
6. Diagnóstico genético y análisis de resultados,
7. Transferencia embrionaria al útero materno de embriones diagnosticados como genéticamente normales, y/o criopreservación de embriones sobrantes para futuros ciclos de reproducción asistida.

1.1.4 Tipos de biopsia embrionaria para DGP-A

Se han descrito tres tipos de biopsia embrionaria que han sido empleados para diagnóstico clínico en DGP-A, los cuales se detallan a continuación:

- **Biopsia de corpúsculo polar**

La biopsia de corpúsculo polar (PB; de sus siglas en inglés de *Polar Body*) consiste en obtener el primer y segundo corpúsculo polar tras la fecundación, y únicamente permite obtener información genética de origen materno. De hecho, el contenido genético del ovocito se infiere a partir de los resultados del análisis de ambos corpúsculos polares. Es por ello que se ha usado principalmente para casos de DGP de enfermedades monogénicas en los cuales evitar la herencia de la mutación materna (tanto en enfermedades monogénicas recesivas como dominantes) evitaba la aparición de la enfermedad en la descendencia (Verlinsky *et al.* 1995, Verlinsky *et al.* 2005, Montag *et al.*, 2013). La biopsia de PB ha sido usada por diversos centros de análisis también para DGP-A, pero debido a la necesidad de un doble análisis (primer y segundo corpúsculo polar), junto con un mayor número de muestras a analizar (no todos los ovocitos correctamente fecundados serán embriones viables a biopsiar), este tipo de biopsia ha sido mayoritariamente usado en países donde la biopsia embrionaria no es posible debido a restricciones legales (Montag *et al.*, 2013). Es por todo ello que, al inicio de la presente tesis doctoral, únicamente se incluyeron la biopsia de blastómera y la de trofoectodermo como los dos tipos de biopsia disponibles para cualquier paciente que se somete a un programa de DGP-A.

- **Biopsia de blastómera**

La biopsia de blastómera, consiste en la extracción de una célula embrionaria (blastómera) en embriones en día 3 de desarrollo. Teniendo en cuenta que el embrión es el resultado de sucesivas divisiones celulares a partir de una única célula (zigoto), las células que formen parte del embrión tendrán el mismo contenido genético, salvo presencia de errores mitóticos en estas divisiones celulares. Es por ello, que la biopsia de una única célula sería suficiente para conocer el contenido genético del embrión a análisis. Desde el punto de vista genético, la biopsia de una única célula no permite la detección de mosaicismo embrionario, y únicamente sería posible la detección de embriones mosaico mediante la biopsia de dos o más células hermanas, pero se ha descrito una posible reducción del potencial reproductivo del embrión al que se le extraen dos células en vez de una (Cohen *et al.* 2007). En cualquier caso, para poder aplicar DGP-A satisfactoriamente mediante biopsia de blastómera, es necesario que la célula quede intacta post-biopsia (no lisada, ni desintegrada) y con núcleo visible en el momento de la biopsia (Mercader *et al.*, 2003).

- **Biopsia de trofoectodermo**

La biopsia de trofoectodermo consiste en la extracción de un grupo de células de la parte externa del embrión, denominada trofoectodermo. Generalmente, se realiza en embriones en día 5 o día 6 de desarrollo embrionario, siendo únicamente posible cuando las células embrionarias han sido ya diferenciadas en masa celular interna y trofoectodermo, de manera que se evita extraer células que pertenezcan a la masa celular interna (McArthur *et al.*, 2005). A pesar de que haberse encontrado discrepancias entre contenido cromosómico de biopsias de trofoectodermo y el contenido cromosómico del resto del embrión (Haddad *et al.*, 2013), la tasa de concordancia entre ambos es elevada (Capalbo *et al.*, 2013) y es la técnica más extendida en la actualidad.

1.1.5 Tecnologías de análisis cromosómico

Desde el inicio del DGP-A, las técnicas de análisis han ido cambiando, ofreciendo progresivamente un análisis más completo del contenido cromosómico del embrión, a la par que se ha ido incrementando progresivamente la capacidad de detección de aneuploidías y la fiabilidad y robustez del método.

- **Hibridación fluorescente in situ (FISH)**

Los primeros trabajos de análisis del contenido cromosómico de biopsias embrionarias se realizaron mediante la técnica de FISH, y corroboraron la presencia de aneuploidías en embriones preimplantacionales humanos (Harper *et al.*, 1994). Así, estos primeros trabajos analizaban los cromosomas implicados en aneuploidías causantes de síndromes de recién nacido vivo con patología (e.g. cromosomas 13, 18, 21, X e Y) y posteriormente se incorporaron los cromosomas más frecuentemente encontrados en análisis de restos abortivos, principalmente los cromosomas 15, 16 y 22 (Vidal *et al.*, 1998, Stephenson *et al.*, 2002); y adicionalmente, otros trabajos incorporaron ciertos cromosomas adicionales como el 1, 14 y/o 17 (Abdelhadi *et al.*, 2003).

- **Array-CGH**

Posteriormente, al inicio de la presente tesis doctoral, surgieron los primeros intentos de adaptar otros protocolos que permitieran el análisis de aneuploidías de todos los cromosomas simultáneamente, evitando sucesivas rondas de hibridaciones como en el caso de la técnica de FISH. Estos trabajos intentaban adaptar técnicas como los array-CGH usados en otras ramas de la medicina como en oncología o diagnóstico prenatal (Wells *et al.*, 2008). Para aplicar estas técnicas sobre una única célula, era necesario un primer paso de amplificación genómica (WGA; en inglés *Whole Genome Amplification*) de la biopsia embrionaria para obtener suficiente cantidad de ADN para el análisis (Spits *et al.*, 2006). En la presente tesis doctoral se presentan los estudios realizados para la validación y posterior aplicación de la técnica de array-CGH en el programa de DGP-A.

- **PCR cuantitativa**

Una aproximación diferente a array-CGH para la detección de aneuploidías simultánea en todos los cromosomas, fue la PCR cuantitativa (qPCR; *Quantitative PCR* en inglés). Esta técnica consiste en la amplificación simultánea de 96 regiones cromosómicas (4 regiones para cada uno de los 24 cromosomas) en una reacción de PCR múltiple diferente a WGA. A partir de este primer producto, se realizan reacciones independientes de PCR cuantitativa (una para cada una de las 96 regiones) (Treff *et al.*, 2012), y de esta manera pueden ser comparados el

número de copias de cada una de estas regiones para lograr obtener un análisis de aneuploidías de los 24 cromosomas.

- **NGS**

Más recientemente, se ha comenzado a aplicar la secuenciación masiva o NGS (*Next Generation Sequencing*) para DGP-A. Su validación en biopsias embrionarias para uso clínico en rutina ha sido finalmente posible gracias a la gran reducción en el coste de esta tecnología. Mediante esta tecnología, se incorpora un sistema de codificado por “códigos de barras de ADN” que se añaden a cada muestra, lo cual permite el análisis simultaneo de muchas muestras, reduciendo así el precio por muestra. Además, esta tecnología permite una versatilidad en cuanto a la profundidad del análisis (básicamente basado en número de lecturas por secuencia) que hace poder adaptarla a prácticamente cualquier análisis del número de copias de determinada secuencia (aneuploidías), así como a análisis de la composición de nucleótidos de cualquier secuencia (genotipado). Gracias a la versatilidad de esta tecnología, el análisis simultaneo de DGP-A junto con mutaciones puntuales causantes de enfermedades monogénicas conocidas es ahora más factible mediante NGS (Ruttanajit *et al.*, 2016). Además de estas ventajas, mediante NGS también se puede realizar análisis complementarios al resultado de DGP-A que aporten otro enfoque con valor añadido para evaluar la viabilidad embrionaria, como la cantidad de ADN mitocondrial presente en la biopsia (Diez-Juan *et al.*, 2015).

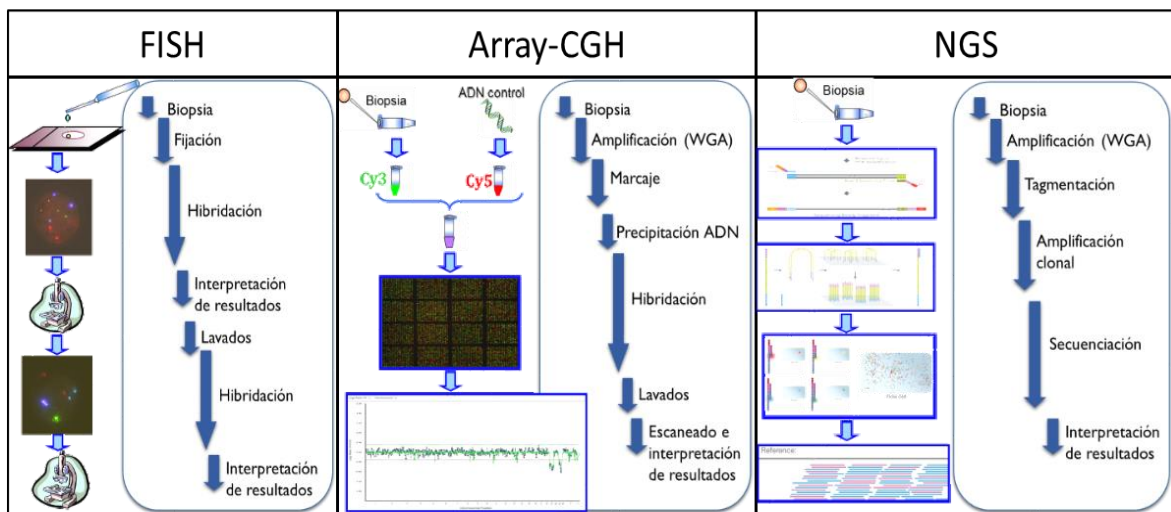


Figura 1. Comparativa de los tres tipos de técnicas más comúnmente empleadas en DGP-A.

1.3. Limitaciones del DGP-A

1.3.1. Cantidad de material genético disponible para el análisis

El DGP-A presenta una limitación intrínseca, e independiente de la técnica de análisis, que consiste en la poca cantidad de material genético disponible para el análisis. A pesar de que existe alguna diferencia en la cantidad de material genético disponible en los distintos tipos de biopsia embrionaria,

en todos los casos, la limitación principal radica en analizar una muestra con muy bajo contenido total de ADN (ácido desoxirribonucleico). Y por ello, para poder usar cualquier técnica de análisis de aneuploidías en DGP-A, todas ellas deben adaptarse a esta limitación principal. Cada técnica de análisis se adapta de manera diferente a esta limitación. En concreto, la técnica de FISH permite analizar varios cromosomas en sucesivas rondas de hibridación (máximo 4 ó 5 cromosomas por ronda) previa fijación de cada célula de manera aislada en un portaobjetos. En cambio, las técnicas que analizan todos los cromosomas simultáneamente, como array-CGH, requieren de un paso previo de lisis celular y amplificación genómica del ADN presente en la biopsia para obtener suficiente cantidad para el análisis.

1.3.2. Técnica de análisis

Por otro lado, existen limitaciones asociadas a la técnica de análisis empleada para realizar el DGP. Las dos limitaciones más importantes de la técnica de FISH fueron en primer lugar el número de cromosomas que se podían analizar simultáneamente, siendo más comúnmente entre 7 y 9 cromosomas (por ejemplo, en los resultados analizados en la presente tesis doctoral se habían analizado de rutina 9 cromosomas); y en segundo lugar la tasa de falsos positivos, sobre todo por la sobreestimación de monosomías cromosómicas (Colls *et al.* 2007, Hanson *et al.* 2009), pero también por problemas de interpretación de señales dudosas debido al ciclo de replicación celular en el que la cromatina en interfase se encuentre (Pujol *et al.* 2004). Además, a pesar de que la técnica de FISH permite el análisis de segregación de translocaciones recíprocas en embriones humanos mediante un diseño específico que únicamente analiza los cromosomas implicados (Escudero *et al.*, 2008), cuando se usa FISH en DGP-A para el análisis de aneuploidías en varios cromosomas se obtiene la señal fluorescente correspondiente a la sonda complementaria de una región cromosómica concreta (mayoritariamente el centrómero de dicho cromosoma), y mediante la visualización de esta señal, se asume que el resto del cromosomas está presente. De este modo, no es posible detectar ganancias ni pérdidas cromosómicas parciales que afecten a dichos cromosomas.

Existe otra limitación asociada a la técnica de FISH, que es la fijación de la biopsia embrionaria, sin una adecuada extensión y fijación de la célula embrionaria, no es posible su análisis cromosómico (Velilla *et al.*, 2002). Por estas limitaciones del FISH, el DGP-A fue duramente criticado tras la aparición de varios estudios clínicos aleatorizados (RCT del inglés randomized clinical trials), en los que se argumentaba la incapacidad de la técnica de FISH para mejorar los resultados de pacientes sometidos a DGP-A (Mastenbroek *et al.*, 2011). A pesar de que algunos de estos trabajos fueron criticados metodológicamente, quedaba patente la necesidad del análisis de aneuploidías para los 24 cromosomas simultáneamente con alta fiabilidad y reproducibilidad, como array-CGH (Simpson., 2008).

La limitación principal de la técnica de array-CGH, es la necesidad de un paso de WGA previo al análisis, el cual puede presentar fallo de amplificación (ausencia de amplificación), y sin ADN no es posible realizar el análisis. Durante el proceso de WGA, una contaminación con ADN externo podría dar lugar a un error de diagnóstico si se acaba diagnosticando el ADN externo y no el de la propia biopsia. En cuanto al diagnóstico, los programas de análisis usados en array-CGH no permiten la detección de todos los tipos de poliploidías. Se pueden distinguir los embriones haploides Y0 y las triploidías XXY y XYY como una alteración en el número de cromosomas sexuales, pero no es posible la detección de las triploidías XXX ni la presencia de haploides X0 (Wells *et al.*, 2008).

Las limitaciones de la técnica de NGS aplicada al DGP-A son muy similares a las de array-CGH. Esto es debido a dos factores principalmente. Por un lado, ambas técnicas requieren de un paso previo de WGA; por otro lado, a pesar de ser tecnologías diferentes, la interpretación de los resultados en ambos casos se basa en una comparación del número de copias del ADN amplificado de la biopsia con respecto al ADN de referencia de un individuo normal.

1.3.3. Tipo de biopsia

Independientemente de la técnica de análisis empleada, cada uno de los tipos de biopsia embrionaria presenta sus propias limitaciones. En concreto, comparando los dos tipos de biopsia usados en la presente tesis doctoral (biopsia blastómera vs. biopsia de trofoectodermo), las principales limitaciones son las siguientes:

A) *Material genético disponible para el análisis*: a pesar de que en una biopsia de trofoectodermo hay mayor cantidad de ADN, en ninguno de los dos tipos de biopsia hay suficiente cantidad de ADN para el análisis directo. Tras el paso de amplificación de ADN mediante técnicas de WGA, ya no hay problemas respecto a la cantidad de ADN disponible para el análisis en ninguno de los 2 tipos de biopsia. Únicamente, en algunos casos puede observarse fallo total de amplificación, generalmente por ausencia de biopsia en el tubo de análisis, o por una lisis celular defectuosa (Wilton *et al.*, 2009), pero la ocurrencia de estos fenómenos es similar en ambos tipos de biopsia, entre un 1-2% de casos (Wells *et al.*, 2008, Rodrigo *et al.*, 2014).

B) *Impacto en el desarrollo del embrión*: la biopsia embrionaria implica la extracción de parte del material vivo del embrión. Una biopsia de blastómera, asumiendo la extracción de una célula en un embrión de 8 células, implicaría la remoción del 12,5% de masa embrionaria, mientras que la extracción de entre 3-10 células del trofoectodermo en un blastocisto que podría contener aproximadamente unas 100 células, no implicaría más del 3-10% del total. En ambos escenarios, la plasticidad embrionaria es altamente conocida, y las células que siguen formando parte del embrión suplen la función de las que ya no están; aun así, ha sido descrito un impacto negativo en el potencial implantatorio del embrión tras biopsia de blastómera (Scott *et al.*, 2013b). Por el contrario, otros autores han mostrado tasas de desarrollo embrionario hasta blastocisto similares en embriones con y sin biopsia de blastómera (62,3% versus 61.1%, respectivamente) (Rubio *et al.*, 2017).

C) *Mosaicismo embrionario*: no detectable en biopsias de día 3 al analizar una única célula, pero sí es detectable en parte en biopsias de trofoectodermo donde se analizan varias células simultáneamente (Vera-Rodríguez *et al.*, 2017a). El mosaicismo encontrado en estas biopsias podría encontrarse únicamente en el trofoectodermo y no en la masa celular interna, que finalmente formará el embrión, pero se ha descrito una alta tasa de concordancia entre ambos tejidos (Capalbo *et al.*, 2017b).

D) *Fiabilidad del diagnóstico*: tanto las validaciones de técnicas que permiten el análisis de todos los cromosomas en biopsias embrionarias, como los trabajos de reanálisis de embriones que habían sido previamente diagnosticados como cromosómicamente anormales mediante dichas técnicas, muestran tasas de falsos positivos similares para biopsias de blastómera y trofoectodermo aplicadas a DGP-A, siendo la tasa de concordancia del diagnóstico entre el 97-99% para ambos tipos de biopsias (García-Herrero *et al.*, 2016).

E) *Tiempo disponible para el análisis*: si no se vitrifican los embriones tras la biopsia, el tiempo máximo disponible para el análisis de aneuploidías en biopsias de blastómera es de unas 48 horas (desde día 3 a día 5 de desarrollo), mientras que en biopsias de trofoectodermo no es superior a las 24 horas, a pesar de que la biopsia embrionaria puede aplazarse a día 6 de desarrollo. En cambio, si se vitrifican los embriones biopsiados, la transferencia embrionaria ocurrirá en el siguiente ciclo de la paciente. En muchos casos, el centro de análisis de DGP-A y el centro donde se realiza el ciclo de FIV no es el mismo, por lo que el tiempo que transcurre entre la biopsia y la transferencia, es necesario invertirlo en transporte de la biopsia más análisis de la misma. Es por ello, que esta estrategia de vitrificación de embriones en espera del diagnóstico es más común en biopsias de trofoectodermo (Wells *et al.*, 2008).

Limitaciones	Tipo biopsia			
	Blastómera (D3)		Trofoectodermo (TE)	
	Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Estandarización	Técnica más estandarizada			Menos estandarizada que D3
Material genético para análisis		Una célula	Varias células (3-10)	Lisis de alguna de las células de la biopsia.
Material biológico extraído		Mayor cantidad de masa embrionaria	Menor cantidad de masa embrionaria	Mayor dificultad para el manejo de la biopsia.
		Extracción de células sin saber su destino	Extracción de células destinadas a tejido extraembrionario	
Impacto en el desarrollo del embrión		Posible disminución del potencial de implantación del embrión	Menor impacto. Sin evidencias de degeneración post-biopsia.	
Mosaicismo embrionario		No detectable	Detectable	
Fiabilidad diagnóstica	Tasa de falsos positivos en torno a 97-98%		Tasa de falsos positivos en torno a 97-98%	
	Tasa de amplificación deficiente: 1-2%		Tasa de amplificación deficiente: 1-2%	
Tiempo para el análisis	Disponibilidad de 48 horas para transporte de la biopsia más análisis			Máximo 24 horas para transporte de la biopsia y análisis; o vitrificación y transferencia al siguiente ciclo.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los dos tipos de biopsia embrionaria aplicados en la presente tesis doctoral: biopsia blastómera y biopsia de trofoectodermo. Modificado de Cimadomo *et al.*, 2006.

En general, cualquier tipo de biopsia embrionaria debe realizarse bajo condiciones idóneas, tanto la biopsia como la manipulación de la biopsia y del embrión, para que sea lo menos agresiva posible con el embrión, siendo de este modo el impacto en el desarrollo embrionario mínimo, y también para evitar que el resultado del análisis se vea comprometido por una biopsia deficiente y/o una sub-óptima manipulación de la biopsia (Figura 2).

RECOMENDACIONES PARA UNA ADECUADA BIOPSIA EMBRIONARIA

- ✓ Uso de la tecnología adecuada (sistema de láser y micromanipulador).
- ✓ Material estéril y de uso exclusivo (micropipetas, capilares y placas de cultivo).
- ✓ Medios adecuados para la biopsia embrionaria y para el posterior lavado y manipulación de la biopsia.
- ✓ Manipulación adecuada al introducir la biopsia en el tubo de análisis, para evitar contaminación con ADN externo, y liberar el mínimo volumen de medio de transporte al tubo.
- ✓ Para biopsias de trofoectodermo, biopsiar un número suficiente de células, pero no demasiadas (a pesar de que esto puede variar entre autores, en general se acepta un mínimo entre 3-5 células, pero no más de 10 células).
- ✓ Adecuado sistema de transporte embrionario desde el laboratorio donde se realiza la biopsia hasta el laboratorio donde se realice el análisis.

Figura 2. Recopilación de los requerimientos y recomendaciones de varios autores para la buena praxis de la biopsia embrionaria, tanto para biopsias de blastómera como de trofoectodermo. Información extraída a partir de los siguientes artículos: De Vos et al. 2001, McArthur et al, 2005, Rubio et al. 2009 y Schoolcraft et al, 2010.

1.3.4. Mosaicismo embrionario

Se define mosaicismo como la coexistencia en un mismo individuo de líneas celulares con distinto complemento cromosómico. El embrión humano se origina a partir de sucesivas divisiones celulares de una única célula (zigoto). En cada una de estas divisiones celulares, se originan dos células que deberían tener el mismo complemento cromosómico que la célula original, pero en ocasiones, alguna de estas células hijas pueden heredar algún cromosoma en exceso o en defecto. Si estas células con contenido cromosómico erróneo siguen dividiéndose, darán lugar, en principio, a líneas celulares que tendrán el mismo contenido cromosómico que ellas mismas. A pesar de que, para conocer el estado cromosómico real de un embrión habría que analizar todas sus células, podría considerarse un embrión como mosaico si se confirma que algunas de sus células tienen un contenido cromosómico distinto al resto. Los embriones mosaicos pueden clasificarse de diversa manera, pero actualmente se acepta más comúnmente la clasificación que aporta la PGDIS (*Preimplantation Genetic Diagnosis International Society*) (PGDIS, 2016), siendo divididos en:

- *Mosaico “euploide-aneuploide”*: cuando presentan una línea celular cromosómicamente normal, y una o varias líneas celulares cromosómicamente anormales. Cada una de las líneas celulares

son consideradas como normal o anormal cuando posee más del 20% de células con la misma dotación cromosómica.

- *Mosaico “aneuploide-aneuploide”*: cuando presentan dos o más líneas celulares cromosómicamente anormales.

1.4. Indicaciones clínicas actuales del DGP-A

En ciertos programas de FIV, el DGP-A fue introducido con el fin de mejorar los resultados reproductivos de grupos concretos de parejas subfértiles, basándose en el concepto de que las anomalías cromosómicas encontradas en embriones de estas parejas eran las responsables de las bajas tasas de éxito reproductivo. Por tanto, evitar la transferencia de embriones aneuploides en cualquiera de estos grupos de pacientes, debería reducir las tasas de aborto, pero también incrementar las tasas de gestación, implantación y niño nacido vivo sano. A pesar de ello, ha habido un intenso debate sobre la utilidad del DGP-A, y el primer metaanálisis disponible en la literatura, en el cual se revisan los datos de DGP-A mediante FISH, concluye que ninguno de los RCTs publicados hasta el momento del inicio de la presente tesis doctoral mostraban ningún beneficio en la aplicación de DGP-A en pacientes sometidas a FIV (revisado en Mastenbroek *et al.*, 2011). Estos primeros estudios se englobarían en la primera etapa del DGP-A lo que se ha denominado la era 1.0, basada sobre todo en biopsia embrionaria en día 3 de desarrollo y FISH para un número limitado de cromosomas.

Con la incorporación de los array-CGH se pasó a la era 2.0 con el análisis de 24 cromosomas. Ya con esta tecnología se han realizado otros estudios sobre todo basados en la biopsia de blastocisto y se ha extendido la aplicación del DGP-A a parejas con buen pronóstico.

Los resultados más significativos de dichos trabajos se detallan a continuación para cada una de las indicaciones clínicas actuales del DGP-A:

1.4.1. Edad materna avanzada (EMA o AMA; del inglés *Advanced maternal age*): es la indicación clínica más frecuente en DGP-A. La tasa de aneuploidías en embriones preimplantacionales aumenta progresivamente con la edad materna (Franasiak *et al.*, 2014). El umbral para considerar edad materna avanzada puede variar, pero se acepta mundialmente el límite mínimo de 35 años. En concreto, la tasa de error en la segregación cromosómica se incrementa en mujeres a partir de 35 años, desde un 20% hasta alcanzar un 60% en mujeres de 43 años (Kuliev *et al.*, 2011).

Son varios los autores que muestran incrementos en tasas de gestación e implantación embrionaria en pacientes de EMA mediante el uso de la técnica de FISH aplicada a DGP-A en biopsias de blastómera (Munné *et al.*, 2003 y 2005, Rubio *et al.*, 2005). Por el contrario, varios estudios RCT comparando resultados del grupo de pacientes EMA sometidas a DGP-A *versus* pacientes EMA con transferencia de embriones sin analizar, no muestran ninguna mejora en la aplicación de DGP-A, ni en tasas de gestación ni de niño nacido vivo (revisado en Mastenbroek *et al.*, 2011). Pero estos estudios fueron criticados principalmente por aspectos metodológicos y por presentar una alta tasa de biopsias embrionarias en las cuales no obtenían un resultado óptimo mediante FISH, llegando a la conclusión de que el mero hecho de que un trabajo esté bien diseñado (ej. RCT), no es suficiente para la validez de sus conclusiones (Simpson *et al.*, 2008). Además, el último RCT publicado usando la técnica de FISH para 9 cromosomas en biopsias de blastómera en pacientes entre 41 y 44 años, muestra un incremento altamente significativo en la tasa de niño nacido vivo en el grupo de pacientes sometidos a DGP-A (32.3% *vs.* 15.5%; $p=0.0099$) (Rubio *et al.*, 2013a), lo cual demuestra la mejora en el éxito reproductivo al menos en este subgrupo de pacientes dentro de EMA.

El RCT más recientemente publicado se ha realizado aplicando la técnica de array-CGH en biopsias de día 3, en pacientes entre 38 y 41 años. En el grupo de pacientes con DGP-A, las tasas de nacido vivo son muy superiores tanto por número de transferencias realizadas (52.9% vs. 24.2%; $p=0.0002$), como por paciente (36.0% vs. 21.9%; $p=0.0309$), siendo además la reducción en la tasa de aborto clínico altamente significativa (2.7% vs. 39.0%; $p<0.0001$) (Rubio *et al.*, 2017).

1.4.2. Parejas con fallo repetido de implantación (RIF; del inglés *Repetitive implantation failure*): El criterio para incluir pacientes en este grupo es haber tenido 3 ciclos de FIV fallidos, o bien pacientes en las que se han transferido al menos 10 embriones de buena calidad sin obtener gestación (Pehlivan *et al.*, 2003, Rubio *et al.*, 2013a). Dentro de este grupo de pacientes, las causas del RIF pueden ser idiopáticas, aunque se conoce que los factores endometriales, embrionarios o mixtos, juegan un papel importante. En este grupo de pacientes, se ha descrito una incidencia elevada de aneuploidías en embriones preimplantacionales comparado con población control de características similares (Kahraman *et al.*, 2000, Pehlivan *et al.*, 2003). Los primeros trabajos de DGP-A mediante FISH en parejas con fallo de implantación recurrente muestran mejores tasas de gestación e implantación comparados con población control, pero sin aportar datos estadísticamente significativos (Kahraman *et al.*, 2000, Wilton *et al.*, 2003, Pehlivan *et al.*, 2003).

El primer RCT publicado usando la técnica de FISH para 7 cromosomas en biopsias de blastómera, no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto a tasas de implantación entre el grupo de pacientes con y sin DGP-A (21.4% versus 25.3%, respectivamente) (Blockeel *et al.*, 2008), pero un segundo RCT en el que se analizaron 9 cromosomas en biopsias de blastómera en este grupo de pacientes fue publicado posteriormente (Rubio *et al.*, 2013a), y en él se mostraron mejoras estadísticamente significativas en la tasa de niño nacido vivo en casa por tratamiento iniciado (47.9% versus 27.9%), mostrando así la ventaja de la aplicación de DGP-A en este grupo de pacientes.

Respecto a la aplicación de tecnologías que analicen todos los cromosomas en parejas con fallo de implantación, se ha publicado recientemente un trabajo que analiza retrospectivamente datos de DGP-A mediante array-CGH. Este trabajo muestra tasas de gestación muy prometedoras en los dos grupos de pacientes incluidos: en los ciclos con biopsia de blastómera, la tasa de gestación fue de 52,6%, mientras que en ciclos con biopsia de trofoectodermo, la tasa de gestación fue superior, 73.3% pero se debe tener en cuenta que, en este último grupo, las pacientes eran más jóvenes y con mayor reserva ovárica (García-Herrero *et al.*, 2014).

1.4.3. Parejas con abortos recurrentes (RM; del inglés *Recurrent miscarriage*): los criterios más aceptados para clasificar a las parejas en este grupo de RM son aquellas que han sufrido tres o más abortos espontáneos consecutivos antes de la semana 14 de gestación (Rai *et al.*, 2006). Sin embargo, hay una tendencia generalizada a comenzar estudios específicos de la pareja a partir de dos o más abortos (Bellver *et al.* 2008). A pesar de que muchos de estos casos son idiopáticos, las aneuploidías juegan un papel importante, y su presencia en restos abortivos (principalmente trisomías), hace que se vean implicadas en la detención del crecimiento fetal (Hassold *et al.* 2001, Stephenson *et al.*, 2002, Hodes-Wertz *et al.*, 2012). En concreto, se han identificado aneuploidías en estudios de restos abortivos entre un 28% y 80.6% de casos en diferentes poblaciones (Nybo Andersen *et al.*, 2000, Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2012, Segawa *et al.* 2017), siendo responsables de al menos del 50% de abortos antes de la semana 15 de gestación (Warren *et al.*, 2008). La tasa de aneuploidías en restos abortivos se incrementa con la edad (Campos-Galindo *et al.*, 2015, Segawa *et al.* 2017), pero también

es superior en restos abortivos de pacientes que han sufrido abortos de repetición independientemente de la edad materna (Bianco *et al* 2006).

Al inicio de la presente tesis doctoral, se publicó una revisión sistemática de los trabajos de DGP-A en parejas con aborto recurrente idiopático, que incluye los trabajos realizados hasta el momento mediante la técnica de FISH en biopsias de blastómera. En ella se destaca la necesidad de realizar RCT en este grupo de pacientes, ya que no había hasta la hecha, y resume que la tasa de abortos tras DGP-A es inferior que en los grupos de pacientes con abortos de repetición sin DGP-A (9% *vs.* 28%) (Musters *et al.*, 2011).

La aplicación de la técnica de array-CGH en este grupo de pacientes ha mejorado estos resultados. En un estudio retrospectivo que incluye pacientes con 32,4 ($\pm 2,0$) años de edad media, y abortos recurrentes aislados o junto con fallos de implantación, cuyos embriones se analizaron mediante array-CGH en biopsias de blastómera, la tasa de implantación fue estadísticamente significativa respecto al grupo control (52.63% *vs.* 19.15%; $p = 0.001$), así como la tasa de gestación evolutiva (61.54% *vs.* 32.49%, $p = 0.0001$), mientras que la tasa de abortos se redujo, pero únicamente muestra una tendencia no estadísticamente significativa (11.11% *vs.* 26.01%, $p = 0.13$) (Keltz *et al.*, 2013).

Hay evidencia médica suficiente para considerar las aneuploidías como una de las causas mayoritarias de aborto de repetición idiopático, por tanto, se aconseja realizar el análisis cromosómico de cualquier resto abortivo (Lathi *et al.*, 2011, Campos-Galindo *et al.*, 2015). En vista de los resultados clínicos en este grupo de pacientes tras aplicar las nuevas técnicas de análisis en DGP-A, se puede indicar el análisis de aneuploidías en embriones preimplantacionales en pacientes que hayan sufrido dos abortos, o un único aborto cromosómicamente anormal (Branch *et al.*, 2010).

1.4.4. Factor masculino (también conocido como MF del inglés *Male factor* o SMF del inglés *Severe male factor*): se incluyen en este grupo pacientes con parámetros seminales alterados, generalmente concentración espermática menor de 5×10^6 espermatozoides/ml o con presencia de Oligoastenoteratozoospermia (OAT), ya que en estos pacientes se ha observado un incremento de aneuploidías en sus espermatozoides (Rodrigo *et al.*, 2004). También pacientes con teratozoospermia severa presentan una elevada incidencia de aneuploidías en sus espermatozoides (Mateu *et al.*, 2006). Esta elevada incidencia genera un incremento de embriones preimplantacionales con aneuploidías que explicaría las tasas de aborto incrementadas en estos grupos de pacientes con parámetros seminales alterados (Rubio *et al.*, 2001). Los trabajos realizados en estos grupos de pacientes mediante la técnica de FISH muestran tasas de aneuploidías en embriones procedentes de pacientes con OAT superiores a la población de varones normozoospermicos, con valores en torno al 65% de embriones aneuploides (Magli *et al.*, 2009, Rubio *et al.*, 2005). Esta tasa de aneuploidías es concordante con la observada en trabajos posteriores en los que se aplicó la técnica de array-CGH en pacientes con OAT severa en biopsias de blastómera (Rodrigo *et al.*, 2014) y en biopsias de trofoectodermo (Coates *et al.*, 2015).

En este grupo de pacientes, el DGP-A mediante la técnica de array-CGH en biopsias de blastómera, ha sido aplicado mayoritariamente en varones con OAT severa, alcanzándose tasas de gestación de hasta el 63% (Rodrigo *et al.*, 2014). Mediante esta misma técnica, en el momento de escribir la presente tesis doctoral, únicamente tenemos constancia de un estudio RCT en pacientes con concentración espermática menor de 2×10^6 /ml. El análisis intermedio de dicho RCT mostró mejores tasas de gestación evolutiva por transferencia embrionaria (71.0% *versus* 45.4%; $p=0.0345$), y de gestación evolutiva por ciclo de FIV iniciado (66.7% *versus* 42.8%; $p=0.0417$) en el grupo de DGP-

A comparado con la transferencia de blastocistos sin analizar. Además, la tasa de abortos fue del 28.6% en el grupo sin análisis mediante DGP-A, y no hubo ningún aborto en el grupo de pacientes DGP-A (Rubio *et al.*, 2014). Mediante estos resultados, se muestra que este grupo de pacientes con OAT severa son también candidatos a ser incluidos en programas de DGP-A.

1.4.5. Parejas con trisomía previa (PTP; del inglés Previous trisomic pregnancy): Se incluyen en este grupo parejas que han sufrido alguna gestación anterior con trisomía, debido a lo cual presentan riesgo incrementado de que en sucesivas gestaciones aparezcan de nuevo aneuploidías (Pagidas *et al.*, 2008, De Souza *et al.*, 2009). Un estudio más reciente, ha comprobado también este riesgo en embriones preimplantacionales, demostrando que la incidencia de aneuploidías en embriones de parejas que habían sufrido una gestación anterior con aneuploidía es superior. En concreto, se observó un 34.0% de embriones aneuploides en parejas que no han tenido una gestación previa aneuploide, comparado con 67.8% para parejas con gestación aneuploide previa tras concepción natural, y 65.8% tras técnicas de reproducción asistida (Al-Asmar *et al.*, 2012). Mediante DGP-A es posible detectar y por tanto evitar transferir embriones con estas aneuploidías, hecho que puede beneficiar a este grupo de pacientes.

1.4.6. Pacientes con buen pronóstico reproductivo: es cada vez más frecuente ofrecer la selección del mejor embrión para ser transferido en este grupo de pacientes y sobre todo en aquellas parejas en las cuales se indica la transferencia de un único embrión, lo que se conoce como eSET (del inglés *elective Single embryo transfer*), práctica cada vez más extendida. Incluso en pacientes sin una indicación para DGP-A, se han publicado RCTs en los cuales se ha seguido esta estrategia de selección de un único blastocisto cromosómicamente normal para transferir, y se han obtenido mejoras estadísticamente significativas de las tasas de gestación evolutiva e incluso de la tasa de niño nacido vivo comparado con población control (Yang *et al.* 2012). Además, mediante esta estrategia se disminuye también significativamente la tasa de gestaciones múltiples (Yang *et al.* 2012). Posteriormente, otros dos RCT se publicaron en pacientes sin indicación previa de DGP-A. El primero de ellos, en pacientes de edad media $35,1\pm 3,9$, compara el grupo de pacientes con transferencia de un único blastocisto euploide (tras analizar la biopsia de trofoectodermo) respecto a un grupo de pacientes en los que se transfieren 2 blastocistos de buena morfología sin analizar. Las tasas de gestación evolutiva fueron similares (60.7% en DGP-A *versus* 65.1%; 95% CI: 0.7- 1.2), y en el grupo de pacientes sometidas a DGP-A, la tasa de aborto fue menor, aunque no estadísticamente significativa (11.5% *versus* 20.0%; $P=0,2$) (Forman *et al.*, 2013). El segundo RCT realizado también mediante biopsia de trofoectodermo en embriones de pacientes de edad media $32,2\pm 0,5$, muestra tasas de nacido vivo en el grupo de DGP-A estadísticamente significativas respecto al grupo control de pacientes de características similares (84.7% *versus* 67.5%; $P=0,01$) (Scott *et al.*, 2013a). Estos 3 trabajos muestran las ventajas potenciales que DGP-A puede aportar a ciertos grupos de pacientes sin una clara indicación clínica, siempre que la técnica de análisis y el manejo de los pacientes se haga bajo condiciones óptimas.

1.5 Hipótesis

La hipótesis sobre la cual se desarrolló el presente trabajo era que la aplicación de una nueva técnica de análisis molecular (array-CGH) en el DGP-A permitiría analizar con alta sensibilidad y especificidad el número de copias para cada uno de los 23 pares de cromosomas. De este modo se superaría una de las grandes limitaciones hasta ese momento que era el número limitado de cromosomas que podían ser analizados mediante la técnica de FISH.

Por otro lado, la transición de la técnica de FISH a array-CGH permitiría también el análisis de biopsias de blastocisto. En este escenario, la biopsia de blastocisto podría ofrecer mejores resultados que la de blastómera ya que al disponer de más de una célula, la amplificación sería más eficiente y se disminuiría la tasa de falsos positivos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue la optimización y mejora de la metodología empleada en un programa de DGP-A, teniendo en cuenta tanto el momento de la biopsia embrionaria como la técnica de análisis empleada para la detección de aneuploidías embrionarias.

Los objetivos específicos fueron:

1. Valoración de la utilidad de la incorporación de rondas de hibridación adicionales en la técnica de FISH aplicada a DGP-A.
2. Determinación de la capacidad de detección de aneuploidías y de la tasa de falsos positivos mediante la técnica de array-CGH en embriones previamente diagnosticados como anormales mediante FISH en día 3 de desarrollo.
3. Comparación de la tasa de falsos positivos en DGP-A mediante técnica array-CGH en biopsia de blastómera de embriones en día 3 de desarrollo *versus* biopsia de trofoectodermo en embriones de día 5 de desarrollo.

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño experimental

El diseño experimental para cada una de las fases del trabajo se detalla a continuación. Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación y el comité ético del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI).

3.1.1. Objetivo 1: *Valoración de la utilidad de la incorporación de rondas de hibridación adicionales en la técnica de FISH aplicada a DGP-A.*

Para este primer objetivo, se incluyeron 1.000 ciclos de FIV con DGP-A para los cuales, en al menos en uno de los embriones de la cohorte fue necesario realizar rondas de hibridación adicionales. Se analizaron 2.477 biopsias embrionarias de blastómera en las que se había realizado FISH para 9 cromosomas durante el periodo comprendido entre diciembre de 2007 y diciembre de 2008. Todos los análisis se realizaron en las instalaciones de IVI-Valencia, pero las biopsias procedían de las siguientes clínicas IVI: Alicante, Almería, Barcelona, Bilbao, Lisboa, Madrid, Murcia, Sevilla, Valencia y Vigo.

En estas muestras, se realizaron rondas de hibridación adicionales para los cromosomas en los que no se obtuvo un diagnóstico claro (1.496 casos), y para casos de aneuploidías individuales (981 casos). En todos estos casos, se utilizaron sondas diferentes de las usadas anteriormente para el análisis de aneuploidías. Posteriormente, se comparó el resultado obtenido tras las rondas adicionales, en cuanto a diagnóstico de la muestra (normal, anormal o no informativo), y en cuanto a detección de aneuploidías por cromosoma.

Adicionalmente, 132 embriones fueron reanalizados en día 5, en 80 de ellos se habían realizado rondas de hibridación adicionales, y no así en los restantes 52 embriones. Para este reanálisis, cada embrión fue fijado individualmente para analizar mediante FISH el mayor número de células posible. Finalmente, los resultados del diagnóstico en la biopsia y en el resto del embrión fueron comparados en ambos grupos (con y sin rondas adicionales de hibridación para el análisis de la biopsia). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el Test de Fisher considerando un nivel de significancia superior al 95% (p-valor <0,05).

3.1.2. Objetivo 2: Determinación de la capacidad de detección de aneuploidías y de la tasa de falsos positivos mediante la técnica de array-CGH en embriones previamente diagnosticados como anormales mediante FISH en día 3 de desarrollo.

Para responder a este objetivo, el diseño experimental se subdividió en dos partes:

- *Concordancia de las aneuploidías observadas en biopsias embrionarias mediante FISH versus array-CGH.*

En 38 embriones previamente diagnosticados como cromosómicamente anormales mediante FISH para 9 cromosomas en biopsias de blastómera, se extrajo otra célula en día 4 de desarrollo para ser analizada mediante array-CGH (Figura 3). Estas muestras fueron analizadas durante el periodo comprendido entre octubre de 2009 y febrero de 2010. Tras el análisis mediante array-CGH, se comparó el resultado obtenido mediante ambas técnicas, en cuanto a diagnóstico de la muestra (normal, anormal o no informativo), y en cuanto a detección de aneuploidías para cada

cromosoma. En casos de discordancia de resultados, el embrión en día 5 fue fijado individualmente para analizar mediante FISH el mayor número de células posible (Figura 3). Se incluyeron sondas de FISH dirigidas a los cromosomas implicados en las discordancias. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos tras el reanálisis en día 5 con los resultados de cada una de las biopsias (día 3 mediante FISH y día 4 mediante array-CGH).

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el Test de Fisher considerando un nivel de significancia superior al 95% (p-valor <0,05).

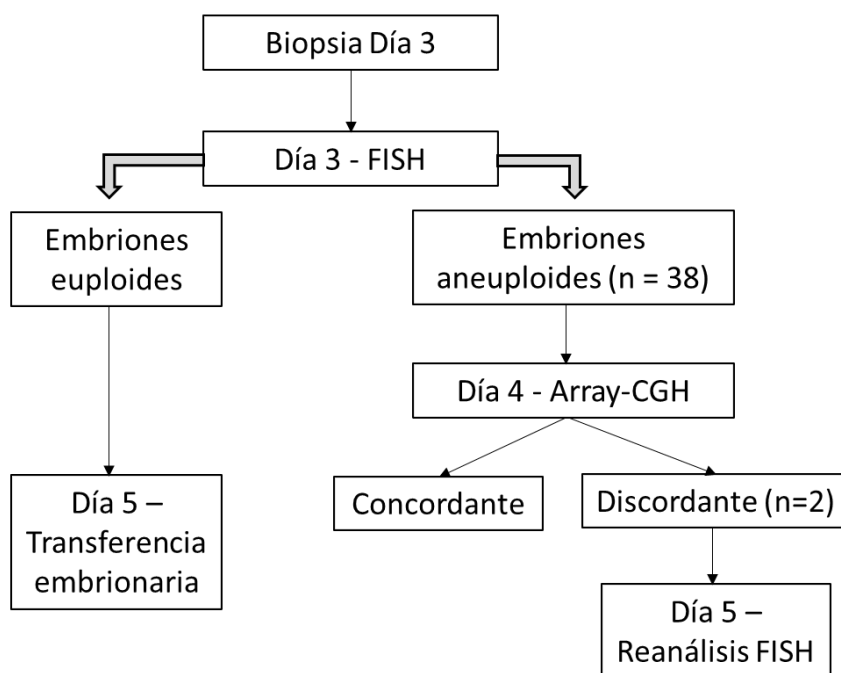


Figura 3. Representación esquemática de los embriones analizados para la consecución del objetivo 2 de la presente tesis doctoral. De los embriones del programa de DGP-A mediante FISH en día 3 que fueron considerados como cromosómicamente anormales, en 38 de ellos se extrajo una segunda célula en día 4 que fue analizada mediante array-CGH. Únicamente en los casos de discordancia de resultados entre FISH y array-CGH, se reanalizó el embrión entero mediante FISH en día 5. Corresponde a la figura 1 del segundo artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. False positive rate of an array-CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(1):143–9).

- Comparación de la tasa de falsos positivos de la técnica de array-CGH versus la técnica de FISH en biopsia embrionaria en día 3.

En el objetivo anterior se comprobó que la tasa de falsos positivos era la misma en biopsias de día 3 analizadas mediante FISH y en biopsias de día-4 del mismo embrión analizadas mediante array-CGH. Pero, faltaba comprobar si la tasa de falsos positivos de array-CGH en biopsias de día 3 dentro de la rutina de un programa de DGP-A era consistente con los datos previamente obtenidos con biopsias día 3 y análisis con FISH.

Para comprobarlo, en el periodo comprendido entre marzo de 2010 y marzo de 2012, se reanalizaron 42 embriones que previamente habían sido analizados mediante array-CGH en una blastómera en día 3 (Figura 4).

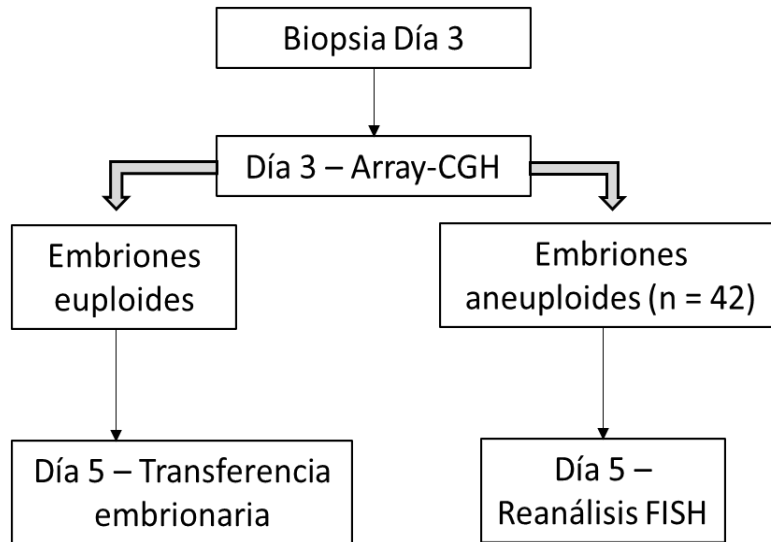


Figura 4. Representación esquemática de los embriones seleccionados para reanálisis en la consecución del objetivo tercero de la presente tesis doctoral. De los embriones del programa de DGP-A mediante array-CGH en día 3 que fueron considerados como cromosómicamente anormales, en 42 casos, el embrión entero en día 5 de desarrollo fue reanalizado mediante FISH. Corresponde a la figura 2 del segundo artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. False positive rate of an array-CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(1):143–9).

Cada uno de estos 42 embriones fue fijado individualmente en día 5 de desarrollo, y todas las células disponibles fueron analizadas mediante FISH con sondas dirigidas a los cromosomas en los que previamente se había detectado alguna aneuploidía. Los resultados del reanálisis del embrión completo se definieron a nivel de diagnóstico como:

- *Normal uniforme:* todas sus células, o al menos el 80% de ellas, eran cromosómicamente normales.
- *Anormal uniforme:* todas sus células, o al menos el 80% de ellas, contenían la misma anomalía cromosómica.
- *Mosaico euploide-aneuploide:* cuando al menos el 20% de las células eran cromosómicamente normales y el resto contenían alguna anomalía cromosómica.
- *Mosaico aneuploide:* cuando todas las células presentan alguna anomalía cromosómica, pero al menos un 20% de células que presentan alguna aneuploidía diferente al resto.
- *Caótico:* presencia de tres o más líneas celulares diferentes.

Posteriormente, estos resultados fueron comparados con el resultado obtenido en cada una de las biopsias a nivel de detección de aneuploidías para cada cromosoma. Así, los embriones catalogados como mosaico fueron divididos en subgrupos según la relación entre las aneuploidías observadas en la biopsia y en el resto del embrión:

- Grupo A: presencia en el embrión completo de al menos una de las aneuploidías presentes en la biopsia.
- Grupo B: las aneuploidías en el embrión completo eran complementarias a las presentes en la biopsia (ej. monosomía en biopsia y trisomía en embrión o viceversa).

- Grupo C: todas las aneuploidías de la biopsia estaban presentes en el embrión completo, y además en el embrión completo se detectaba alguna aneuploidía adicional no detectada en la biopsia.

La tasa de falsos positivos obtenida en este apartado se comparó con la obtenida para FISH en el mismo tipo de biopsia (objetivos 1 y 2). Estas comparativas fueron analizadas estadísticamente mediante el Test de Fisher considerando un nivel de significancia superior al 95% (p-valor <0,05).

3.1.3. Objetivo 3: *Comparación de la tasa de falsos positivos en DGP-A mediante técnica array-CGH en biopsias de día 3 versus biopsias de trofoectodermo.*

Tras evaluar los resultados de los objetivos anteriores, se eligió array-CGH como la técnica preferente a usar en DGP-A. Con el fin de comparar la tasa de falsos positivos de esta técnica en los dos tipos de biopsia embrionaria mayoritariamente usados en programas de DGP-A en el momento del planteamiento de este objetivo (blastómera vs. trofoectodermo), se diseñó un estudio a doble ciego para el reanálisis de embriones previamente diagnosticados como aneuploides mediante array-CGH en cada uno de los tipos de biopsia. Para este objetivo se reanalizaron 109 embriones, 50 de ellos con biopsias de blastómera y 59 de trofoectodermo, durante el periodo comprendido entre de septiembre de 2012 y octubre de 2014. En estos 109 casos, el reanálisis del embrión completo se realizó mediante array-CGH. De hecho, tanto para los 2 tipos de biopsia, como para el reanálisis de los embriones completos, se utilizó exactamente el mismo protocolo de array-CGH (figura 8).

Según el resultado del reanálisis del embrión completo mediante array-CGH, los embriones fueron catalogados como:

- *Normal uniforme:* el perfil obtenido por el software de análisis era compatible con la presencia de 2 copias para todos los cromosomas.
- *Anormal uniforme:* el perfil obtenido por el software de análisis era compatible con la presencia de al menos una aneuploidía en alguno de los cromosomas.
- *Mosaico:* el perfil obtenido por el software de análisis muestra, al menos para uno de los cromosomas, desviaciones en los valores de fluorescencia que se aproximan al valor establecido por el software para considerar aneuploidía, pero no llegan a superar este umbral.
- *Caótico:* presencia de aneuploidías para mínimo 5 cromosomas.

Adicionalmente, estos mismos resultados fueron evaluados según la capacidad de detección de aneuploidías por cromosoma. Para ello, los embriones catalogados como mosaico fueron divididos en subgrupos según la relación entre las aneuploidías observadas en la biopsia y en el resto del embrión:

- Grupo A: presencia en el embrión completo de al menos una de las aneuploidías presentes en la biopsia.
- Grupo B: las aneuploidías en el embrión completo eran complementarias a las presentes en la biopsia (ej. monosomía en biopsia y trisomía en embrión o viceversa).
- Grupo C: todas las aneuploidías de la biopsia estaban presentes en el embrión completo, y además en el embrión completo se detectaba alguna aneuploidía adicional no detectada en la biopsia.

Las tasas de falsos positivos se obtuvieron comparando los resultados obtenidos en el reanálisis de embriones en día 5 con los diagnósticos de las biopsias embrionarias para cada uno de los tipos de biopsia (blastómera vs. trofoectodermo).

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el Test de Fisher considerando un nivel de significancia superior al 95% (p-valor <0,05).

3.2. Ciclo de FIV y cultivo embrionario

El desarrollo del embrión humano se inicia en el cigoto, que es el resultado de la unión del espermatozoide y el óvulo. La primera división celular ocurre en las siguientes 24 horas (día 1 de desarrollo embrionario) tras la unión, dando lugar a dos células idénticas. El segundo día de desarrollo embrionario, el embrión debería tener 4 células llamadas blastómeras y el tercer día pasar a 6-8 células (estado de *cleavage stage* en inglés). El cuarto día de desarrollo, las células comienzan a compactarse alcanzando el estado de mórula (generalmente el embrión se compone de entre 16-32 células). Y, si el desarrollo embrionario mantiene su curso normal, el quinto día el embrión conforma el estado de blastocisto, en el cual se separan dos líneas celulares: la masa celular interna que a partir de ese momento dará lugar al embrión, y el trofoectodermo que dará lugar a todo el tejido extraembrionario.

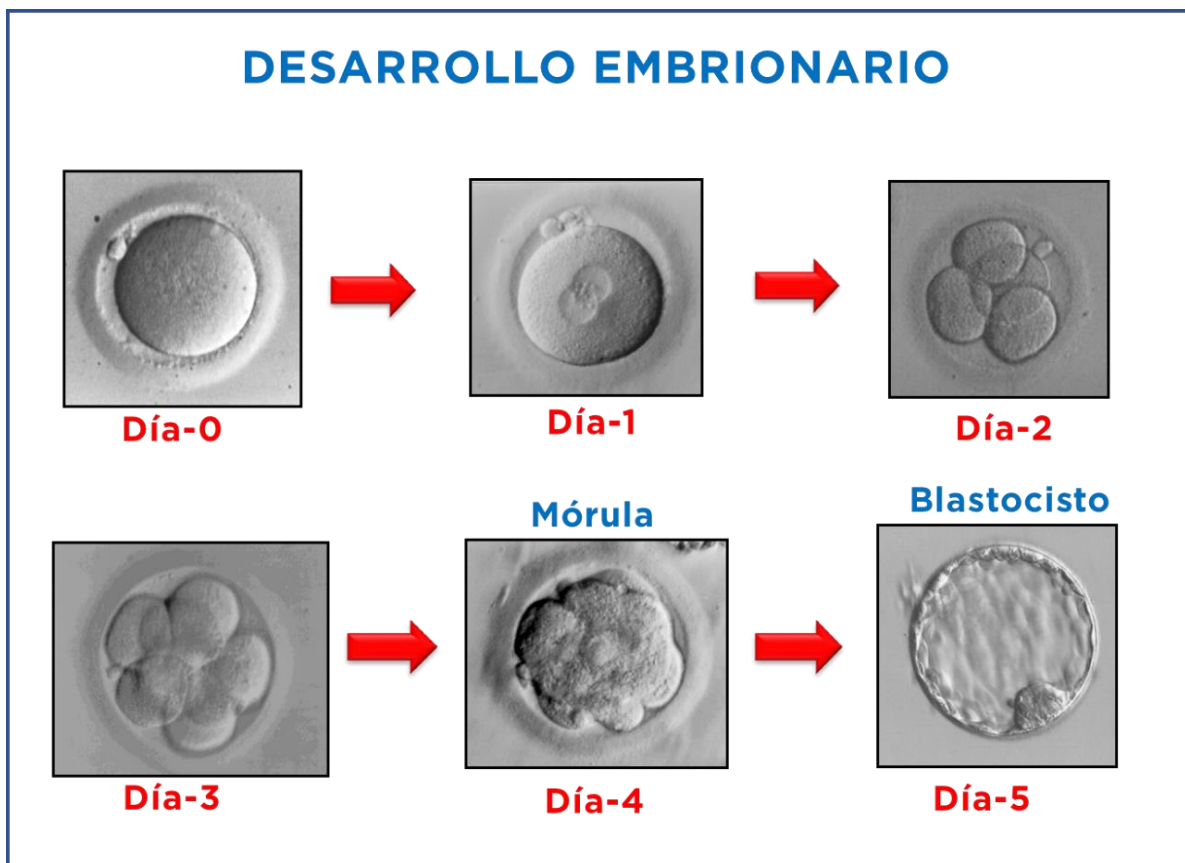


Figura 5. Esquema del desarrollo embrionario humano *in vitro*, desde el estadio de cigoto al de blastocisto.

Para todos los casos de DGP-A incluidos en la presente tesis doctoral, los pacientes siguieron un protocolo de estimulación ovárica estandarizado, y en todos ellos, ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) fue el método de fecundación seleccionado. La comprobación de la fecundación se realizó entre las 17 y 20 horas tras la inyección, y posteriormente cada 24 horas se observó y monitorizó el desarrollo embrionario. Para el cultivo embrionario se usó el medio IVF/CCM medium (1/1) (Vitrolife, Göteborg, Suecia) hasta el día 3 de desarrollo, y a partir de ese momento, los embriones fueron cultivados en medio CCM en cocultivo con una monocapa de células endometriales epiteliales hasta día 5 de desarrollo (Mercader *et al.*, 2006). En día 5, los embriones diagnosticados como euploides fueron transferidos o vitrificados para su posterior uso, mientras que los aneuploides fueron descartados o candidatos a formar parte de estudios de reanálisis pertinentes.

3.3. Técnicas de biopsia

3.3.1. Biopsia embrionaria en día 3

La biopsia de los embriones en día 3 de desarrollo, consiste en la extracción de una única blastómera. Para ello, es recomendable usar medios libres de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ para reducir las uniones entre células. En los embriones incluidos en esta tesis doctoral se usó el medio G-PGD (Vitrolife, Göteborg, Suecia). Posteriormente, ha de practicarse la perforación de la zona pelúcida, a través de la cual extraer la biopsia. En todos los embriones incluidos en la presente tesis doctoral, la perforación de la zona pelúcida se realizó mediante pulsos de sistemas láser infrarrojos acoplados al micromanipulador usando en el laboratorio de FIV (OCTAX, Herbronn, Germany). Los criterios para incluir embriones candidatos a biopsia en los ciclos de DGP-A incluidos en este trabajo son: presencia de 5 o más blastómeras nucleadas, y tener menos del 25% de fragmentación (Mercader *et al.*, 2003).

Tras la biopsia, se observó que la célula extraída estuviese intacta y con el núcleo claramente visible, lo cual garantizaba la presencia de material genético disponible para el análisis.

3.3.2. Biopsia embrionaria en día 4

Esta metodología no es la empleada de rutina en laboratorios de FIV para análisis de biopsia embrionaria mediante DGP-A. De hecho, en este estudio se utilizó únicamente para reanalizar embriones previamente diagnosticados como anormales en día 3, y que eran embriones no viables y por lo tanto no candidatos a transferencia. La metodología empleada para la biopsia embrionaria en día 4 fue la misma empleada en biopsias de embriones en día 3, exceptuando el hecho de que en este caso, se aprovechó el mismo orificio de la zona pelúcida realizado para la biopsia en día 3. El único inconveniente que hemos podido encontrar en el momento de realizar estas biopsias, ha sido que algunos embriones en día 4 de desarrollo han podido iniciar la compactación celular propia del estadio de desarrollo conocido como mórula. En todos los casos, los embriones se pre-incubaron en medio libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, las células se descompactaron y fue posible la biopsia de una única célula embrionaria.

Tras la biopsia, la célula obtenida suele ser de menor tamaño que las células de día 3, pero igualmente se observó que la célula extraída estuviese intacta y con el núcleo claramente visible para garantizar la presencia de material genético disponible para el análisis.

3.3.3. Biopsia de trofoectodermo

La biopsia de trofoectodermo únicamente puede realizarse si el embrión ha alcanzado el estadio de blastocisto, y se han separado las líneas celulares que darán lugar a la masa celular interna y al trofoectodermo. En los embriones incluidos en la presente tesis doctoral, la biopsia de trofoectodermo fue realizada mayoritariamente en embriones de día 5, pero según el desarrollo embrionario, en ciertos casos en los que el día 5 el embrión aún no era un blastocisto completo, la biopsia de trofoectodermo fue realizada al día siguiente (día 6 de desarrollo). Para realizar la perforación de la zona pelúcida, se siguió en todos ellos el método descrito por McArthur *et al.*, 2005.

Tras la biopsia, se observó que en el grupo de células biopsiados (generalmente entre 3 y 10) la mayoría de ellas siguen intactas, ya que durante el proceso de la biopsia alguna célula puede degradarse o lisarse, pero es necesario la presencia de varias células no degradadas para garantizar suficiente material genético disponible para el análisis.

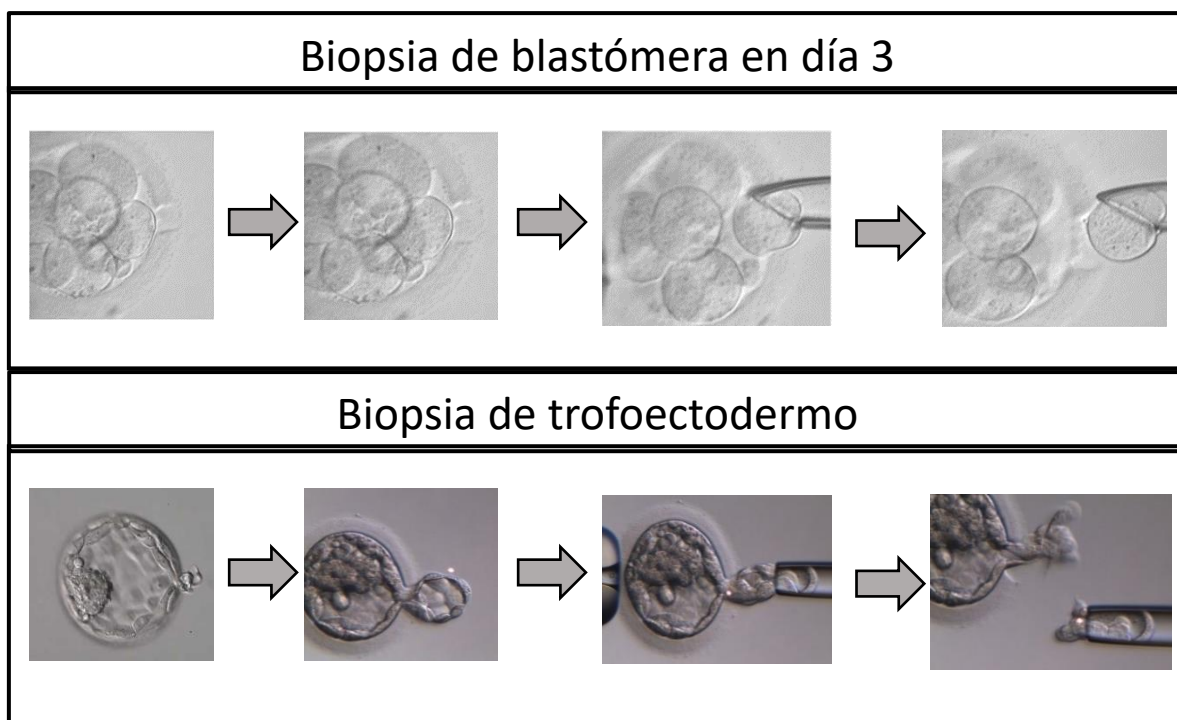


Figura 6. Secuencia de imágenes de los dos tipos de biopsia embrionaria practicados en la presente tesis doctoral. La secuencia superior muestra una biopsia de blastómera (imágenes cedidas por la Dra. Amparo Mercader Bayarri, IVI-Valencia), mientras que la inferior corresponde a una biopsia de trofoectodermo (imágenes cedidas por el Dr. Fernando Bronet Campos, IVI-Madrid).

3.4. Técnicas de análisis de aneuploidías

3.4.1. Análisis de blastómeras individuales mediante FISH

Para poder analizar la biopsia de una célula embrionaria mediante FISH, es necesario un paso previo de fijación de la célula/s a analizar. Cada célula extraída es fijada en un portaobjetos de

crystal bajo microscopio invertido, mediante una solución 3:1 de metanol y ácido acético, usando la técnica de Tarkowski ligeramente modificada (Mercader *et al.*, 2003).

El análisis mediante FISH de aneuploidías para 9 cromosomas se realizó en todos los casos mediante dos rondas consecutivas de hibridación (Figura 7). La primera usando la combinación de sondas comerciales “MultiVysion™ PB panel” para los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22, y la segunda con “MultiVysion™ 4 colour custom panel” para los cromosomas 15, 17, X e Y (Vysis®, Inc. Downers Grove, IL, USA). Adicionalmente, en los casos en los que era necesario, se incorporaron rondas adicionales de hibridación para cromosomas concretos. En estos casos, se utilizaron sondas dirigidas a estos mismos cromosomas, pero diferentes a las usadas anteriormente, en concreto se trata de sondas individuales de la misma casa comercial (Vysis®, Inc. Downers Grove, IL, USA) que bien pueden ser dirigidas al centrómero de dicho cromosoma, específicas de un *locus* concreto del cromosoma o dirigidas a las regiones sub-teloméricas de los brazos *p* o *q* del cromosoma.

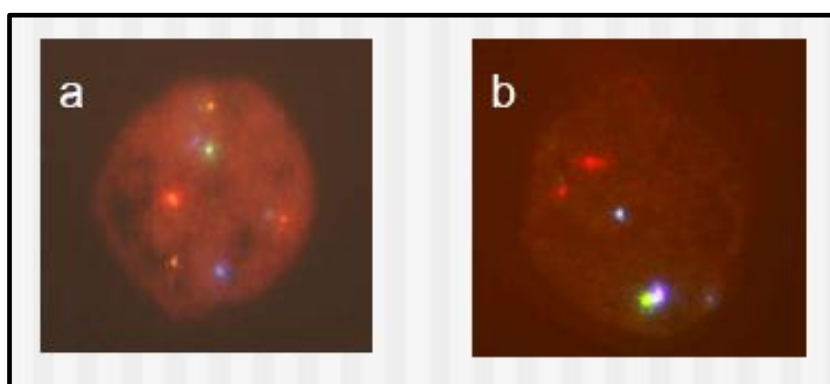


Figura 7. Ejemplo de las dos rondas consecutivas de FISH para 9 cromosomas en blastómera individual. En la imagen “a”, se observa la primera ronda con “MultiVysion™ PB panel” para los cromosomas 13 (Spectrum Red), 16 (Spectrum Aqua), 18 (Spectrum Blue), 21 (Spectrum Green) y 22 (Spectrum Gold). En la imagen “b”, se observa la segunda ronda con “MultiVysion™ 4 colour custom panel” para los cromosomas X (Spectrum Green), Y (Spectrum Blue), 15 (Spectrum Orange) y 17 (Spectrum Aqua).

3.4.2. Reanálisis de células de blastocisto mediante FISH

Al igual que ocurre en la biopsia de una célula embrionaria, para poder analizar un conjunto de células mediante FISH, es necesario un paso previo de fijación de la célula/s a analizar. En este caso, el método de fijación se modificó ligeramente con respecto al utilizado en blastómeras individuales, incluyendo un paso previo de extensión de las células embrionarias en un medio con 0,010N HCl y Tween20 (ligeramente modificado de Harper *et al.*, 1994), para disolver el citoplasma con las células en suspensión en una gota depositada sobre el portaobjetos. A continuación, las células fueron fijadas mediante una solución 3:1 de metanol y ácido acético, usando la técnica de Tarkowski ligeramente modificada (Mercader *et al.*, 2003).

Los cromosomas seleccionados para el reanálisis de células de blastocisto mediante FISH fueron aquellos en los que se observaron aneuploidías en la biopsia embrionaria. Por tanto, según la necesidad del análisis, se utilizaron alguno de los paneles de sondas FISH para el análisis de los 9 cromosomas, o también sondas individuales dirigidas a regiones cromosómicas concretas. Para

estos casos, hay varias opciones de sondas que abarcan todos los cromosomas (Vysis ®, Inc. Downers Grove, IL, USA).

3.4.3. Análisis de biopsia embrionaria y reanálisis de blastocisto entero mediante array-CGH

La técnica de array-CGH ha sido usada en la presente tesis doctoral para el análisis de aneuploidías de:

- a) blastómeras individuales de día 3.
- b) blastómeras individuales de día 4.
- c) biopsias de trofoectodermo de blastocistos en día 5/6 de desarrollo; y
- d) reanálisis de blastocisto completo.

La manipulación de todos los tipos de muestra ha sido exactamente la misma, las muestras fueron lavadas en tres gotas consecutivas de medio con PBS/1%PVP y colocadas en tubos de PCR de 0,2ml que contenían 2µl de PBS.

En todos los tipos de muestra analizados mediante array-CGH en la presente tesis doctoral (blastómera individual, o unas pocas células de trofoectodermo, o el blastocisto completo), se ha seguido exactamente el mismo protocolo de array-CGH. Para todas las muestras, la amplificación WGA se realizó usando el kit comercial Sureplex (BlueGnome, Cambridge, UK). Tras la comprobación de la calidad del producto de WGA mediante un gel de electroforesis convencional, el ADN amplificado fue marcado con un fluoróforo concreto (Cy3; de longitud de onda 532 nm) y se hibridó sobre el array-CGH simultáneamente con un ADN control euploide marcado con un fluoróforo diferente (Cy5; de longitud de onda 635 nm). Este array-CGH está formado por miles BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) (24sure™, BlueGnome, Cambridge, UK) que cubren secuencias de ADN distribuidas a lo largo de toda la longitud del ADN con una separación máxima de 1Mb entre BACs. Tras la hibridación, los portaobjetos fueron escaneados y analizados utilizando un software específico de análisis (BlueFuse™, BlueGnome, Cambridge, UK). Los perfiles obtenidos fueron el resultado de la comparación de la intensidad de fluorescencia de cada una de las muestras respecto al control cromosómicamente normal, y según la variación de la misma (en base a la desviación del \log_2 por cromosoma) ofreciendo el diagnóstico correspondiente al número de copias por cromosoma.

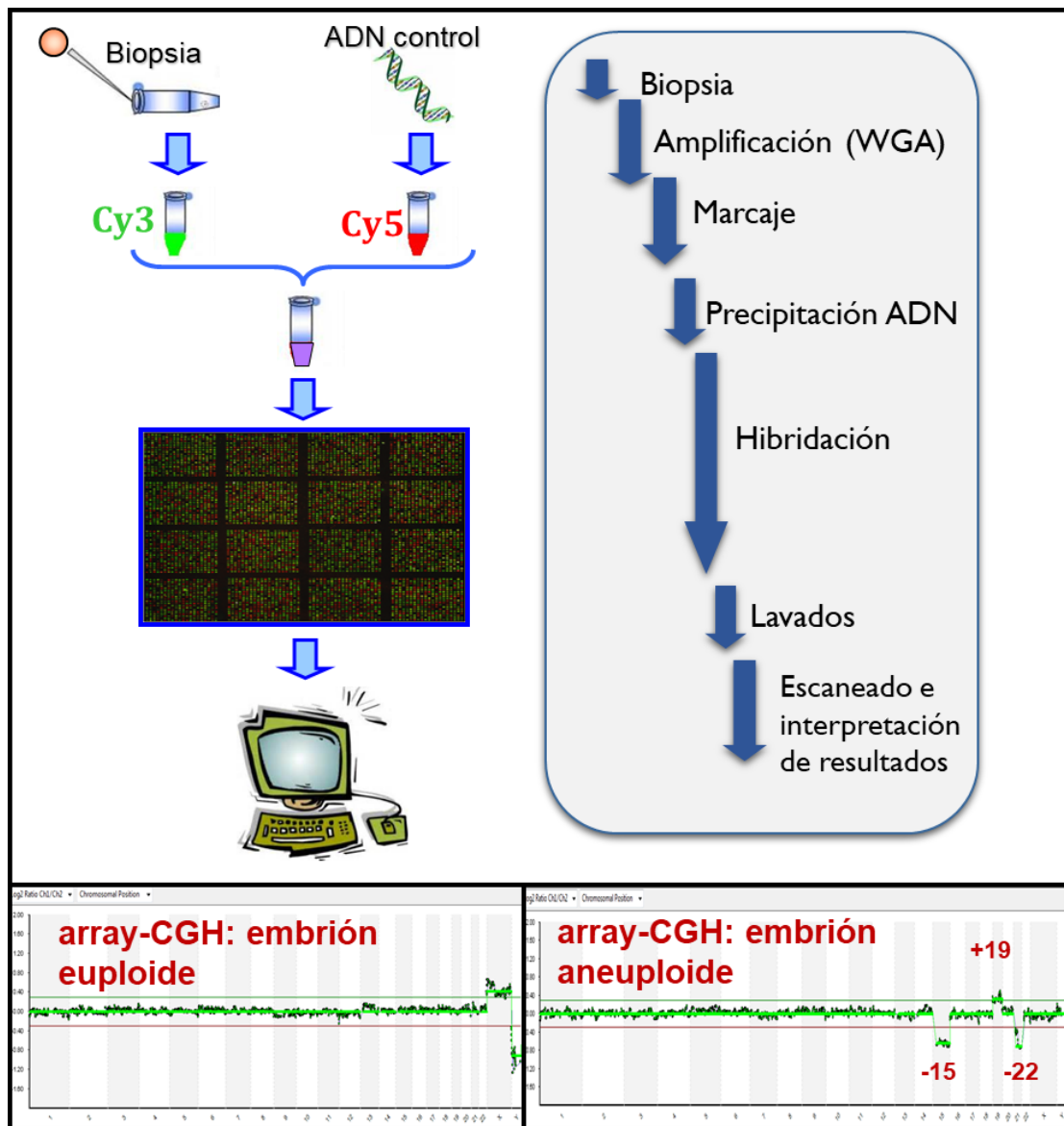


Figura 8. Esquema del protocolo de array-CGH seguido en la presente tesis doctoral y ejemplo de dos resultados. La imagen superior muestra los pasos del protocolo que se ha realizado para el análisis de los diferentes tipos de muestras incluidas en la presente tesis doctoral: blastómera individual (tanto de día 3 como de día 4 de desarrollo), biopsias de trofoectodermo, o blastocistos completos. Las imágenes inferiores son ejemplos de interpretación de resultados obtenidos mediante este protocolo: la imagen izquierda inferior muestra un resultado normal (46,XX), mientras que la imagen derecha inferior muestra un resultado anormal (45,XY,-15,+19,-22).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han sido expuestos siguiendo los objetivos planteados en la misma.

4.1. Objetivo 1: Valoración de la utilidad de la incorporación de rondas de hibridación adicionales en la técnica de FISH aplicada a DGP-A.

4.1.1. Resultados obtenidos tras la incorporación de rondas adicionales de hibridación en el diagnóstico mediante FISH de biopsias embrionarias de día 3.

Los resultados obtenidos tras la incorporación de rondas de hibridación adicionales difieren según el motivo por el cual se decidió incorporar estas sondas adicionales. Para los casos en los que se realizaron rondas de hibridación adicionales porque no se obtuvo un diagnóstico claro (1.496 embriones), en un 59% de ellos se obtuvo un resultado cromosómicamente normal para los cromosomas analizados, mientras que un 40,1% fueron cromosómicamente anormales, y un 0,9% seguían teniendo un resultado no concluyente a pesar de las rondas de hibridación adicionales, por lo que fueron finalmente diagnosticados como “no-informativos” (Figura 10).

Para los restantes 981 embriones con presencia de aneuploidías individuales, en 890 biopsias hubo presencia de monosomía única con mientras que las restantes 91 biopsias presentaron trisomía única. De los 890 embriones con monosomías, 718 (80,4%) fueron confirmadas tras las rondas de hibridación adicionales, y en las restantes 174 (19,6%) biopsias no fueron confirmadas, si no que se obtuvo resultado compatible con presencia de 2 copias para el cromosoma en cuestión. En cambio, en el grupo de biopsias con trisomía única, hubo un único caso para el que la trisomía inicial no fue confirmada (1/91; 1,1%) (Figura 9).

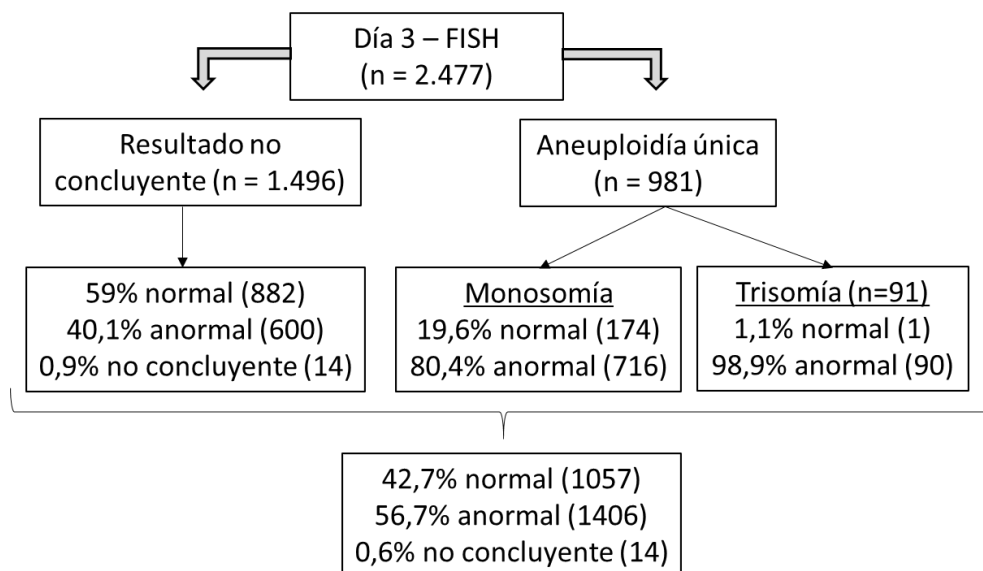


Figura 9. Representación esquemática de los resultados obtenidos en la consecución del objetivo primero de la presente tesis doctoral. Corresponde a la figura 1 del primer artículo cuyos datos han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod.* 2010; 25:1812–7).

Del total de 2.477 blastómeras en las que se realizaron rondas de hibridación adicionales, se obtuvo un resultado final de cromosómicamente normal para los 9 cromosomas analizados en un 42,7% de biopsias, mientras que el 56,7% fueron finalmente diagnosticadas como cromosómicamente anormales, y las restantes 0,6% fueron finalmente clasificadas con resultado “no-informativo” porque el resultado seguía siendo no concluyente (Figura 10).

Analizando estos mismos resultados desde la perspectiva de la detección de aneuploidías para cada uno de los cromosomas individualmente, un total de 917 monosomías con diagnóstico dudoso fueron analizadas tras las rondas de hibridación adicionales en ambos grupos (890 como monosomías individuales, y otras 27 monosomías que se encontraron junto con un diagnóstico dudoso también para otro cromosoma). La tasa de confirmación de monosomías por cromosoma varió entre un 48,8% para el cromosoma 16, hasta un máximo de 85,7% para el cromosoma 22, siendo la tasa media de confirmación de monosomías para todos los cromosomas analizados del 68,5% (Tabla 3).

Cromosoma	Monosomías rehibridadas (n)	Resultado final monosomía (%)	Resultado final normal (%)
13	74	62 (83,8)	12 (16,2)
15	145	117 (80,7)	28 (19,3)
16	258	126 (48,8)	129 (50)*
17	72	41 (56,9)	31 (43,1)
18	118	75 (63,6)	43 (36,4)
21	124	99 (79,8)	25 (20,2)
22	126	108 (85,7)	18 (14,3)
TOTAL	917	628 (68,5)	289 (31,2)

Tabla 3. Tasa de confirmación de monosomías para los autosomas analizados mediante FISH en biopsias de día 3 (cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22). Se muestran los resultados por cromosoma del total de 917 monosomías para las cuales se realizó una ronda de hibridación adicional. Corresponde a la tabla 2 del primer artículo cuyos datos han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. Hum Reprod. 2010; 25:1812–7).

*Únicamente para el cromosoma 16, hubo 3 casos con resultado final de trisomía (3/917; 0,3%).

En cambio, en el grupo de embriones cuya única anomalía era la presencia de una trisomía, todas ellas fueron confirmadas salvo una trisomía para el cromosoma 16 (1/91; 1.1%) en las que el resultado definitivo tras las rondas adicionales fue presencia de 2 copias para el cromosoma 16 (Tabla 4).

Cromosoma	Trisomías rehibridadas (n)	Resultado final trisomía (%)
13	6	6 (100)
15	26	26 (100)
16	11	10 (90,9)
17	5	5 (100)
18	13	13 (100)
21	9	9 (100)
22	18	18 (100)
TOTAL	88	90 (98,9)

Tabla 4. Tasa de confirmación de trisomías para los autosomas analizados mediante FISH en biopsias de día 3 (cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22). Se muestran los resultados por cromosoma de las 91 trisomías para las cuales se realizó una ronda de hibridación adicional. Corresponde a la tabla 3 del primer artículo cuyos datos han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. Hum Reprod. 2010; 25:1812–7).

4.1.2. Comparación de la tasa de falsos positivos de la técnica de FISH en biopsias de día 3, con y sin rondas adicionales de hibridación.

Como parte final de este objetivo, y para corroborar si el contenido cromosómico descrito tras la incorporación de rondas de hibridación adicionales era el realmente presente en el resto del embrión, 132 embriones completos fueron reanalizados mediante FISH en día 5, en 80 de ellos se habían realizado rondas de hibridación adicionales, y no así en los restantes 52 embriones. El diagnóstico obtenido en la biopsia fue confirmado en el resto de células de los blastocistos analizados en el 95% (76/80) de embriones en los que se habían incluido rondas adicionales de hibridación; y sólo en el 82,7% (43/50) de blastocistos sin ellas. Esta diferencia en la tasa de confirmación de diagnóstico entre los dos tipos de análisis practicados en la biopsia de día 3 fue estadísticamente significativa ($p=0,0443$) (Tabla 5).

Tipo de diagnóstico	Sin rehibridaciones en día 3	Con rehibridaciones en día 3
Confirmado	43 (82,7%)	76 (95%)*
No confirmado	9 (17,3%)	4 (5%)
TOTAL	52	80

Tabla 5. Comparación de resultados de los 132 embriones reanalizados mediante FISH en día 5, según el tipo de análisis de FISH realizado en la biopsia de día 3: con rondas de hibridación adicional versus sin estas hibridaciones adicionales (* $p=0,0443$). Modificada a partir de la tabla 4 del primer artículo cuyos datos han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. Hum Reprod. 2010; 25:1812–7).

PUBLICACIÓN CORRESPONDIENTE AL OBJETIVO 1

**Improving FISH diagnosis for
preimplantation genetic aneuploidy screening**

Human Reproduction 2010; 25:1812–7.

Pere Mir Pardo, Lorena Rodrigo, Emilia Mateu, Vanessa Peinado, Miguel Milán, Amparo Mercader, Pilar Buendía, Arantza Delgado, Antonio Pellicer, José Remohí y Carmen Rubio.

Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening

P. Mir^{1,*†}, L. Rodrigo^{1,†}, E. Mateu¹, V. Peinado¹, M. Milán¹, A. Mercader¹, P. Buendía¹, A. Delgado¹, A. Pellicer², J. Remohí², and C. Rubio¹

¹PGD Unit, Institut Universitari IVI-Valencia, Plaza Policía Local, 3, 46015 Valencia, Spain ²Reproductive Unit, Institut Universitari IVI-Valencia, Plaza Policía Local, 3, 46015 Valencia, Spain

*Correspondence address. E-mail: pmir@ivi.es

Submitted on February 25, 2010; resubmitted on April 7, 2010; accepted on April 20, 2010

BACKGROUND: In our routine programme of preimplantation genetic aneuploidy screening (PGS) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), nine chromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y) are analysed in two consecutive hybridization rounds. We also perform additional hybridization rounds for these chromosomes, using probes that bind to different loci, for non-conclusive results and for confirmation of certain aneuploidies. The aim of this study was to evaluate the impact of additional hybridization rounds on FISH accuracy.

METHODS: This is a retrospective analysis of our FISH data from 1000 PGS cycles performed from December 2007 to December 2008 for various indications. In addition to the hybridization rounds described above, 132 of the embryos diagnosed as chromosomally abnormal were re-analysed on Day 5.

RESULTS: A total of 2477 embryos were re-hybridized, 1496 due to non-conclusive results and 981 to confirm observed aneuploidies. After re-hybridization, 882 embryos (59%) were then diagnosed as normal, 600 embryos (40.1%) had a clear abnormality and only 14 embryos (0.9%) remained non-informative. From the 981 embryos in the latter group, 890 embryos had monosomies and, after re-hybridization 174 embryos (19.6%) were normal and 716 (80.5%) had confirmed monosomies. In contrast, re-hybridization confirmed 90 (98.9%) of the 91 observed trisomies. In addition, Day-5 re-analysis of abnormal embryos showed a higher rate of concordant diagnosis between Day 3 and Day 5 when re-hybridizations had been included on Day-3 (95 versus 82.7%; $P = 0.0443$), especially for the confirmation of monosomies (82.8 versus 61.0%; $P = 0.0087$).

CONCLUSIONS: Our data indicate that additional hybridization rounds improve the accuracy of the diagnosis, increasing the number of chromosomally normal embryos available for transfer. Re-hybridization with additional probes as a standard approach to PGS could enhance the potential benefits of the technique.

Key words: preimplantation genetic screening / FISH accuracy / subtelomeric probes / re-hybridization

Introduction

Preimplantation genetic aneuploidy screening (PGS) has been offered in many IVF centres to improve the clinical outcome of certain groups of patients. The method most widely used for aneuploidy screening is fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The majority of centres that offer PGS analyse between 8 and 12 chromosomes (those most involved in aneuploidies in preimplantation embryos, spontaneous miscarriages and newborns carrying aneuploidies). The successful detection of FISH probes in these protocols do not reach 100%; indeed, with an increasing number of chromosomes analysed, lower

efficiency per probe has been reported (Abdelhadi *et al.*, 2003; Baart *et al.*, 2007).

However, recently the usefulness of PGS has become controversial. Eleven prospective randomized controlled trials (RCT) of Day-3 and blastocyst biopsies have been published to date. Of the RCTs performed of 'poor prognosis' patients, three of them (Mastenbroek *et al.*, 2007; Hardarson *et al.*, 2008; Jansen *et al.* 2008) reported statistically significant detrimental results in live birth rates when applying PGS compared with control groups; three RCTs (Staessen *et al.*, 2004; Blockeel *et al.*, 2008; Debrock *et al.*, 2009) observed no statistical differences between the two groups; and two (Werlin *et al.*, 2003;

[†] These two authors contributed equally to this work.

Schoolcraft et al., 2009) observed potential benefits, although not statistically significant, in the PGS group for delivery (Schoolcraft et al., 2009) and pregnancy rates (Werlin et al., 2003). Three more RCT have been performed in 'good prognosis' patients: one observed no differences in live birth rates between PGS and control groups (Staesen et al., 2008); another found a non-significant trend to better results in the PGS group for pregnancies and live birth rates (Mersereau et al., 2008); and the last reported statistically significant reductions in implantation and live birth rates when applying PGS (Meyer et al., 2009).

The poor clinical outcomes reported in these RCTs have been attributed to several methodological flaws (Cohen and Grifo, 2007; Munne et al., 2007; Simpson, 2008; Rubio et al., 2009). Embryo biopsy and blastomere fixation require high dexterity and should be performed by experienced embryologists. Further, a defective biopsy could damage the embryo (Simpson, 2008), thus affecting survival and potential implantation. Moreover, defective fixation results in low quality nuclei, making reliable diagnoses difficult (Munne et al., 1996; Velilla et al., 2002) and yielding an increased number of completely non-informative nuclei (Simpson, 2008). More recently, embryo culture conditions have also been shown to influence PGS outcome (Beyer et al., 2009; Mercader et al., 2009), demonstrating the subtleties of performing these techniques.

Not only are technical difficulties of concern, but issues also arise in the interpretation of the fluorescent signals. Several pitfalls have been described in the interpretation of FISH signals in interphase nuclei, including overlapping signals, split signals, weak or faded signals and cross-hybridization or polymorphisms in the target sequence of the probe (Magli et al., 2001; Colls et al., 2004, 2007; Rodrigo et al., 2004). Considering that only one or two cells are available for analysis, these limitations can result in over-diagnosis of abnormal embryos and in a high percentage of non-informative embryos for any of the tested chromosomes. Some authors have reported improved results after re-hybridizing non-conclusive nuclei with additional probes (Colls et al., 2007; Uher et al., 2009). Indeed, the preimplantation genetic diagnosis international society (PGDIS) recommends the performance of re-hybridization rounds to increase the accuracy of diagnosis [Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS), 2008].

The aim of this study was to implement a strategy to improve the accuracy and the detection rate of aneuploidy screening. For this purpose, our sequential FISH protocol includes a 'double-check' for some chromosomes, using additional DNA probes that bind to different loci of the targeted chromosomes. Subsequent hybridization rounds are performed for any of the chromosomes analysed for non-conclusive results and for confirmation of certain aneuploidies. Because of previous reports of 'false monosomies' (Rodrigo et al., 2004), we re-hybridized all monosomies, but also wanted to confirm trisomies. In addition, some of the embryos diagnosed as chromosomally abnormal on Day-3 were re-analysed on Day 5 to validate the Day-3 diagnosis.

Materials and Methods

This is a retrospective analysis of 1000 PGS cycles performed from December 2007 to December 2008 for the following indications: advanced maternal age, recurrent miscarriage, repetitive implantation failure, severe male factor and patients with numerical abnormalities in

sex chromosomes, as well as combined indications. This study only included PGS cycles in which at least one embryo needed additional rounds. All samples were analysed at IVI-Valencia, although they came from patients of the following IVI clinics: Alicante, Almería, Barcelona, Bilbao, Lisboa, Madrid, Murcia, Sevilla, Valencia and Vigo.

Patients included in the study underwent ovarian stimulation following standardized protocols and intracytoplasmic sperm injection was performed in all cases. Fertilization was assessed 17–20 h after microinjection and embryo cleavage was recorded every 24 h. Embryos were grown in IVF/CCM medium (1/1) (Vitrolife, Göteborg, Sweden) until Day 3 and subsequently cultured in CCM medium with a monolayer of endometrial epithelial cells until Day 5, when chromosomally normal embryos were transferred or cryopreserved (Mercader et al., 2003).

Embryo biopsy was performed on Day 3 and can be summarized as follows: embryos were placed on a droplet containing a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free medium (G-PGD, Vitrolife, Göteborg, Sweden) and the zona pellucida was perforated using acid Tyrode's solution or laser technology (OCTAX, Herbronn, Germany). Only embryos with ≥ 5 nucleated blastomeres and $\leq 25\%$ of fragmentation degree were biopsied. One or two blastomeres were removed from each embryo depending on the cell number and fragmentation degree. Two cells were biopsied only in embryos with ≥ 7 cells and $< 15\%$ of fragmentation degree. Individual blastomeres were fixed on glass slides under an inverted microscope, using a slightly modified Tarkowski's protocol with 3:1 methanol and acetic acid (Mercader et al., 2003).

A total of nine chromosomes were analysed in two consecutive rounds of hybridization: in the first round we used MultiVysion™ PB panel composed of locus-specific probes for chromosomes 13, 21 and 22 and centromeric probes for chromosomes 16 and 18; in the second round we used MultiVysion™ 4 Colour Custom panel composed of centromeric probes for chromosomes 15, 17, X and Y (Vysis®, Inc. Downers Grove, IL, USA). Re-hybridization rounds were conducted when needed by using subtelomeric probes for chromosomes 15 (TelVysion™ 15q), 16 (TelVysion™ 16p, TelVysion™ 16q), 17 (TelVysion™ 17q), 18 (TelVysion™ 18q), 21 (TelVysion™ 21q) and 22 (TelVysion™ 22q); a locus-specific probe for chromosome 13 (Vysis® LSI® 13q34 Spectrum Green™); a dual probe for X chromosome (Vysis® LSI® KAL Spectrum Orange/CEP® X Spectrum Green™) and a centromeric probe for Y chromosome (Vysis® CEP® Y Alpha Satellite Spectrum Orange™). Only well-preserved nuclei with enough chromatin quality after the two conventional hybridization rounds were re-hybridized. Using this approach, the final diagnosis was obtained on Day 4 or early on Day 5.

Blastomeres from a total of 2477 Day-3 embryos underwent re-hybridization rounds using this methodology. In 1496 embryos, the re-hybridization was carried out due to non-conclusive results in the two conventional rounds, including embryos with 'ambiguous signals', 'doubtful monosomies', 'doubtful disomies' or 'doubtful trisomies' for a specific chromosome(s). For the remaining 981 embryos, the re-hybridization was performed to double-check monosomies and trisomies.

Some of the embryos diagnosed as chromosomally abnormal on Day 3 were re-analysed on Day 5 to validate their diagnosis. The whole Day-5 embryos were fixed using a slightly modified fixation method described in Harper et al. (1994). After removing the zona pellucida with Tyrode's acid, Day-5 embryos were placed in a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free medium (G-PGD, Vitrolife, Göteborg, Sweden). Then, the whole embryo was fixed by using a spreading solution with 0.010 N HCl and Tween 20; when cytoplasm was dissolved, nuclei were re-fixed with methanol-acetic acid. During the present study, a total of 132 Day-5 embryos previously diagnosed as abnormal on Day 3 were re-analysed for the same nine chromosomes. Day-5 embryos were classified as normal ($>80\%$ of normal cells); homogeneously abnormal ($>80\%$ of cells with the same abnormality) or abnormal mosaics (two or more cell lines, each of them

Table I Percentages of events per chromosome finally diagnosed with two clear signals (normal pattern) after re-hybridization in the group of embryos with non-conclusive diagnosis after the two initial rounds.

Chromosome	Ambiguous signals	Doubtful monosomies	Doubtful disomies	Doubtful trisomies	Total
13	47/81 (58%)	15/38 (39.5%)	248/286 (86.7%)	83/142 (58.5%)	393/547 (71.8%)
15	135/228 (59.2%)	52/85 (61.2%)	199/237 (84%)	62/107 (57.9%)	448/657 (68.2%)
16	297/451 (65.9%)	83/119 (69.7%)	161/185 (87%)	16/39 (41%)	557/794 (70.2%)
17	27/47 (56.5%)	25/35 (71.4%)	39/44 (88.4%)	12/23 (52.4%)	103/149 (69.1%)
18	52/84 (61.9%)	41/67 (61.2%)	244/275 (88.7%)	56/97 (57.7%)	393/523 (75.1%)
21	44/67 (65.7%)	31/44 (70.5%)	174/206 (84.5%)	24/67 (35.8%)	273/384 (71.1%)
22	25/52 (48.1%)	19/39 (48.7%)	132/160 (82.5%)	42/75 (56%)	218/326 (66.9%)
TOTAL	627/1010 (62.1%)	266/427 (62.3%)	1197/1393 (85.9%)	295/550 (53.6%)	2385/3380 (70.6%)

with $\geq 20\%$ of cells). We analysed the confirmation rate of diagnosis between Day 3 and Day 5 according to: (i) number of blastomeres analysed on Day 3 (one or two); (ii) the type of diagnosis on Day 3 (with or without re-hybridization); and (iii) the type of probe used in the initial diagnosis on Day 3 (locus-specific or centromeric probes). Of the 132 Day-5 re-analysed embryos, Day-3 diagnosis had been performed with one blastomere in 102 embryos, and with two blastomeres in 30 embryos. Concerning the FISH protocol used, re-hybridization rounds with additional probes had been conducted in 80 embryos, whereas in the remaining 52 embryos no re-hybridization rounds had been performed on Day-3.

Fisher's exact test was applied for statistical analysis considering a level of significance of $P < 0.05$.

Results

In the group of embryos with non-conclusive results after the two initial hybridization rounds, 1496 embryos underwent re-hybridization for one or more chromosomes ($n = 3380$ events, see Table I). A total of 70.6% of the re-hybridized chromosomes showed two clear signals (normal pattern). For the category of non-conclusive results, 62.1% of the chromosomes initially classified as 'ambiguous results' were diagnosed as normal after re-hybridization; 62.3% of those classified as 'doubtful monosomies' were rescued as normal; 85.9% of the 'doubtful disomies' were confirmed as normal; and finally, in the subgroup of 'doubtful trisomies', a lower percentage of chromosomes (53.6%) were normal after re-hybridization. As a consequence, 882 embryos (59%) of the 1496 re-hybridized due to non-conclusive results were rescued as normal for all of the analysed chromosomes, 600 embryos (40.1%) were clearly diagnosed as abnormal and only 14 embryos (0.9%) remained non-informative (Fig. 1).

Tables II and III show the re-hybridization results in the embryos diagnosed as abnormal after the two initial hybridization rounds. A total of 981 embryos were re-hybridized with additional probes on Day 3 (890 embryos with one or more monosomies and 91 embryos with single trisomies). The number of monosomies re-hybridized was 917; 68.5% were confirmed to be monosomies and 31.2% were diagnosed as normal after re-hybridization (Table II). The percentage of confirmed monosomies was significantly lower for chromosomes initially analysed with centromeric probes (chromosomes 15, 16, 17 and 18) than for chromosomes diagnosed with locus-specific probes (chromosomes 13, 21 and 22) (60.3

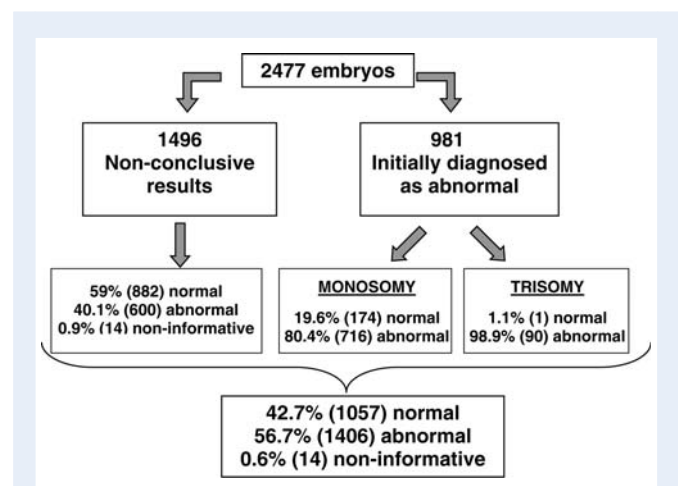


Figure 1 Schematic results of the two groups of embryos included in the study: embryos with non-conclusive results after the two initial hybridization rounds, and embryos with monosomies or with single trisomies. The percentages are shown by the final diagnosis of the embryos. The box below shows the joint results and the final diagnosis of all the re-hybridized embryos included in the study.

Table II Confirmation rate of monosomies in the autosomal analysed chromosomes.

Chromosome	Number of monosomies reanalysed	Number of confirmed monosomies (%)	Normal
13	74	62 (83.8%)	12 (16.2%)
15	145	117 (80.7%)	28 (19.3%)
16	258	126 (48.8%)	129 (50%)*
17	72	41 (56.9%)	31 (43.1%)
18	118	75 (63.6%)	43 (36.4%)
21	124	99 (79.8%)	25 (20.2%)
22	126	108 (85.7%)	18 (14.3%)
Total	917	628 (68.5%)	289 (31.2%)*

*In three cases the final diagnosis was trisomy 16 (3/917; 0.3%).

versus 83%, $P < 0.0001$, respectively). Monosomy 16, the most frequent monosomy in our series, showed the lowest confirmation rate (48.8%). In contrast, the confirmation rate for trisomies was 98.9%, as only one false trisomy for chromosome 16 was found in 91 single trisomies re-hybridized (Table III). As a consequence, the percentage of embryos finally rescued as normal after re-hybridization with additional probes was 19.6% for embryos initially diagnosed with monosomies and 1.1% for embryos diagnosed with trisomies (Fig. 1).

Table III Confirmation rate of trisomies in the autosomal analysed chromosomes.

Chromosome	Number of trisomies reanalysed	Number of confirmed trisomies (%)
13	6	6 (100%)
15	26	26 (100%)
16	11	10 (90.9%)*
17	5	5 (100%)
18	13	13 (100%)
21	9	9 (100%)
22	18	18 (100%)
Total	91	90 (98.9%)*

*Only one trisomy 16 was finally diagnosed as normal. The remaining trisomies were confirmed to be trisomies.

In summary, a total of 2477 embryos were re-hybridized with additional probes, 42.7% of embryos proved to be normal after re-hybridization, 56.7% were diagnosed with a clear abnormality and only 0.6% remained non-informative (Fig. 1). Thus, a greater number of embryos were diagnosed as chromosomally normal and were available for transfer after discarding 'false monosomies' and decreasing the number of non-informative embryos.

Validation analyses in 132 Day-5 embryos are shown in Table IV. Of those Day-5 embryos, 73 were blastocysts, 46 were morulae and 13 were arrested embryos at cleavage stage. A mean number of 33.8 ± 28.3 cells were analysed per embryo (range: 3–179). According to the number of blastomeres analysed on Day 3, a similar rate of concordant diagnosis between Day 3 and Day 5 was observed (90.2 and 90%, for one and two blastomeres, respectively). However, the confirmation rate between Day-3 and Day-5 results was significantly increased when re-hybridization rounds with additional probes had been used on Day-3 (95 versus 82.7%; $P = 0.0443$ with and without additional probes, respectively). Therefore, the error rate for the FISH technique was 17.3% without using additional probes and 5% when additional rounds were conducted. Additionally, 42% of the embryos diagnosed as abnormal on Day 5 were homogeneously abnormal and 58% were abnormal mosaic embryos, regardless of whether or not additional probes had been used on Day 3.

Finally, Table V shows the Day-5 confirmation rate of monosomies and trisomies diagnosed on Day 3. According to the FISH protocol applied on Day 3, Day-5 confirmation rate of aneuploidies was significantly higher when re-hybridization rounds had been performed on Day 3 (84.4 versus 69.2%; $P = 0.0361$ with and without additional

Table IV Re-analysis by FISH of 132 Day-5 embryos previously diagnosed as abnormal on Day 3 by FISH.

Day 5 re-analysis						
Type of diagnosis	Without using re-hybridizations on Day 3		Using re-hybridizations on Day 3		TOTAL	
1 cell	42	35 A (83.3%) 7 N (16.7%)	60	57 A (95%) 3 N (5%)	102	92 (90.2%)
2 cells	10	8 A (80%) 2 N (20%)	20	19 A (95%) 1 N (5%)	30	27 (90%)
Total	52	43 A (82.7%) ^a	80	76 A (95%) ^b	132	119 (90.2%)

N, normal embryos on Day 5; A, abnormal embryos on Day 5 (homogeneously abnormal + abnormal mosaic embryos).

^{a,b} $P = 0.0443$.

Table V Day-5 confirmation rate of monosomies and trisomies observed on Day 3 according to the type of FISH protocol used on Day 3 (including additional probes or not) and the type of probe used in the initial diagnosis on Day 3 (LSI, locus-specific probe or CEP, centromeric probe).

		Monosomy	Trisomy	Total
With additional probes	LSI	23/27 (85.2%)	16/20 (80%)	81/96 (84.4%) ^c
	CEP	30/37 (81.1%) ^a	12/12 (100%)	
Without additional probes	LSI	18/27 (66.7%)	16/20 (80%)	63/91 (69.2%) ^d
	CEP	18/32 (56.3%) ^b	11/12 (91.7%)	

^{a,b} $P = 0.0361$; ^{c,d} $P = 0.0155$.

probes, respectively). The confirmation rate for monosomies was significantly improved when applying additional hybridization rounds (82.8 versus 61.0%; $P = 0.0087$, with and without additional probes, respectively), whereas no difference was observed for trisomies.

Discussion

In this study, we have shown an improvement on the detection rate and the accuracy of FISH diagnosis due to re-hybridization with additional probes. The detection rate of the FISH technique has reached a 99.4% of embryos successfully diagnosed and only 0.6% undiagnosed. These results contrast with those reported in the aforementioned RCTs regarding the usefulness of PGS. In fact, the reported percentages of non-informative embryos range from 3.2% (Debrock *et al.*, 2009) to 20.1% (Mastenbroek *et al.*, 2007).

Previous reports have suggested that centromeric probes were more prone to give non-conclusive results (Colls *et al.*, 2007) than locus-specific probes. We also found that centromeric probes were more likely to have low confirmation rates for monosomies. Chromosome 16 had the highest incidence of monosomy in the initial round, but the lowest rate of confirmed monosomies (48.8%), as well as the unique event of non-confirmed trisomy. This observation could be explained by polymorphisms in the centromere of chromosome 16 (Colls *et al.*, 2004) and because of weak fluorescence intensity of some commercial chromosome 16 centromeric probes. In Hardarson *et al.* (2008), the most frequent single aneuploidy was monosomy 16, which was found in 10% of all embryos analysed. This percentage would likely have been dramatically decreased if re-hybridizations using subtelomeric probes for chromosome 16 were employed, and consequently a higher number of chromosomally normal embryos would have been available for transfer.

The increased efficiency per probe achieved after re-hybridizations with additional probes is reflected in the final diagnosis of the embryo. In this sense, the results obtained in the re-hybridized embryos are different among groups. In the group of embryos with non-conclusive results, 59% of the re-hybridized embryos proved to be normal. In contrast, in the group of embryos re-hybridized to double-check abnormalities, most of the trisomies were confirmed (98.9%), but the confirmation rate for monosomies was 68.5%. Specifically, the rates of confirmed monosomies were lower for chromosomes 16 (48.8%), 17 (56.9%) and 18 (63.6%), in which centromeric probes were initially employed.

Our validation results in Day-5 embryos showed similar confirmation rates of diagnosis between Day 3 and Day 5 when one or two blastomeres had been analysed on Day 3 (90.2 and 90%, respectively). Thus, in our study, the biopsy of two blastomeres did not increase the accuracy of FISH technique.

In contrast, when re-hybridization with additional probes had been performed on Day 3, a higher confirmation rate between Day 3 and Day 5 was observed compared with embryos diagnosed without additional probes on Day 3 (95 versus 82.7%). Moreover, when results were analysed according to the type of abnormality, Day-5 confirmation rate of monosomies was significantly higher when additional probes on Day 3 had been used (82.8 versus 61%). However, the confirmation rate was similar for trisomies, whether or not additional probes had been used on Day 3 (87.5 versus 84.4%). These percentages agree with our results regarding 'false

monosomies' detected on Day 3. That means, if we do not include those 'false monosomies' detected by re-hybridization with additional probes on Day 3, a higher confirmation of abnormal diagnosis is obtained between Day 3 and Day 5.

More interestingly, Staessen *et al.* (2004) reported the re-analysis of Day-5 blastocysts diagnosed as chromosomally abnormal on Day 3, and in 8.4% the diagnosis was not confirmed. In this study, the lowest confirmation rate was obtained for Day-3 monosomies (10.5%) compared with Day-3 trisomies (1.6%). This situation could be the result of over-diagnosis of Day-3 monosomies when re-hybridizations with additional probes are not performed. Another study in which additional probes were not employed, showed a similar result (Magli *et al.*, 2000): the re-analysis of inner cell mass (ICM) from four blastocysts diagnosed as monosomic on Day 3 showed 48/82 monosomic ICM cells (58.5%), whereas in four blastocysts diagnosed as trisomic on Day 3, 58/62 ICM cells (93.5%) carried the same Day-3 trisomy.

In conclusion, we found that re-hybridization with additional probes resulted in a higher percentage of accurately diagnosed Day-3 embryos by FISH technique, by decreasing the percentage of non-informative embryos and not including the false monosomies. The re-analysis of Day-5 embryos confirmed the increased accuracy of the technique, since embryos diagnosed as abnormal on Day 3 using additional probes displayed a higher concordance (95%) with Day-5 results.

Therefore, we support re-hybridization as a standard approach to PGS for embryos with non-conclusive results and monosomies. PGS with additional hybridization rounds would increase the number of chromosomally normal embryos available for transfer, enhancing the potential benefits of the technique when applied to different patient populations.

Authors' roles

P.M., L.R. and C.R.: study design and analysis of data; P.M. and L.R.: data collection and manuscript drafting; P.M.: writing of the main body of the text; A.M., P.B. and A.D.: embryo biopsy, blastomere fixation and Day-5 embryo fixation; P.M., L.R., E.M., V.P., M.M. and C.R.: analysis of FISH signals on blastomeres; L.R., E.M., V.P., M.M. and C.R.: re-analysis of day-5 embryos; L.R., A.P., J.R. and C.R.: critical discussion and final revision of the text.

Acknowledgements

The authors wish to thank the clinicians, IVF embryologist and technicians from all the IVI clinics participating in the study for their cooperation in the development of this study. Special thanks to all the staff of PGD team of IVI-Valencia.

Funding

This study was partially supported by IZASA S.A., CH-Werfen Company, Spain.

References

- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 2003;**6**:226–231.
- Baart EB, van den Berg I, Martini E, Eussen HJ, Fauser BC, Van Opstal D. FISH analysis of 15 chromosomes in human day 4 and 5 preimplantation embryos: the added value of extended aneuploidy detection. *Prenat Diagn* 2007;**27**:55–63.
- Beyer CE, Osianlis T, Boekel K, Osborne E, Rombauts L, Catt J, Kravetski V, Aali BS, Gras L. Preimplantation genetic screening outcomes are associated with culture conditions. *Hum Reprod* 2009; **24**:1212–1220.
- Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, Haentjens P, Van der Elst J, Devroey P. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:848–854.
- Cohen J, Grifo JA. Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the New England Journal of Medicine: an in-depth look at the findings. *Reprod Biomed Online* 2007;**15**:365–366.
- Colls P, Sandalinas M, Pagidas K, Munne S. PGD analysis for aneuploidy in a patient heterozygous for a polymorphism of chromosome 16 (16qh-). *Prenat Diagn* 2004;**24**:741–744.
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munne S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using 'no result rescue'. *Fertil Steril* 2007;**88**:53–61.
- Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, Meuleman C, Frijns JP, Vermeesch JR, D'Hooghe TM. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2009;**93**:364–373.
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, Reisner E, Borg K, Wikland M, Bergh C. 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, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994;**9**:721–724.
- Jansen RP, Bowman MC, de Boer KA, Leigh DA, Lieberman DB, McArthur SJ. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod* 2008;**23**:1476–1478.
- Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod* 2000; **15**:1781–1786.
- Magli MC, Sandalinas M, Escudero T, Morrison L, Ferraretti AP, Gianaroli L, Munne S. Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenat Diagn* 2001; **21**:1080–1085.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;**357**:9–17.
- Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril* 2003;**80**:1162–1168.
- Mercader A, Rubio C, Buendía P, Delgado A, Escrich L, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Improvement of a preimplantation genetic screening program with the co-culture of embryos with a monolayer of endometria epithelial cells. *Hum Reprod* 2009;**24**(Suppl. 1):i209.
- Mersereau JE, Pergament E, Zhang X, Milad MP. Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2008; **90**:1287–1289.
- Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC. A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the 'good prognosis' patient. *Fertil Steril* 2009;**91**:1731–1738.
- Munne S, Dailey T, Finkelstein M, Weier HU. Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1996;**13**:149–156.
- Munne S, Cohen J, Simpson JL. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;**357**:1769–1770; author reply 1770–1771.
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS). Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance. *Reprod Biomed Online* 2008;**16**:134–147.
- Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendía P, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. Rescue of false monosomies in a PGD program using subtelomeric probes. In *12th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy*, Budapest (Hungary), 2004. Final program and abstracts book, **32**.
- Rubio C, Gimenez C, Fernandez E, Vendrell X, Velilla E, Parriego M, Rodrigo L, and Spanish Interest Group in Preimplantation Genetics, Spanish Society for the study of the biology of reproduction. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum Reprod* 2009;**24**:2045–2047.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* 2009; **92**:157–162.
- Simpson JL. Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient. *Hum Reprod* 2008;**23**:2179–2181.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. 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, Devroey P. 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.
- Uher P, Baborova P, Kralickova M, Zech MH, Verlinsky Y, Zech NH. Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a third round of re-hybridization. *Reprod Biomed Online* 2009; **19**:539–546.
- Velilla E, Escudero T, Munne S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2002;**4**:210–217.
- Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marelllo E, Hill D, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003; **80**:467–468.

4.2. Objetivo 2: Determinación de la capacidad de detección de aneuploidías y de la tasa de falsos positivos mediante la técnica de array-CGH en embriones previamente diagnosticados como anormales mediante FISH en día 3 de desarrollo.

4.2.1. Concordancia de las aneuploidías observadas en biopsias embrionarias mediante FISH versus array-CGH.

Para este objetivo se recabaron 38 embriones previamente diagnosticados como aneuploides mediante biopsia de una blastómera en día 3 analizada mediante FISH. La biopsia de otra célula en día 4 de desarrollo embrionario fue satisfactoria en todos ellos. En 37/38 (97,4%) biopsias se obtuvo un producto de WGA adecuado para el análisis mediante array-CGH. Tras el análisis de la biopsia de día-4 mediante array-CGH, en 35/37 casos (94,6%) el resultado fue concordante con el obtenido mediante FISH en la célula en día 3. De estos 35 casos con resultado concordante, en 22 biopsias (62,9%) se detectaron mediante array-CGH exactamente las mismas aneuploidías detectadas mediante FISH; y en las 13 biopsias restantes (37,1%) se encontraron las aneuploidías observadas mediante FISH y aneuploidías para otros cromosomas no incluidos en los 9 analizados mediante FISH.

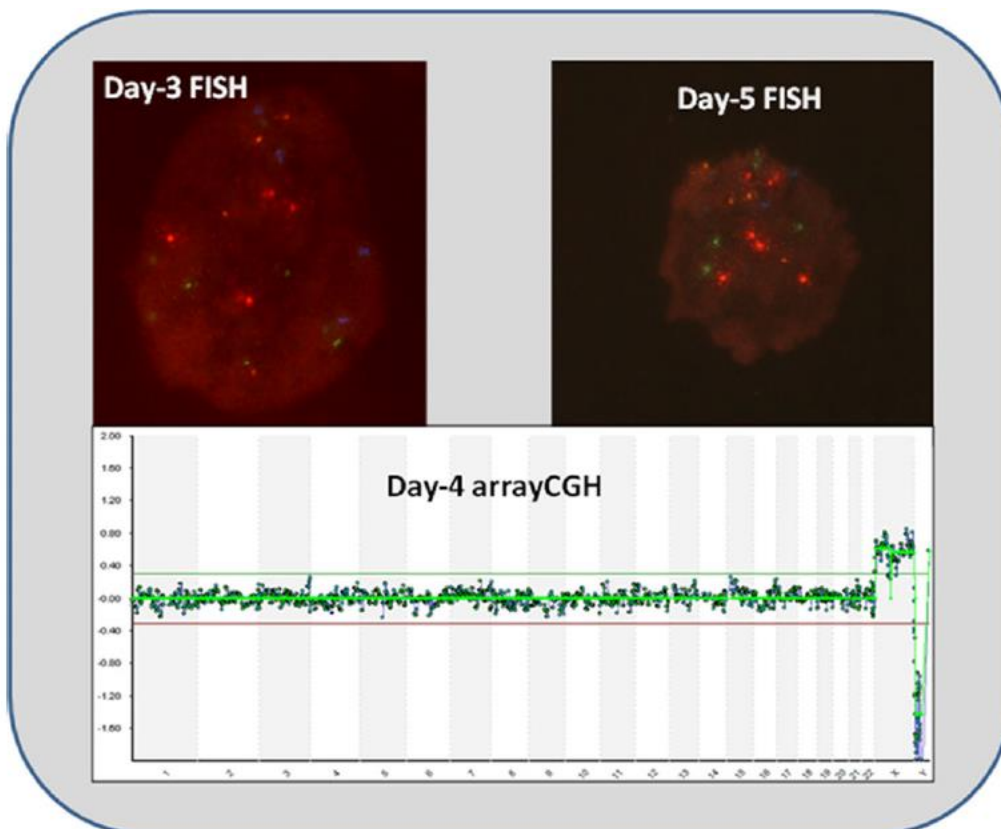


Figura 10. Ejemplo de la comparación de resultados en el mismo embrión de: análisis de FISH en biopsia de día 3, análisis de array-CGH en biopsia de día 4 y reanálisis del embrión completo mediante FISH en día 5. Corresponde a la figura 1 del segundo artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (*Mir P, et al. False positive rate of an array-CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. J Assist Reprod Genet. 2013;30(1):143–9).*

En los 2 embriones restantes (2/37; 5,4%) hubo discordancia entre el resultado de la biopsia de FISH en día 3 y la de array-CGH en día-4 (tabla 6):

- En uno de estos embriones, el reanálisis mediante FISH de las 6 células del embrión en día 5 (embrión de 8 células en día 3 bloqueado), confirmó el diagnóstico previamente obtenido mediante FISH en la biopsia de día 3, 92,XXYY, mientras que array-CGH en día-4 dio un resultado euploide (46, XY) (Figura 10).
- En el otro caso, el reanálisis mediante FISH de las 68 células del embrión en día-5, confirmó el diagnóstico de array-CGH en la biopsia de día-4, 47,XY,+3, mientras que el resultado de FISH en día 3 fue de monosomía 16 y trisomía XXY (46,XXY,-16) (Tabla 6). Según estos resultados, la tasa de error detectada para ambas técnicas en este grupo de embriones fue del 2,7% (1/37).

	Biopsia día 3 FISH	Biopsia día 4 array-CGH	Embrión completo FISH	Concordancia de resultado con reanálisis
Caso 1	tetraploide	46, XY	tetraploide (6 células)	FISH
Caso 2	monosomía 16, trisomía XXY	47,XY,+3	47,XY,+3 (68 células)	array-CGH

Tabla 6. Comparación de resultados de los 2 embriones reanalizados mediante FISH por presentar resultado discordante entre la biopsia analizada por FISH y la analizada por array-CGH. Modificado a partir de la tabla 1 del segundo artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. False positive rate of an array-CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(1):143–9).

Analizando la capacidad de detección de aneuploidías por cromosoma de la técnica de array-CGH, en estos 37 embriones, las 106 aneuploidías detectadas mediante array-CGH fueron todas ellas confirmadas en el resto de células del blastocisto. De estas 106 aneuploidías, 49 (46,2%) fueron para cromosomas no incluidos en el panel de 9 cromosomas analizados mediante FISH en este estudio. Respecto al tipo de anomalía detectada, 67/106 (63.2%) fueron monosomías y 38/106 (35.8%) trisomías. En cambio, array-CGH no detectó la tetraploidía que sí fue detectada mediante FISH en día 3.

4.2.2. Comparación de la tasa de falsos positivos de la técnica de FISH versus la técnica de array-CGH.

Para la consecución de este objetivo, se reanalizaron 42 embriones previamente analizados mediante array-CGH en biopsia de una blastómera en día 3. En todos ellos, se reanalizó el embrión completo mediante FISH en día 5, y en los 42 embriones reanalizados se obtuvieron señales de FISH interpretables. De ellos, en 41 casos (41/42; 97,6%), el diagnóstico obtenido en el reanálisis fue concordante con el obtenido previamente en la correspondiente biopsia de día 3. El único embrión con resultado discordante, había sido diagnosticado en la biopsia de día 3 como anormal con trisomía para el cromosoma 15 (47,XX,+15), mientras que el reanálisis del blastocisto completo dio un resultado de embrión mayoritariamente euploide. En concreto, en las

25 células analizadas: 22 células fueron euploide (46,XX); dos células tetraploides (92,XXXX); y una célula fue 48,XX,+13,+21. A pesar de que el embrión presentó alguna célula anormal, la aneuploidía detectada en la biopsia no estaba presente en estas células del embrión en día 5, por lo que este resultado fue considerado un falso positivo de la técnica de array-CGH.

De los 41 casos en los que el resultado del reanálisis del embrión mediante FISH fue concordante con el resultado previamente obtenido en la biopsia en día 3 mediante array-CGH, en 28 de ellos (66,7%; 28/41) el resultado en todas las células del embrión fue exactamente el mismo y, en los restantes 12/42 (28,6%) embriones el diagnóstico final también se confirmó, pero fueron catalogados como embriones mosaicos. De estos 12 embriones mosaico, 8 (8/42; 19,1%) fueron mosaicos aneuploides y 4 (4/42; 9,5%) mosaicos euploide-aneuploides.

Posteriormente, los resultados obtenidos en estos 12 embriones mosaico fueron clasificados según las aneuploidías detectadas: en 7 de ellos (7/42; 16,7%) se encontró al menos una de las aneuploidías presentes en la biopsia en día 3, pero no todas (grupo A), en 5/42 (11,9%) las aneuploidías presentes eran complementarias a las encontradas en la biopsia día 3 (grupo B), y en el embrión restante (1/42; 2,4%) se encontraron las mismas aneuploidías que en la biopsia día 3 y una aneuploidía adicional (grupo C).

En este objetivo, la tasa de falsos positivos para array-CGH en biopsia de día 3 fue de 2,4% (1/42), tasa comparable a la obtenida con FISH para el mismo tipo de biopsia en el objetivo 2 de la presente tesis doctoral (2,7%; 1/37) y, a pesar de que en el estudio incluido en el objetivo 1 esta misma tasa fue superior (5%; 4/80), las diferencias no fueron estadísticamente significativa entre ninguna de ellas (Tabla 7).

	Biopsia día 3 array-CGH (Mir et al., 2013)	Biopsia día 3 FISH (Mir et al., 2010)*	Biopsia día 3 FISH (Mir et al., 2013)
Embriones reanalizados	42	80	37
Falsos positivos	1 (2,4%)	4 (5%)	1 (2,7%)

Tabla 7. Comparativa de la tasa de falsos positivos obtenidos en biopsias de día 3 mediante FISH para 9 cromosomas versus array-CGH. En todos los casos, las células restantes de los embriones en día 5 fueron extendidas y reanalizadas mediante FISH para los cromosomas relacionados con las aneuploidías presentes (*Únicamente se incluyen los embriones cuyo diagnóstico en día 3 se realizó mediante FISH para 9 cromosomas incluyendo rondas adicionales de hibridación en los casos expuestos en el objetivo primero de la presente tesis doctoral).

PUBLICACIÓN CORRESPONDIENTE AL OBJETIVO 2

**False positive rate of an array-CGH platform for
single-cell preimplantation genetic screening and
subsequent clinical application on day-3**

J Assist Reprod Genet. 2013;30(1):143–9.

Pere Mir Pardo, Lorena Rodrigo, Amparo Mercader, Pilar Buendía, Emilia Mateu, Miguel Milán-Sánchez, Vanessa Peinado, Antonio Pellicer, Jose Remohí, Carlos Simón y Carmen Rubio.

False positive rate of an arrayCGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3

Pere Mir · Lorena Rodrigo · Amparo Mercader · Pilar Buendía · Emilia Mateu · Miguel Milán-Sánchez · Vanessa Peinado · Antonio Pellicer · Jose Remohí · Carlos Simón · Carmen Rubio

Received: 15 October 2012 / Accepted: 12 December 2012 / Published online: 20 December 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract In this work, false positive rate of an arrayCGH platform for its use in day-3 single-blastomere analysis was calculated. For this purpose, 38 embryos diagnosed as abnormal on day-3 by FISH were re-biopsied on day-4. Single-cell day-4 arrayCGH diagnosis was then performed. A successful amplification was obtained in 97.4 % (37/38) of the day-4 cells analysed by arrayCGH. Day-3 FISH and day-4 arrayCGH diagnosis were concordant in 35/37 cases. The two discordant embryos were spread and all the cells from each embryo were re-analysed by FISH on day 5. The same error rate (2.7 %) for day-3 FISH and day-4 arrayCGH was obtained when comparing day-5 FISH re-analysis. After this pre-clinical phase, the platform was used for day-3 arrayCGH clinical application in 320 patients (1,760 embryos). Day-3

amplification rate was 98.6 %. An optimal reproductive outcome was obtained when applying arrayCGH to a clinical program: clinical pregnancy rate per cycle of 38.4 % and 60.3 % per transference were obtained, with an implantation rate of 53.5 %. Overall miscarriage rate was 10.6 %. Additionally, day-5 FISH re-analysis was performed in 42 of the embryos from the clinical phase, obtaining a concordance rate of 97.6 % with day-3 arrayCGH.

Keywords arrayCGH · Blastomere biopsy · Day-3 PGS · Day-5 FISH re-analysis

Introduction

Preimplantation Genetic Aneuploidy Screening (PGS) is offered in many IVF centres to improve the reproductive outcome of specific groups of patients. In particular, PGS programs have widely employed fluorescence in situ hybridisation (FISH) for screening numerical chromosome anomalies in preimplantation embryos. Using this technique on single day-3 blastomeres has led to reported improvements in implantation and pregnancy rates in retrospective studies of cases of advanced maternal age (AMA), severe male factor (SMF) infertility, and recurrent miscarriage (RM); the benefit of this analysis in couples with repetitive implantation failure (RIF) has been more controversial [14]. Interestingly, a meta-analysis of the randomized control trials (RCT) conducted in PGS indicated that FISH screening does not improve live birth rates in IVF patients and, indeed, lowers live birth rates in AMA patients [11]. However, the results reported in these RCTs were attributed to several methodological flaws [2, 16, 20, 22] and, more recently, to the poor predictive value of day-3 FISH [18].

Capsule False positive rate of an arrayCGH platform was calculated for single-blastomere analysis, resulting in high efficiency and accuracy of the platform. Furthermore, an optimal reproductive outcome was obtained when applied to a clinical program.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10815-012-9918-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Mir · L. Rodrigo · E. Mateu · M. Milán-Sánchez · V. Peinado · C. Simón · C. Rubio
IVIOMICS, Paterna, Valencia, Spain

A. Mercader · P. Buendía · A. Pellicer · J. Remohí · C. Simón · C. Rubio
Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI-Valencia),
Institute of Health Research INCLIVA,
Universitat de Valencia, Valencia, Spain

P. Mir (✉)
IVIOMICS, Parc Científic Universitat de Valencia
C/ Catedrático Agustín Escardino, 9,
46980, Paterna (Valencia), Spain
e-mail: pere.mir@iviomics.com

Another complication of PGS is the time of biopsy. The most common option has been day-3 embryo biopsy, but this approach has been criticized arguing a reduction in embryo viability due to the biopsy; in fact, a defective biopsy could damage the embryo [22]. Further, embryo mosaicism at cleavage stage and self-correction of aneuploidies between cleavage stage and blastocyst stage have been noted [6]. Recent studies, however, suggest that both phenomena may be overestimated by day-3 FISH analysis [23, 29]. To avoid any kind of misdiagnosis due to embryo mosaicism, polar bodies biopsies have been used [27], but in those cases, only maternal genetic information is obtained, thus all the paternal contribution as well as the mitotic errors are missed. The third option is to biopsy trophoctoderm cells from blastocysts, considered less invasive and with a high concordance between inner cell mass and trophoctoderm cells [1, 18].

Previous RCTs have been limited by the technique available for chromosomal analysis. Using a sequential FISH protocol, only a selected panel of chromosomes, usually between 9 and 12, could be analyzed simultaneously. Additionally, the technique required cell fixation on a microscope slide. Poor spreading could result in low-quality nuclei or even loss of chromatin with impairment on the accuracy of the diagnosis [17, 26]. Indeed, misdiagnosis can also result from overlapping signals, split signals, cross-hybridisation, or polymorphisms [5]. However, some of these limitations might be overcome by using different strategies. For example, to improve FISH accuracy, additional probes could be incorporated to double-check for dubious signals and false monosomies for certain chromosomes [3, 5, 10, 15, 19, 25]. Indeed, higher diagnosis accuracy was obtained when performing these additional hybridisation rounds comparing with embryos in which no re-hybridisation rounds were used (95 % vs. 82.7 %; $p=0.0443$) [15]. Despite this improvement, the limitation on the number of tested chromosomes remained.

Recently, several approaches toward 24-chromosome analysis have been developed to improve clinical results by incorporating comprehensive chromosomal screening. These approaches require whole-genome amplification (WGA) to generate enough DNA for analysis. The first of these approaches applied to PGS was comparative genomic hybridisation (CGH) [28], in which the genome of interest is hybridized against a reference genome in a slide containing a spreading of euploid human metaphases. More recently, arrayCGH has emerged, providing higher resolution and more rapid and automated diagnosis. This approach uses microarray slides containing DNA spots representative of the human genome. Two types of array platforms have been described in PGS: arrayCGH and SNParray. In arrayCGH platforms the spots can be clones of bacterial artificial chromosomes (BAC-arrayCGH) or synthetic oligonucleotides (oligo-arrayCGH).

In SNParray platforms, spots include SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) from all the genome and add to the 24-chromosome analysis the possibility of haplotyping the sample [8]. These advances based on array platforms, offer the opportunity to increase the reliability and standardisation of diagnosis for PGS, but the approaches need to be optimized for clinical use.

In this study, we sought to evaluate the potential of a single-cell adapted BAC-based arrayCGH platform for the detection of aneuploidies in cleavage stage embryos. A single blastomere from embryos previously diagnosed as abnormal by day-3 FISH in our routine PGS program was analysed by arrayCGH on day 4. Both diagnoses were then compared and, in cases of discordant results, the remaining cells of the embryo were fixed on day 5 and re-analysed by FISH. After this pre-clinical study, the same platform was applied to an initial set of patients who underwent day-3 arrayCGH diagnosis. Clinical results of these PGS cycles are presented.

Materials and methods

This prospective study was performed from October 2009 to March 2012. The pre-clinical phase of the study was performed from October 2009 to February 2010; subsequently, arrayCGH was applied clinically.

Clinical protocol for PGS cycles by FISH

In our routine PGS program, all patients with a specific clinical indication for PGS signed a specific informed consent before undergoing PGS. Standardized ovarian stimulation protocols were used and intracytoplasmic sperm injection was performed in all cases. Fertilization was assessed 17–20 h after microinjection, and embryo cleavage was recorded every 24 h. Embryos were grown in IVF/CCM medium (1/1) (Vitrolife, Göteborg, Sweden) until day 3, when embryo biopsy was performed. Subsequently, embryos were cultured in CCM medium with a monolayer of endometrial epithelial cells until day 5 [12].

For biopsy, embryos were placed on a droplet containing a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium (G-PGD, Vitrolife, Göteborg, Sweden), and the zona pellucida was perforated using acid Tyrode's solution or laser technology (OCTAX, Herbronn, Germany). A single blastomere was removed in embryos with ≥ 5 nucleated blastomeres and ≤ 25 % of fragmentation degree. Individual blastomeres were fixed on glass slides under an inverted microscope, using a slightly modified Tarkowski's protocol with methanol-acetic acid (3:1) solution. FISH diagnosis included the analysis of nine chromosomes in two consecutive rounds of hybridisation: in the first round chromosomes 13, 16, 18, 21, and 22 were analysed using MultiVysionTM PB panel; in the second round chromosomes

15, 17, X, and Y were analysed using MultiVysion™ 4 Colour Custom panel (Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA). Additionally, re-hybridisation rounds using additional probes were conducted to rescue non-informative or monosomic results as previously described [15]. Chromosomally normal embryos were transferred on day 5, and the surplus euploid embryos cryopreserved.

Pre-clinical phase

In the pre-clinical phase, 38 embryos diagnosed on day 3 as chromosomally abnormal by FISH were re-biopsied on day 4. A second cell from each one of these embryos was biopsied and analysed by arrayCGH on day 4. It was known prior to arrayCGH analysis that the sample came from an embryo known to have been given an aneuploid diagnosis by FISH. Then, comparison of both diagnoses was then performed. In cases of discordant results, day-5 re-analysis of the remaining cells of the embryo was performed by FISH using probes for the discordant chromosomes (Fig. 1).

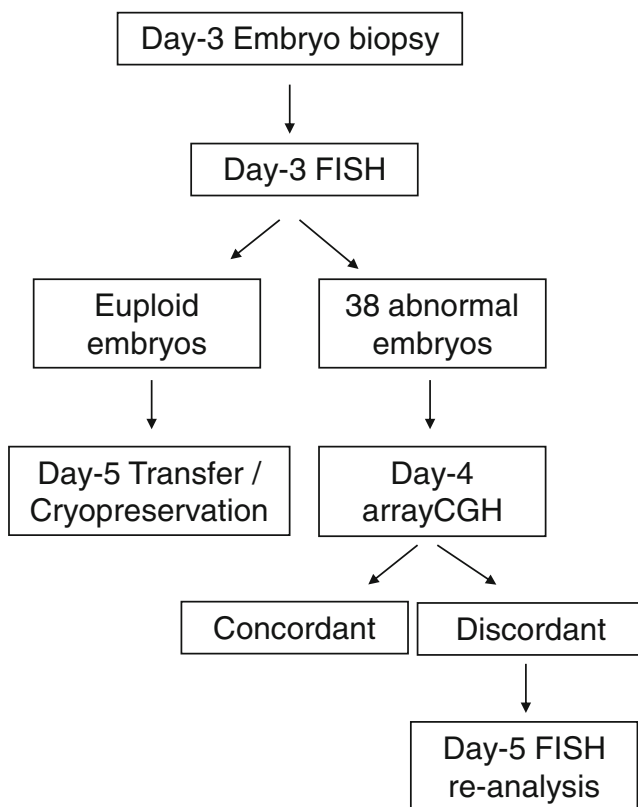


Fig. 1 Workflow of the validation phase. After performing our routine day-3 FISH program, a second cell was biopsied on day 4 in 38 embryos diagnosed as chromosomally abnormal. Single-cell arrayCGH diagnosis was performed in those samples. Day-3 FISH and day-4 arrayCGH diagnoses were compared, and, in cases of discordant results, the whole day-5 embryo was fixed to be re-analysed by FISH using probes directed to the discordant chromosomes

To perform *day-4 arrayCGH analysis*, a single cell from each embryo was amplified using Sureplex™ DNA amplification system (BlueGnome, Cambridge, UK). Amplification quality was ensured by gel electrophoresis (Lonza, Rockland, USA). Then, sample and control DNA were labelled with Cy3 and Cy5 fluorophores, respectively. Labelling mixes were combined and hybridised on a 24sure array (BlueGnome, Cambridge, UK) for 6 to 12 h. Final results were obtained on early day 5 using a laser scanner (710 Innoscan, Innopsys, Carbonne, France; and Powerscanner, TECAN, Männedorf, Switzerland). BlueFuse software was used to analyse data (BlueGnome, Cambridge, UK). Analysis by arrayCGH was completed in a 24-h protocol.

In cases of discordant results between day-3 FISH and day-4 arrayCGH, the remaining cells of the day-5 embryo were fixed and re-analysed by FISH using probes directed to the discordant chromosomes. Due to the limited number of chromosomes that can be analysed simultaneously, day-5 FISH diagnoses were performed with knowledge of the chromosomes involved in the aneuploidies previously seen on day-3 and day-4, but without knowing what aneuploidies for these chromosomes were. Day-5 embryos were fixed using a slightly modified fixation method described in [9]. After removing zona pellucida with Tyrode's acid, day-5 embryos were placed in a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free medium (G-PGD, Vitrolife, Göteborg, Sweden). Then, the whole embryo was fixed using a spreading solution with 0.010 N HCl and Tween 20; when cytoplasm was dissolved, nuclei were re-fixed with methanol-acetic acid.

Clinical application of arrayCGH

After the pre-clinical evaluation of the platform, patients coming to our PGS program were offered the possibility of undergoing day-3 PGS by arrayCGH instead of by FISH. A total of 320 patients decided to undergo PGS by day-3 arrayCGH in these two-year clinical experience (March 2010–March 2012). The number of patients for each PGS indication was: 106 for AMA, 96 for RM, 62 for RIF, 28 for severe male factor (SMF), and 28 patients with a previous chromosomally abnormal gestation as a principal indication for PGS. RM indication included patients with at least 2 miscarriages, RIF patients with three or more previous IVF attempts failed, and SMF patients with seminal parameters severely affected. PGS was indicated for AMA, in patients over 38 years old until May 2010. After that, the AMA group was re-defined as patients over 40 years old due to a retrospective analysis of the results from our lab [13]. Also mixed indications were found in 47 of those 320 couples, in which AMA was the secondary indication for 22 RM couples, 14 RIF couples and 7 couples with a previous chromosomally abnormal gestation.

On day 3, a single blastomere was biopsied in the 1,760 embryos, and single-cell arrayCGH was performed using

the same 24-h protocol used in the validation phase. ArrayCGH protocol started in the following morning, and results were obtained on early day-5. Chromosomally normal embryos were transferred on day 5 of the corresponding cycle and the surplus chromosomally normal embryos were cryopreserved.

Re-analysis of the results of the clinical application phase

No special criteria in the selection of day-5 embryos for re-analysis were followed. The only limitation to include abnormal embryos in this study was their availability in the corresponding IVF units. We requested aneuploid embryos independently of the affected chromosome, since we dispose FISH-probes for all the chromosomes. After all, 42 embryos diagnosed as chromosomally abnormal by arrayCGH in the clinical phase were spread and fixed to be re-analysed by FISH on day 5, using probes directed to the abnormal chromosomes. In these embryos, the same fixation protocol described in the validation phase was applied (Figs. 2 and 3).

Results

In the pre-clinical phase, a second cell was biopsied on day 4 from 38 embryos diagnosed as abnormal by FISH on day 3. A successful single-blastomere amplification was obtained in 37/38 cells (97.4 %). Each of the 37 products of amplification produced an interpretable arrayCGH result. In 35/37 of those blastomeres (94.6 %), day-4 arrayCGH confirmed day-3 FISH diagnosis: In 62.9 % of them (22/35), arrayCGH showed only the same aneuploidies observed by FISH; while in the remaining 37.1 % (13/35), additional aneuploidies were observed by arrayCGH for chromosomes

not tested by FISH. The two remaining embryos (5.4 %) exhibited discordant FISH and arrayCGH results; these embryos were re-analysed by FISH on day 5 (Table 1). One of them was diagnosed as tetraploid by FISH on day 3, but as 46, XY by arrayCGH. This embryo was arrested on day 5, and the 6 cells of the embryo were determined to be tetraploid by day-5 FISH. Thus, day-3 FISH diagnosis was confirmed in this embryo. The second discordant embryo showed monosomy 16 and trisomy XXY by day-3 FISH, but was diagnosed as 47,XY+3 by arrayCGH. The whole blastocyst was fixed on day 5, and 68 cells were analysed by FISH for chromosomes 3, 16, X, and Y. In this case, the day-4 arrayCGH result was confirmed in the whole blastocyst.

Regarding the type of abnormalities observed in those 37 embryos, the most common ones were chromosome loss ($n=67$), followed by chromosome gain ($n=38$). Of those 106 aneuploidies, 49 (46.2 %) were for chromosomes not analysed by FISH.

In the clinical phase of the study, a successful amplification was obtained in 1,736 out of 1,760 blastomeres (98.6 %). A total of 1,289 embryos were diagnosed as abnormal (74.2 %) by arrayCGH. Of those abnormal embryos, 262 (20.3 %) were diagnosed as chaotic, showing a complex pattern of aneuploidies. Excluding chaotic embryos, 31.6 % (325/1027) of the remaining abnormal embryos exhibited aneuploidies only for the 9 chromosomes analysed in our FISH program; 40.4 % (415/1027) had aneuploidies for the typically-assessed chromosomes as well as for other chromosomes; and 28 % (287/1027) of them had aneuploidies only for chromosomes different from the 9 analysed in our FISH program.

Day-5 FISH re-analysis of the abnormal embryos from the clinical phase of the study showed 97.6 % (41/42) concordance with day-3 arrayCGH diagnosis. The discordant embryo was diagnosed as 47,XX,+15 by arrayCGH on day 3, but FISH analysis of the whole embryo on day 5 detected the following abnormalities: 2n,XX in 22 cells; 4n,XXXX in 2 cells; and 48,XX,+13,+21 in one cell.

Concerning the reproductive outcome of the 230 day-3 arrayCGH cycles, chromosomally normal embryos were available for transfer in 204 cycles (63.7 %). A clinical pregnancy was observed in 123 patients (38.4 % per cycle; 60.3 % per transference), with an implantation rate of 53.5 % (161 sacs/301 transferred embryos). Thirteen miscarriages were observed (10.6 %); consequently, successful rates of ongoing pregnancy (33.1 % per cycle; 52 % per transference) and of ongoing implantation rate (47.8 %) were obtained. These results are described in Table 2 according to maternal age. Only in three of these miscarriages an hysteroembryoscopy could be performed, and all of them were chromosomally normal (one case was a gemellar gestation with 46,XY karyotype, while the other two miscarriages were 46,XX).

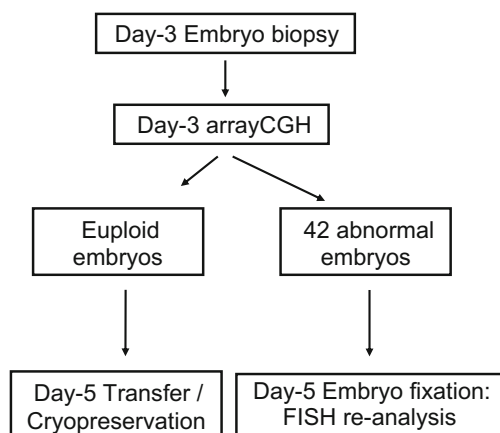


Fig. 2 Workflow of the clinical phase. Day-3 arrayCGH diagnosis was performed on single blastomeres. Euploid embryos were transferred or cryopreserved on day 5. To determine accuracy, 42 embryos diagnosed as chromosomally abnormal on day 3 were re-analysed by day-5 FISH using probes directed to the altered chromosomes

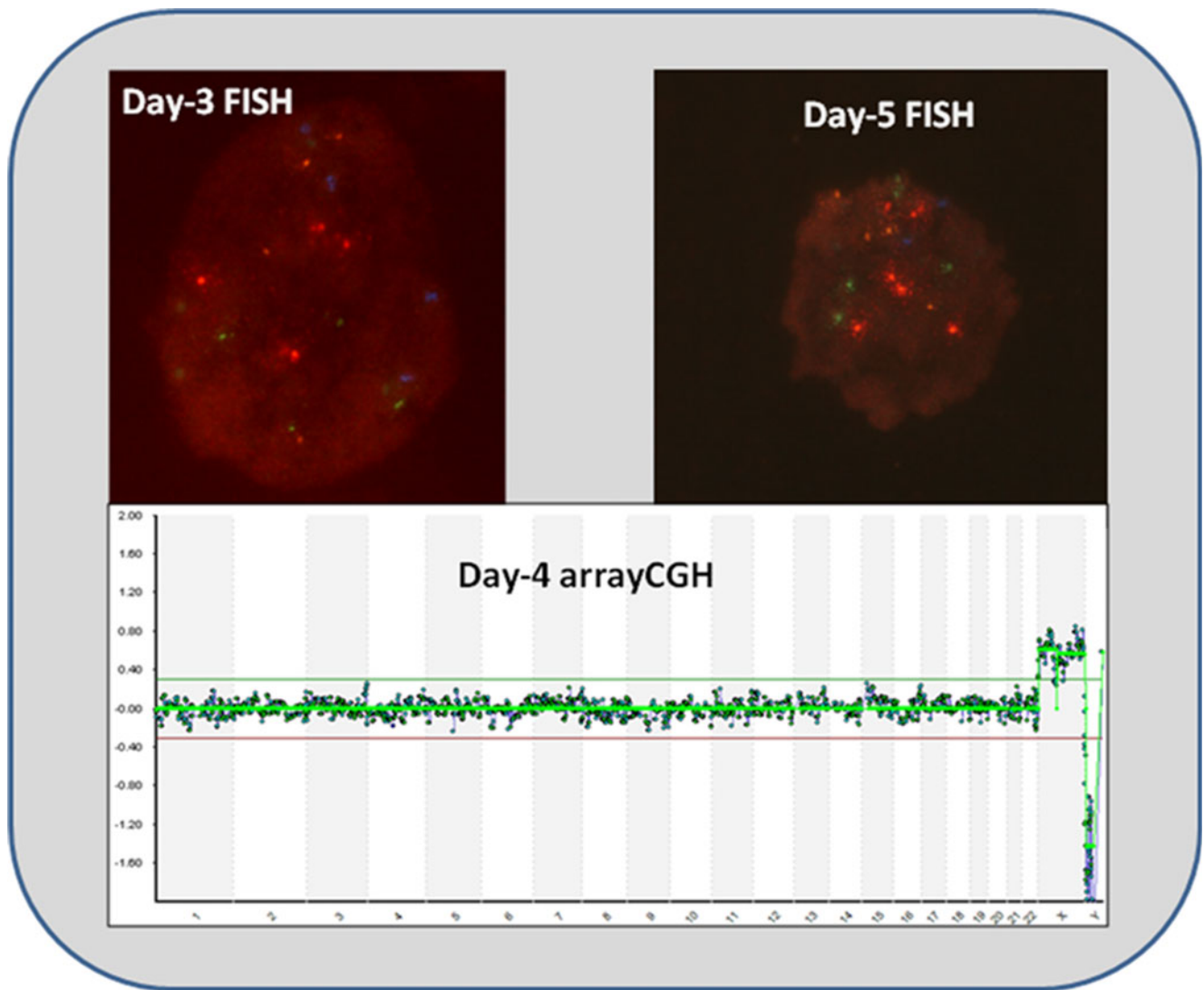


Fig. 3 Images of one of the two discordant cases of the validation phase. Day-3 FISH show 4 signals for each chromosome: *red* colour for chromosome 13, *Aqua* for 16, *Blue* for 18, *Green* for 21 and *Gold* for 22 (Multi-Vysion™ PB panel, Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA), meaning it was

a tetraploid cell. However, day-4 arrayCGH show a euploid pattern, and finally day-5 FISH using the same probes used on day 3 corroborate FISH diagnosis at cleavage stage. It is worth mentioned that as it was an arrested embryo on day-5, only 6 cells could be re-analysed

Table 1 Comparison of discordant results obtained between day-3 FISH and day-4 arrayCGH diagnosis. In one case, day-3 FISH diagnosis was confirmed by day-5 FISH re-analysis; in the other, day-4 arrayCGH diagnosis was confirmed

Day-3 FISH	Day-4 arrayCGH	Day-5 FISH re-analysis
tetraploid	46,XY	tetraploid (6 cells) ^a
monosomy 16, trisomy XXY	47,XY+3	47,XY+3 (68 cells) ^a

^a Only chromosomes involved in the aneuploidies previously observed were tested for Day-5 FISH re-analysis

Table 2 Clinical results of day-3 PGS by arrayCGH, divided into two age groups: patients up to 40 years old and patients over 40

	≤40 years	>40 years	Total
No. of cycles	232	88	320
Mean age (SD)	36.3 (3.0)	42.0 (1.1)	37.9 (3.7)
% Embryo transfers	73.3	38.6	63.7
% Abnormal embryos	68.3	88.1	73.6
Pregnancy rate/transfer	58.2	67.6	59.8
Pregnancy rate/cycle	42.7	26.1	37.5
Implantation rate	51.3	63.0	53.5
Miscarriage rate	12.1	3.4	10.6

Discussion

This study is focused on the evaluation of a BAC-based array CGH platform for aneuploidy detection in cleavage stage embryos and in the subsequent clinical application of this platform. In the pre-clinical phase of the study, the platform was able to detect those aneuploidies found by FISH on day 3. Moreover, arrayCGH detected additional aneuploidies for chromosomes not analysed by FISH, and the error rate for both techniques was the same (2.7 %). This error rate is in accordance with other validation studies performed using array platforms for PGS [4, 7, 24].

Two discordant results between day-3 FISH and day-4 arrayCGH were observed in the pre-clinical phase. Day-5 FISH re-analyses of the whole embryo indicated that: one case could have been a day-3 FISH misdiagnosis, because all cells on day 5 exhibited the chromosomal abnormality detected by day-4 arrayCGH instead of the one detected by day-3 FISH; while the second case could be explained as a day-4 arrayCGH misdiagnosis, likely due to the inability of the arrayCGH technique to detect full tetraploidies [7].

Later on, in the clinical application period, one discordant result was observed between day-3 arrayCGH and day-5 FISH re-analysis of the remaining cells of the embryo. Day-3 arrayCGH result was 47, XX, +15, but 22 out of the 25 cells analysed by day-5 FISH were chromosomally normal and the remaining three cells were abnormal: two tetraploid cells and one aneuploid cell (48,XX,+13,+21). This discordance might result from two main scenarios: (1) a technical artefact, or (2) a misdiagnosis due to embryo mosaicism at the cleavage stage if mosaicism was originated on day-2 and/or day-3 cell divisions and one of the abnormal cells was biopsied.

Therefore, both FISH and arrayCGH techniques have limitations. In the case of FISH, the major limitation stems from the limited number of chromosomes that can be analysed simultaneously; additionally, the technical difficulty of nuclear fixation can impede diagnosis in some cases. In arrayCGH, the ability to amplify enough DNA from one cell had been a major limitation. Improved amplification protocols, however, have led to amplification rates around 98–99 %. Nonetheless, arrayCGH remains unable to detect all tetraploid embryos. Some tetraploidies will be detected (e.g., if they carry an imbalance of sex chromosomes), and software devices are continuously being implemented to improve the accuracy of tetraploidy detection. In our pre-clinical study, the error rate due to this limitation was 2.7 %, but the number of samples analysed was very low. Further, some types of polyploid embryos are more prone to arrest during preimplantation development [21], and therefore would not have been selected for transfer. In fact, the tetraploid embryo diagnosed as euploid by day-4 arrayCGH in our study was arrested. Taking into account all these aspects,

the estimated misdiagnosis rate due to non-detection of a polyploidy is below 0.2 % [7].

Day-3 arrayCGH results of the clinical application phase showed aneuploidies involving all chromosomes. Importantly, 28.0 % of the embryos analysed would have been diagnosed as normal by FISH using our 9-chromosome panel (chromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, and Y). The number of abnormal embryos detected by arrayCGH was 74.3 %, and 63.7 % of the cycles had euploid embryos for transference. Moreover the higher pregnancy rate per transfer was achieved in patients over 40 years old, probably reflecting that in older patients the main problem to obtain a healthy baby at home is their higher risk of producing aneuploid embryos.

In conclusion, this study shows a BAC-based arrayCGH platform that offers a rapid and standardised method for the screening of all chromosomes in PGS. Although the false negative rate could not be detected with this study design, the false positive rate was 2.4 %. Moreover, good clinical results were obtained, confirming the usefulness of this platform for single-cell analysis in routine clinical diagnosis. Despite the limitations of single-cell FISH technology, it has been shown in this work that the re-analysis of day-5 embryos by FISH can be used to corroborate if the anomalies observed at cleavage stage were still present on day-5 embryos.

Acknowledgments The authors would like to thank all the embryologists in charge of the embryo biopsy, the biologists working in PGS analysis (both for FISH and arrayCGH diagnosis) and also to all clinicians involved in our PGS program.

References

1. Capalbo A, Wright G, Themaat L, Elliott T, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts reveals high accuracy of diagnosis and no sign of mosaicism or preferential allocation. *Fertil Steril*. 2012;96(No. 3). Supplement, September 2011.
2. Cohen J, Grifo JA. Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the *New England Journal of Medicine*: an in-depth look at the findings. *Reprod BioMed Online*. 2007;15(4):365–6.
3. Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munne S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using “no result rescue”. *Fertil Steril*. 2007;88(1):53–61.
4. Colls P, Escudero T, Fischer J, Cekleniak NA, Ben-Ozer S, Meyer B, et al. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reprod BioMed Online*. 2012;24(6):621–9.
5. Colls P, Sandalinas M, Pagidas K, Munne S. PGD analysis for aneuploidy in a patient heterozygous for a polymorphism of chromosome 16 (16qh-). *Prenat Diagn*. 2004;24(9):741–4.
6. Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Ben-Yosef D. Elucidating the origin of chromosomal aberrations in IVF embryos by preimplantation genetic analysis. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;282(1–2):112–9.
7. 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*. 2011;95(3):953–8.
8. 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*. 2010;47(10):651–8.
 9. Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM, et al. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod (Oxf Engl)*. 1994;9(no. 4):721–4.
 10. Magli MC, Sandalinas M, Escudero T, Morrison L, Ferraretti AP, Gianaroli L, et al. Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenat Diagn*. 2001;21(12):1080–5.
 11. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Updat*. 2011;17(4):454–66.
 12. Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2003;80(5):1162–8.
 13. Milán M, Cobo AC, Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendía P, et al. Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod BioMed Online*. 2010;21(5):649–57.
 14. Mir P, Martín J, Rubio C. Preimplantation diagnosis for aneuploidy screening: a new era beyond FISH. In: Weingarten CN, Jefferson SE, editors. *Sex chromosomes: Genetics, abnormalities, and disorders*. New York, NY: Nova Science Publishers, Inc., 2009. pp. 95–122.
 15. Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milan M, Mercader A, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod (Oxf Engl)*. 2010;25(no. 7):1812–7.
 16. Munne S, Cohen J, Simpson JL. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007;357(no. 17):1769–70. author reply 1770–1.
 17. Munne S, Dailey T, Finkelstein M, Weier HU. Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet*. 1996;13(2):149–56.
 18. Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott Jr RT. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(8):590–600.
 19. Rodrigo L, Rubio C, Mateu E, Simon C, Remohi J, Pellicer A, et al. Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod (Oxf Engl)*. 2004;19(no. 1):123.
 20. Rubio C, Gimenez C, Fernandez E, Vendrell X, Velilla E, Parriego M, et al. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum Reprod (Oxf Engl)*. 2009;24(no. 8):2045–7.
 21. Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn*. 2007;27(no. 8):748–56.
 22. Simpson JL. Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient. *Hum Reprod (Oxf Engl)*. 2008;23:2179–81.
 23. Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott Jr RT. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(8):583–9.
 24. Treff NR, Su J, Tao X, Levy B, Scott Jr RT. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2017–21.
 25. Uher P, Baborova P, Kralickova M, Zech MH, Verlinsky Y, Zech NH. Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a third round of re-hybridization. *Reprod BioMed Online*. 2009;19(4):539–46.
 26. Velilla E, Escudero T, Munne S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod BioMed Online*. 2002;4(3):210–7.
 27. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod (Oxf Engl)*. 1990;5(no. 7):826–9.
 28. 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):1055–62.
 29. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod (Oxf Engl)*. 2009;24(no. 5):1221–8.

4.3. Objetivo 3: Comparación de la tasa de falsos positivos con array-CGH en biopsias de día 3 versus biopsias de trofoectodermo.

4.3.1. Análisis de los resultados considerando el diagnóstico por embrión.

Se incluyeron 109 embriones previamente diagnosticados como aneuploides mediante array-CGH en el programa de DGP-A, 50 de ellos tras biopsia día 3 (n=50) y 59 tras biopsia de trofoectodermo.

- **Embriones con biopsia en día 3:** el reanálisis del blastocisto completo mediante array-CGH confirmó el diagnóstico en 49/50 casos (98%), y únicamente en un embrión (1/50; 2%) el diagnóstico encontrado en la biopsia no fue confirmado en el blastocisto completo. De estos 49 embriones con diagnóstico confirmado, el diagnóstico de array-CGH en el blastocisto completo fue exactamente el mismo que en la biopsia de día 3 en 37/50 (74%) y, en los restantes 12/50 (24%), el diagnóstico final fue también aneuploide pero fueron catalogados como embriones “mosaico aneuploide”. De estos 12 embriones “mosaico aneuploide”, en 6 de ellos (6/50; 12%) se encontró al menos una de las aneuploidías presentes en la biopsia, pero no todas (grupo A), en 4/50 (8%) las aneuploidías presentes eran complementarias a las encontradas en la biopsia (grupo B), y en 2/50 (4%) se encontraron las mismas aneuploidías que en la biopsia más alguna aneuploidía adicional (grupo C).

En el único caso de no concordancia (1/50; 2%), la biopsia de blastómera analizada mediante array-CGH dio un resultado claro de monosomía 18 (45,XY,-18), mientras que en el reanálisis del embrión completo se obtuvo un resultado euploide según el software de análisis. A pesar de ello, el patrón ofrecido por el software de análisis fue compatible con un embrión mosaico 46,XY/45,XY,-18 (Figura 11).

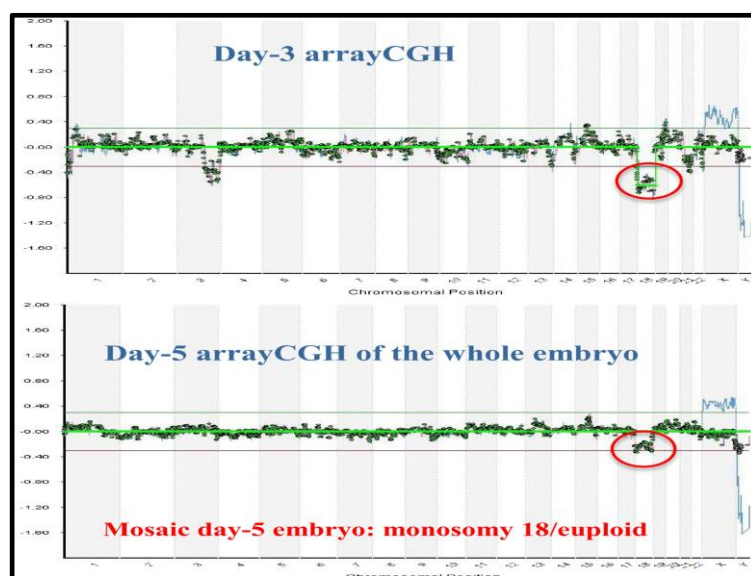


Figura 11. Ejemplo de embrión analizado mediante array-CGH en día 3 resultado fue no concordante con en el reanálisis del embrión completo en día 5 mediante array-CGH. Esta figura corresponde a la figura 1 del tercer artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening. *J Assist Reprod Genet.* 2016, 33:59–66).

- Embriones con biopsia de trofoectodermo: el reanálisis del embrión completo mediante array-CGH, confirmó el diagnóstico en 57/59 casos (96.6%). De estos 57 embriones con diagnóstico confirmado, el diagnóstico de array-CGH en el blastocisto completo fue exactamente el mismo que en la biopsia de trofoectodermo en 48/59 (81,4%) y en los restantes 9/59 (15,2%), el diagnóstico final fue también aneuploide pero fueron catalogados como embriones “mosaico aneuploide”. De estos 9 embriones “mosaico aneuploide”, en 7 de ellos 7/59 (11,9%), se encontró al menos una de las aneuploidías presentes en la biopsia, pero no todas (grupo A).

En los dos embriones restantes (2/59; 3,4%), las aneuploidías presentes eran complementarias a las encontradas en la biopsia de trofoectodermo (grupo B). En este grupo, no hubo ningún blastocisto completo que presentara alguna aneuploidía adicional a la observadas en la biopsia de trofoectodermo (grupo C).

Los dos embriones cuyo resultado de la biopsia no fue confirmado en el embrión (2/59; 3,4%) fueron diagnosticados como euploides. En la figura 12, se muestra el ejemplo de uno de ellos, en el cual la biopsia de trofoectodermo analizada mediante array-CGH mostró una trisomía para el cromosoma 7 (47,XY,+7), mientras que el reanálisis del blastocisto completo mostró un patrón euploide (46,XY).

El otro caso fue una biopsia de trofoectodermo diagnosticada como 48,XY,+1+4, en la que el reanálisis del blastocisto completo mostró un patrón euploide (46,XY).

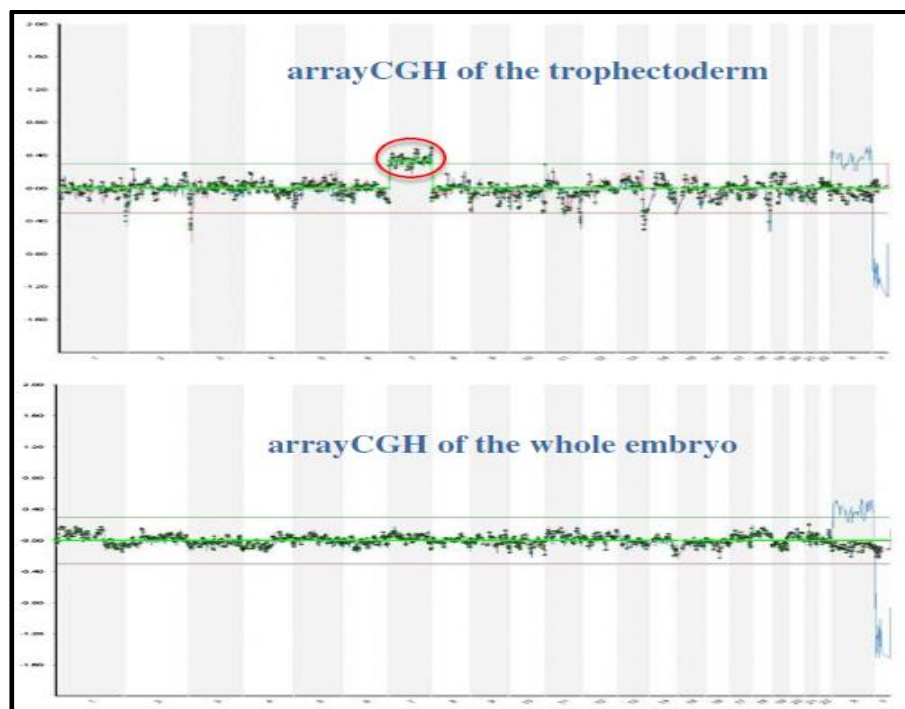


Figura 12. Ejemplo de uno de los dos embriones analizados mediante array-CGH en biopsia de trofoectodermo, cuyo resultado fue no concordante con en el reanálisis del blastocisto completo mediante array-CGH. Esta figura corresponde a la figura 2 del tercer artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening. *J Assist Reprod Genet.* 2016, 33:59–66).

Según estos resultados, la tasa de falsos positivos sería de 2% (1/50) para biopsias de día 3 y de 3,4% (2/59) para las biopsias de trofoectodermo. Ninguna de las diferencias entre grupos de los dos tipos de biopsia fue estadísticamente significativa (Tabla 8).

	Reanálisis embrión completo	Biopsia blastómera	Biopsia trofoectodermo	
Confirmado	Anormal uniforme	37 (74%)	48 (81,4%)	
	Mosaico aneuploide	Grupo A	6 (12%)	7 (11,9%)
		Grupo B	4 (8%)	2 (3,4%)
		Grupo C	2 (4%)	
No confirmado	Mosaico euploide-aneuploide*	1 (2%)		
	Normal uniforme*		2 (3,4%)	
TOTAL		50	59	

Tabla 8. Comparación de la tasa de confirmación de diagnóstico en ambos tipos de biopsia (día 3 vs. trofoectodermo), comparado con los resultados obtenidos en el reanálisis de los 109 blastocistos completos mediante array-CGH. Esta tabla se corresponde con la tabla 1 del tercer artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening. *J Assist Reprod Genet.* 2016, 33:59–66).

4.3.2. Análisis de los resultados considerando el diagnóstico por cromosoma.

Finalmente, respecto a la capacidad de detección de aneuploidías por cromosoma, en ambos tipos de biopsia la tasa de concordancia global fue muy elevada: 98,8% (1186/1200) para biopsias de día 3 y 98,5% (1395/1416) para biopsias de trofoectodermo. Si se considera la concordancia individualmente por cromosomas, en ambos casos para la mayoría de cromosomas la detección fue del 100%, siendo el porcentaje inferior en biopsias de día 3 para el cromosoma 22 (94%; 47/50), y en biopsias de trofoectodermo para el cromosoma 13 (93,2%; 55/59) (Tabla 9).

Cromosoma	Biopsia día 3			Biopsia trofoectodermo		
	Análisis biopsia (n)	Mismo resultado en blastocisto (n)	Tasa confirmación (%)	Análisis biopsia (n)	Mismo resultado en blastocisto (n)	Tasa confirmación (%)
1	50	50	100	59	58	98,3
2	50	49	98	59	57	96,6
3	50	49	98	59	59	100
4	50	50	100	59	58	98,3
5	50	50	100	59	58	98,3
6	50	50	100	59	58	98,3
7	50	50	100	59	58	98,3
8	50	50	100	59	59	100
9	50	50	100	59	59	100
10	50	50	100	59	59	100
11	50	50	100	59	58	98,3
12	50	50	100	59	59	100
13	50	49	98	59	55	93,2
14	50	48	96	59	58	98,3
15	50	48	96	59	58	98,3
16	50	50	100	59	57	96,6
17	50	50	100	59	58	98,3
18	50	49	98	59	59	100
19	50	48	96	59	57	96,6
20	50	50	100	59	57	96,6
21	50	49	98	59	59	100
22	50	47	94	59	59	100
X	50	50	100	59	59	100
Y	50	50	100	59	59	100
TOTAL	1200	1186	98,8	1416	1395	98,5

Tabla 9. Resumen de la capacidad de detección de aneuploidías por cromosoma en ambos tipos de biopsia (blastómera vs trofoectodermo), comparado con los resultados por cromosoma obtenidos en el reanálisis de los embriones enteros mediante array-CGH. Esta tabla corresponde a la tabla 2 del tercer artículo cuyos resultados han sido incluidos en la presente tesis doctoral (Mir P, et al. Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening. *J Assist Reprod Genet.* 2016, 33:59–66).

PUBLICACIÓN CORRESPONDIENTE AL OBJETIVO 3

Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening

J Assist Reprod Genet. 2016, 33:59–66.

Pere Mir Pardo, Emilia Mateu, Amparo Mercader, Raquel Herrero, Lorena Rodrigo, María Vera, Vanessa Peinado, Miguel Milán-Sánchez, Inmaculada Campos-Galindo, Sandra García-Herrero, Carlos Simón y Carmen Rubio.

Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening

P. Mir¹ · E. Mateu¹ · A. Mercader² · R. Herrer³ · L. Rodrigo¹ · M. Vera¹ · V. Peinado¹ · M. Milán-Sánchez¹ · I. Campos-Galindo¹ · S. García-Herrero¹ · C. Simón^{1,2} · C. Rubio^{1,2}

Received: 24 April 2015 / Accepted: 26 October 2015 / Published online: 7 November 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract

Purpose The purpose of this study was to compare the confirmation rate of day-3 embryo biopsy (blastomere) and trophoctoderm biopsy using array-comparative genomic hybridization (array-CGH) technology.

Methods A blinded study was conducted to re-analyse 109 embryos previously diagnosed as chromosomally abnormal by array-CGH. Preimplantation genetic screening (PGS) was performed using array-CGH on day 3 ($n=50$) or day 5 ($n=59$). Partial chromosome gains or losses were excluded ($n=6$), and only whole chromosome aneuploidies were considered. Re-analysis of whole blastocysts was carried out following the same array-CGH protocol used for PGS.

Results The PGS result was confirmed in the whole blastocyst in (a) 49/50 (98 %) abnormal embryos after day-3 biopsy and (b) 57/59 (96.6 %) abnormal embryos after trophoctoderm biopsy. One embryo (1/50; 2 %) was diagnosed as abnormal, with monosomy 18, on day 3, and software analysis of the whole blastocyst gave a euploid result; however, a mosaic pattern was observed for monosomy 18 in the whole blastocyst. Two trophoctoderm biopsy cases (3.4 %) did not have the abnormalities (trisomy 7, and trisomy 1 and 4, respectively) verified in the whole embryo. Concordance rates for both

biopsy strategies and for individual chromosomes were evaluated by Fisher's exact test and showed no significant differences.

Conclusions Both types of biopsies showed similar high concordance rates with whole blastocyst results. Therefore, regarding the confirmation rates shown in this work, day-3 embryo biopsies can be representative of the whole embryo and both types of biopsy can be used for clinical analysis in PGS following the described array-CGH protocol.

Keywords Array-CGH · Embryo biopsy · Preimplantation · Mosaicism · False-positive rate

Introduction

Preimplantation genetic screening (PGS) is an early method to detect aneuploidies in preimplantation embryos. Those embryos diagnosed as chromosomally abnormal will be discarded, while chromosomally normal embryos will be candidates for transfer to the maternal uterus. Historically, in in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatments, embryos have been selected for transfer using some morphological parameters as well as their in vitro development. The introduction of PGS in IVF settings enables embryos to be selected first by their chromosomal status and second by morphology and development status among the chromosomally normal ones. PGS can be offered to patients with an increased risk of having a higher percentage of chromosomally abnormal embryos, with the aim of improving their reproductive outcome. By transferring only chromosomally normal embryos, pregnancy and implantation rates are expected to be higher and miscarriage rates are expected to be lower, due to the reduced likelihood of implantation of chromosomally abnormal embryos (mainly embryos

Capsule Similar false positive rate of array-CGH technique applied to preimplantation genetic screening on day-3 and trophoctoderm embryo biopsies.

✉ P. Mir
pere.mir@igenomix.com

¹ IGENOMIX, Parc Científic de la Universitat de València, C/Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, Spain

² IVI-Valencia, Pza.Policía Local, 3, 46015 Valencia, Valencia, Spain

³ IVI-Zaragoza, Poetisa María Zambrano, 31, 50018 Zaragoza, Spain

lacking one or more chromosomes) and because about 50–60 % of miscarriages in the first trimester result from chromosomal abnormalities in the foetus [1, 2]. The most common clinical indications for PGS include patients with advanced maternal age (AMA), recurrent pregnancy-loss couples (RPL), couples having repetitive implantation failures (RIF), and severe male-factor infertility cases (SMF). Moreover, any couple having a previous known aneuploid pregnancy can be counselled to undergo PGS during subsequent attempts.

Currently, array-comparative genomic hybridization (CGH) is the technique most commonly used for PGS; quantitative fluorescence-polymerase chain reaction (QF-PCR) and single-nucleotide polymorphism (SNP) array are also used. Recently, next-generation sequencing (NGS) has emerged as a promising technique for PGS [3, 4]. Independently of the technique applied, there is a common agreement that screening methods that include all 24 chromosomes must provide robust and reliable results with low false-positive and false-negative rates no higher than 1–3 %, as well as a “no-calling” rate lower than 2 % [3, 5].

For any screening method, the genetic material is obtained through embryo biopsy. Three approaches are available: polar body biopsy (requires the analysis of both first and second polar bodies, retrieved on the day of fertilization), blastomere biopsy or cleavage-stage biopsy (single-cell day-3 embryo biopsy), and trophoctoderm biopsy (day-5 and/or day-6 embryo biopsy). Polar body biopsy has been used in preimplantation analysis [6, 7] and provides only maternal genetic information. Day-3 embryo biopsies enable a fresh embryo transfer of blastocysts on day 5 of the same cycle. In contrast, trophoctoderm biopsies require embryo vitrification and embryo transfer in a subsequent cycle, or a day-5 embryo biopsy along with a day-6 fresh embryo transfer.

Currently, blastomere and trophoctoderm biopsies are the two main approaches used for PGS, but there is a trend towards trophoctoderm biopsies. Day-3 embryo biopsy has been highly criticized because of a high degree of mosaicism in cleavage-stage embryos and the possibility of self-correction of aneuploidies from cleavage to blastocyst stage; therefore, trophoctoderm biopsy has been suggested as the most reliable option for PGS [8]. At this stage, the embryos have undergone their first cellular differentiation resulting in two cell lineages: the inner cell mass (the cells that will form the embryo) and the trophoctoderm cells (that will form the extraembryonic tissues). Thus, the biopsy of trophoctoderm cells would not adversely affect embryo development. Moreover, the identical genetic constitutions of both groups of cells from the same embryo have been demonstrated [9, 10].

The aim of this work is to compare the confirmation rate of PGS results obtained on day-3 embryo biopsies (cleavage stage) and blastocyst biopsies (trophoctoderm biopsy) using the same array-CGH protocol. Thus, the usefulness of both embryo biopsy strategies for PGS will be tested from the genetic point of view.

Materials and methods

A blinded study was performed to re-analyse 115 embryos from a PGS programme, originally diagnosed as chromosomally abnormal by array-CGH technique. Embryos having partial chromosome gains and losses were excluded from the study, since at the moment of collecting data for the study there was no consensus about the clinical impact of these unbalances, and only whole chromosome aneuploidies were considered. Six embryos (5.2 %) that were carriers of a segmental imbalance were excluded from the study. A total of 109 blastocysts from 58 patients were included in the study. Embryo biopsy was performed either on day 3 (26 patients, mean female age of 38.6) or day 5 (32 patients, mean female age of 36.9). The day-5 embryo biopsy was performed on cases with ≥ 12 MII oocytes or with ≥ 6 good-quality embryos on day 3; in the rest of the cases, day-3 embryo biopsy was performed. Following these criteria, PGS was performed on day-3 biopsies in 50 out of the 109 embryos, and on day-5 biopsies in the remaining 59 embryos. Re-analysis of the whole 109 blastocysts was carried out following the same array-CGH protocol used for PGS. The manufacturer's array-CGH scoring criteria were used to define embryos as euploid or aneuploid (BlueGnome Ltd., Cambridge, UK). After scoring the re-analysed blastocysts, array-CGH results were compared between the embryo biopsy and the whole blastocyst of the same embryo, first for the chromosomal status of the embryo and second for the confirmation rates per individual chromosome. Regarding the chromosomal status of the embryo, re-analysed embryos were divided according to previously described categories in Delhanty et al. [11] as normal, uniformly aneuploid, mosaic diploid-aneuploid, mosaic aneuploid and chaotic. In addition, the group of mosaic aneuploid re-analysed embryos were further analysed and divided into three groups according to their results per chromosome: (i) group A comprises embryos having not all but at least one of the aneuploidies present in the biopsy; group B comprises chromosomally abnormal embryos showing a complementary aneuploidy for a given chromosome (e.g. monosomy versus trisomy); and group C comprises embryos for which all aneuploidies present in the biopsy were observed plus any additional aneuploidies.

The present study has been approved by the CEIC (Spanish ethical committee of clinical investigation). It is a biomedical study not implying any contact with human beings (only embryo biopsies); moreover, in this blinded study, all the samples were anonymized before re-analysis.

All patients included in the study signed a consent form that includes all the possible pitfalls that may happen in PGS analysis and the possibility for re-analysis of the abnormal embryos. In all the cases, patients underwent controlled ovarian stimulation using standardized protocols and ICSI was performed [12]. Fertilization was assessed about 17–20 h after

ICSI, and embryo development was recorded every 24 h until the day of embryo transfer. Embryos were cultured in IVF/CCM medium (Vitrolife, Göteborg, Sweden) until day 3 of embryo development, then cultured in CCM medium in a co-culture with a monolayer of endometrial epithelial cells until day 5 [13]. For the cases of day-3 embryo biopsy, only embryos with five or more nucleated blastomeres and less than 25 % fragmentation degree were biopsied. Day-3 embryo biopsy can be summarized as follows: embryos were placed on a droplet containing $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium (G-PGD, Vitrolife, Göteborg, Sweden/LifeGlobal, Guilford, CT), the zona pellucida was perforated by pulses of laser (OCTAX, Herborn, Germany), and one blastomere was withdrawn from each embryo. Then, individual blastomeres were placed in 0.2-mL PCR tubes containing 2 μL PBS. For blastomere washing and handling, 1 % polyvinylpyrrolidone (PVP) was used. Euploid embryos were candidates to be transferred on day 5, and surplus euploid embryos were vitrified either on day 5 or on day 6. For the cases of trophectoderm biopsy, embryos were biopsied using CCM medium. Laser technology was used to perform the biopsy by using about four to six laser pulses to cut the trophectoderm cells inside the aspiration pipette. Then, trophectoderm biopsies were placed in 0.2-mL PCR tubes containing 2 μL PBS by the same washing in PVP drops than for day-3 biopsies. Also, the same washing method using PVP was performed to introduce whole day-5 blastocysts to be re-analysed.

To analyse all the three types of samples (blastomere biopsies, trophectoderm biopsies and whole blastocysts), the same array-CGH platform was used (24sure[®] v.3 platform; BlueGnome Ltd., Cambridge, UK). This platform was previously validated in our laboratory before being applied for clinical purposes [14]. A whole genome amplification (WGA) protocol was performed in all individual samples (Sureplex[®]; BlueGnome Ltd. Cambridge, UK). After WGA, the same 24-h array-CGH protocol was performed, including DNA labelling, hybridization, washing, scanning and data analysis (24sure[®] v.3 platform; BlueGnome Ltd. Cambridge, UK). Embryos were diagnosed as chromosomally normal, abnormal or chaotic abnormal. Chaotic embryos were defined as those showing a complex pattern of aneuploidies, involving more than six chromosomes, as previously described [14]. For the analysis of whole blastocyst samples, the presence of mosaicism was predicted according to the Log_2 ratio results obtained in a previous experimental study using the same array-CGH platform where mosaic blastocyst samples were simulated using groups of 100 cells, mixing euploid and aneuploid cells within the following ratios: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 and 100:0 [15]. The array-CGH manufacturer establishes a Log_2 ratio threshold of ± 0.3 for a result to be considered normal (taking into account the average Log_2 ratio deviation ranging from 0.07 to 0.15). In the experimental study, when samples had 25 % of abnormal cells, the Log_2 ratio was

increased but not above the 0.3 threshold; with 50 % of abnormal cells, the Log_2 ratio was always above the 0.3 threshold, and with 100 % of abnormal cells, the Log_2 ratio was 0.4 (with standard deviation of 0.08 to 0.1) [15].

Results

After comparison of the array-CGH results on embryo biopsies and in the whole blastocyst of the corresponding embryo, the overall confirmation rate for day-3 embryo biopsies was 98 % (49/50) and 96.6 % (57/59) for trophectoderm biopsies. In detail, for day-3 embryo biopsies, 37/50 (74 %) embryos were uniformly aneuploid, 12/50 (24 %) were consistent with a mosaic aneuploid pattern and only one blastocyst (1/50; 2 %) was diagnosed as euploid by software analysis. However, the re-analysis of the whole blastocyst showed a profile compatible with mosaicism for the same monosomy 18 observed in the original biopsy (Fig. 1). This embryo was considered as euploid-aneuploid mosaic because the average Log_2 ratio for chromosome 18 was -0.34 . This would be the only case considered a false-positive, yielding a 2 % (1/50) false-positive rate for array-CGH in day-3 embryo biopsies. Among the 12 embryos showing a mosaic aneuploid pattern, in 6/50 (12 %), not all but at least one day-3 aneuploidy was still present in the whole embryo (group A); in 4/50 (8 %) whole blastocysts, the complementary aneuploidy for a given chromosome (e.g. monosomy versus trisomy) was present (group B); and in two of them, 2/50 (4 %), all aneuploidies present in the biopsy were observed in the re-analysed blastocyst but also an additional chromosome loss was detected (group C).

For trophectoderm embryo biopsies, 48/59 (81.4 %) embryos were uniformly aneuploid, 9/59 (15.2 %) were consistent with a mosaic aneuploid pattern and only two embryos were euploid (2/59; 3.4 %). None of the abnormalities present on the trophectoderm biopsies for these two embryos (trisomy 7 and trisomy 1 and 4, respectively) were observed in the blastocyst analysis (Fig. 2). Therefore, the false-positive rate for array-CGH in trophectoderm biopsies in this study was 3.4 %. Among the nine embryos showing a mosaic aneuploid pattern, in 7/59 (11.9 %), at least one aneuploidy observed in the trophectoderm biopsy was still present in the blastocyst analysis (group A), and in 2/59 (3.4 %) cases, the whole blastocyst showed a complementary aneuploidy for a given chromosome (group B). There was no embryo in group C category showing any additional aneuploidies in the whole blastocyst compared to trophectoderm biopsies. Statistical analysis of the results in each subgroup for both biopsy strategies evaluated by Fisher's exact test showed no significant differences in any case (Table 1).

Regarding confirmation rates per individual chromosomes, most of the chromosomes showed 100 % concordance in both types of biopsies. In fact, the overall confirmation rate per individual chromosome was 98.8 % for day-3 embryos

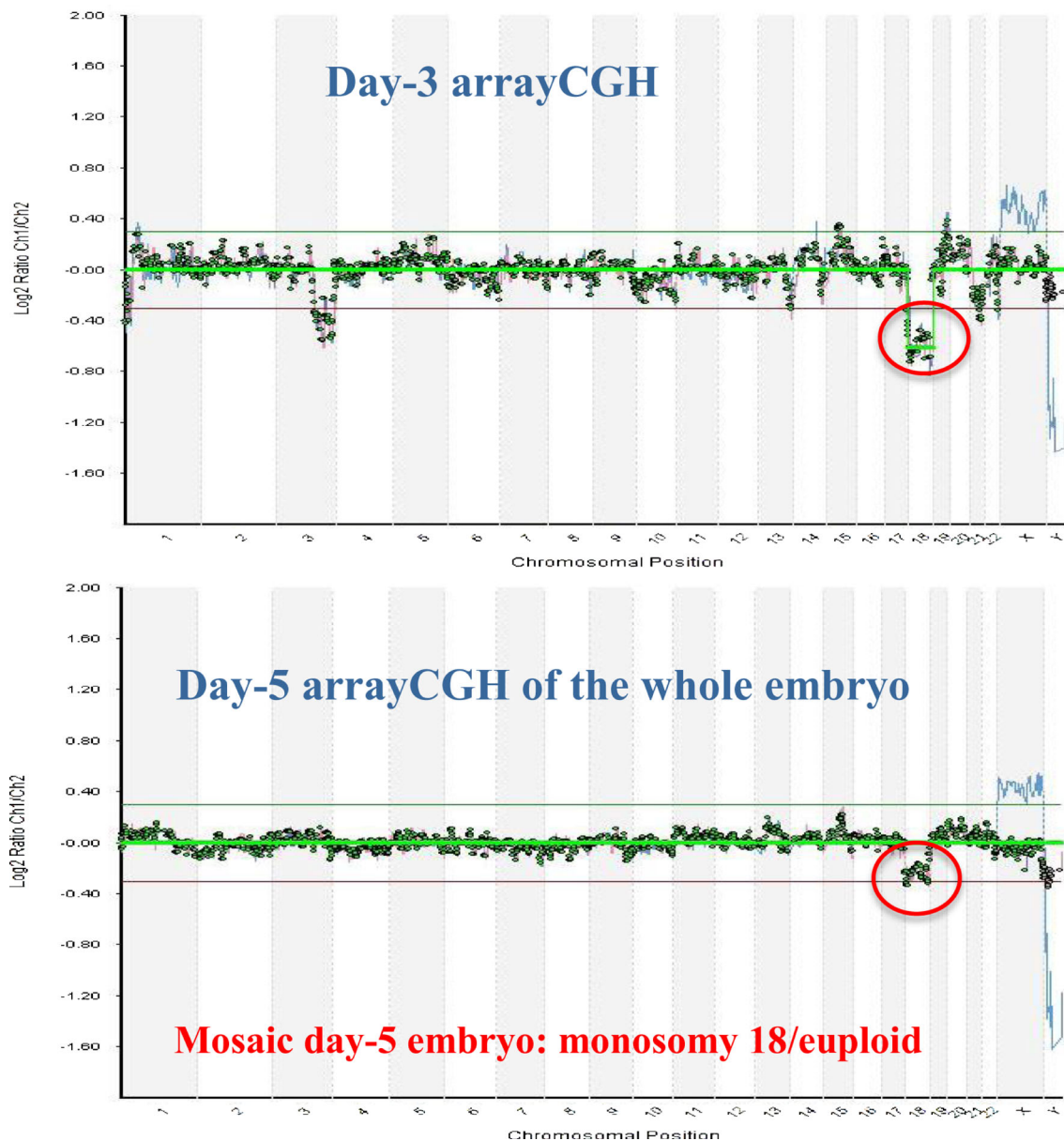


Fig. 1 The no concordant result for day-3 embryo biopsy cases compared to re-analysis of the whole blastocyst. The *top image* shows the array-CGH result of the day-3 embryo biopsy sample (result: 45,XX,-18). The *bottom image* corresponds to the array-CGH profile of the whole

blastocyst analysis from the same embryo (result: software analysis gives a euploid result; however, a pattern of mosaic 46,XX/45,XX,-18 can be observed, and the Log₂ ratio Ch1/Ch2 is -0.38 , and it can be considered as abnormal below -0.40)

(ranging from 94 to 100 %) and 98.5 % for trophectoderm biopsies (93.2 to 100 %). The lowest confirmation rate in day-3 cases was 94 % for chromosome 22, and in trophectoderm biopsies, the lowest was 93.2 % for chromosome 13 (Table 2), but no statistical differences were observed for any of the chromosomes.

Discussion

This study shows high and similar confirmation rates of PGS results when re-analysing the whole blastocyst in both types of

embryo biopsy strategies tested (blastomere and trophectoderm biopsies). Moreover, the confirmation rate per individual chromosome was also very high.

Any technique selected for the screening of all 24 chromosomes in PGS should offer reliable and timely results. Furthermore, every technique should be applied in clinical programmes only after their validation using a well-established technique. Array-CGH platforms were tested by comparing them to the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique before applying array-CGH for clinical diagnosis. Those studies showed a very low number of embryos with “no results” (from 1.4 to 2.9 %) as well as low false-

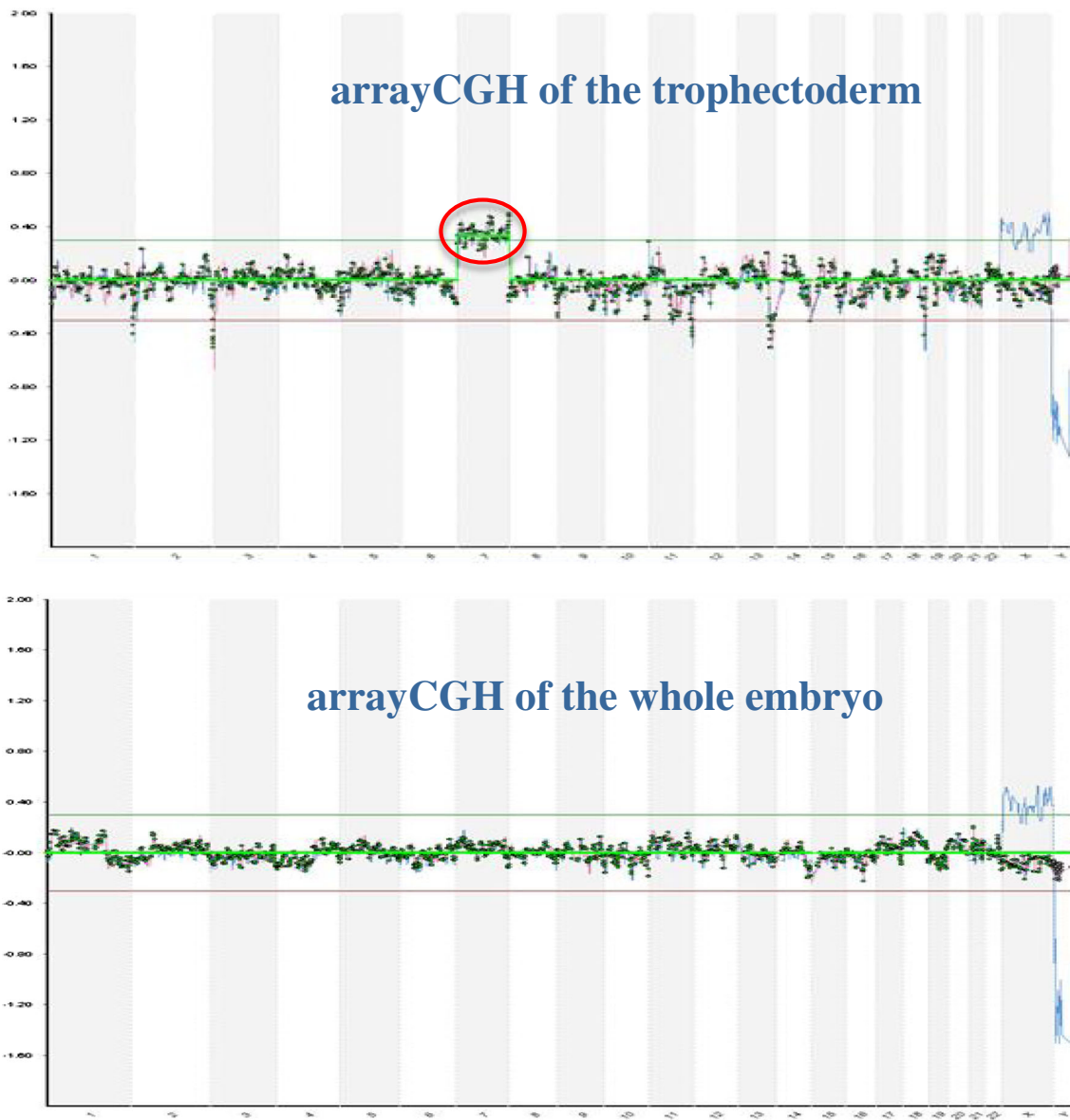


Fig. 2 No concordant result for a trophectoderm biopsy compared to re-analysis of the whole blastocyst. The *top image* shows the array-CGH result of the trophectoderm biopsy sample (result: 47,XYX,+7). The

bottom image corresponds to the array-CGH profile of the whole blastocyst analysis from the same embryo (result: 46,XY)

positive rates, from 1.9 to 2.7 %, when comparing the array-CGH result of the biopsy to the reconfirmation results of the

remaining cells of the day-5 embryos using FISH technique [14, 16, 17].

Table 1 Results of the re-analysis of 109 whole blastocysts, divided by the type of confirmation when compared with the previous PGS analysis. The not-confirmed group can be categorized as mosaic euploid-aneuploid according to the categories previously described in Delhanty et al. (1997)

		Day-3 PGS	Trophectoderm PGS	<i>p</i> value
Confirmed	Uniformly abnormal	37 (74 %)	48 (81.4 %)	ns
	Mosaic aneuploid-aneuploid	12 (24 %)	9 (15.2 %)	ns
Not confirmed		1 (2 %)	2 (3.4 %)	ns
Total		50	59	–

ns not significant

Table 2 Confirmation rate per individual chromosome in both types of embryo biopsy

Chromosome	D3	BTC	Confirmation	D5	BTC	Confirmation
1	50	50	100 %	59	58	98.3 %
2	50	49	98 %	59	57	96.6 %
3	50	49	98 %	59	59	100.0 %
4	50	50	100 %	59	58	98.3 %
5	50	50	100 %	59	58	98.3 %
6	50	50	100 %	59	58	98.3 %
7	50	50	100 %	59	58	98.3 %
8	50	50	100 %	59	59	100.0 %
9	50	50	100 %	59	59	100.0 %
10	50	50	100 %	59	59	100.0 %
11	50	50	100 %	59	58	98.3 %
12	50	50	100 %	59	59	100.0 %
13	50	49	98 %	59	55	93.2 %
14	50	48	96 %	59	58	98.3 %
15	50	48	96 %	59	58	98.3 %
16	50	50	100 %	59	57	96.6 %
17	50	50	100 %	59	58	98.3 %
18	50	49	98 %	59	59	100.0 %
19	50	48	96 %	59	57	96.6 %
20	50	50	100 %	59	57	96.6 %
21	50	49	98 %	59	59	100.0 %
22	50	47	94 %	59	59	100.0 %
X	50	50	100 %	59	59	100.0 %
Y	50	50	100 %	59	59	100.0 %
Total Chr	1200	1186	98.8 %	1416	1395	98.5 %

D3 day-3 PGS cases, BTC whole blastocyst samples having the same result compared with the PGS result, D5 trophectoderm PGS cases

Array-CGH has been applied for PGS mainly in day 3 and in trophectoderm biopsies. The number of PGS cycles performed using trophectoderm biopsies is increasing worldwide compared to the number of PGS cycles following day-3 embryo biopsies. This trend towards trophectoderm biopsies for PGS can be explained mainly by improved embryo culture conditions that allow a higher number of good-quality blastocysts to be biopsied and also by improved vitrification systems [18] that provide nearly 100 % embryo survival after the freezing/thawing process. Moreover, day-3 embryo biopsy was highly criticized in favour of trophectoderm biopsy because of a high degree of embryo mosaicism at the cleavage stage, as well as some potential for aneuploidy self-correction during embryo development, implying that a more accurate analysis would result if biopsy was performed on trophectoderm rather than on day-3 embryos [8]. However, the present work shows a very high confirmation rate per individual chromosome in both types of embryo biopsies (98.8 % for day 3 versus 98.5 % for trophectoderm), and these rates are also reflected in high confirmation rates of the PGS

diagnosis per embryo (98 % for day 3 versus 97.6 % for trophectoderm).

The latest RCT performed in male-factor patients using the strategy of performing the array-CGH technique on day-3 embryo biopsies and fresh embryo transfer on day 5 shows an ongoing pregnancy rate per PGS cycle of 66.7 %, statistically superior to the ongoing pregnancy rate of the control group of male-factor patients without PGS (42.8 %) [19]. Similarly, another RCT using array-CGH on trophectoderm biopsies presents an ongoing pregnancy rate of 69.1 % in young good-prognosis patients that underwent PGS compared to 41.7 % in patients of the same age range but without PGS [20]. Statistically significant higher pregnancy rates are achieved in both types of biopsies, day-3 and trophectoderm, when comparing PGS with the control group. Therefore, the most feasible scenario is that any harm caused by embryo biopsies would be overcome by the selection of a euploid embryo after PGS, at least in these studies.

The present work shows low discrepancy rates between the PGS result of the biopsy and the re-analysis result of the rest of the blastocysts. Only one (1/50, 2 %) of the embryos biopsied on day 3 showed results consistent with a mosaic “euploid-aneuploid” pattern, and only two (2/59, 3.4 %) of the embryos biopsied on day 5 showed results consistent with a mosaic “euploid-aneuploid” pattern. The low rate of “euploid-aneuploid” mosaic blastocysts is similar to the rate shown in Capalbo et al. [10] where 70 blastocysts diagnosed as chromosomally abnormal by array-CGH on trophectoderm biopsies were re-analysed. In that study, isolated cells from the inner cell mass as well as from the trophectoderm were re-analysed using FISH, and discrepancies were found in 11 out of 70 blastocysts (15.7 %) compared to array-CGH analysis in embryo biopsies. However, only in two cases (2/70; 2.9 %) were blastocysts classified as mosaic “euploid-aneuploid”.

It is challenging to calculate the real incidence of mosaicism in preimplantation embryos. A study comparing SNP-microarray versus FISH technique for the analysis of individual blastomeres from the same day-3 embryo showed more reliable results for SNP-microarray (96 versus 83 %) and also a lower mosaicism degree (31 %) for SNP-microarray samples. Therefore, the authors suggested that the incidence of mosaicism may have been overestimated in previous studies due to technical inconsistency of the FISH technique rather than any biological phenomena [21]. However, microarray techniques have also the limitation that they can detect mosaicism only if it represents more than 25–40 % of the cells [15, 22, 23]. The embryo biopsy will always represent a small percentage of the total number of cells of the embryo, both for day 3 and trophectoderm, and only chromosomally abnormal embryos can be re-analysed. Most likely, some of those transferred as “chromosomally normal embryos” may be carrying some abnormal cells. Therefore, two main types of mosaic embryos can be found: “aneuploid-aneuploid” mosaic,

having all chromosomally abnormal cells but with different cell lines, and “euploid-aneuploid” mosaic, having some normal cells and some abnormal cells. Initially, all the “aneuploid-aneuploid” mosaic embryos will not be candidates for transfer; therefore, the group of “euploid-aneuploid” mosaics are the ones that can create concern in this matter, mainly depending on the percentage of normal versus abnormal cells they may have.

In most of these studies as well as in ours, euploid embryos cannot be re-analysed due to law restrictions; therefore, some “euploid-aneuploid” mosaic embryos could be missed if the biopsy would contain only chromosomally normal cells. Nevertheless, looking at the clinical outcome of patients undergoing PGS with array-CGH, which shows high pregnancy and implantation rates as well as a reduced miscarriage rate [3, 24, 25], and also at the very low clinically recognizable error rate shown in PGS [5], it can be assumed that the number of “euploid-aneuploid” mosaic embryos in cleavage and blastocyst stage should not be very high and should not have a major clinical impact.

In summary, according to the results shown and discussed in the present paper, both types of embryo biopsy, day-3 and trophoctoderm biopsies, are feasible approaches that can be used if required in a PGS program. Day-3 PGS could be offered for those patients with lower-quantity and/or lower-quality embryos. Therefore, both types of embryo biopsies can coexist in the same PGS program and the patient’s treatment can be customized according to the individual patient’s requirements.

Conclusions

Both day-3 and trophoctoderm embryo biopsies showed similar concordance rates with whole blastocyst results. Therefore, regarding the confirmation rate, day-3 embryo biopsies can be representative of the whole embryo and both types of biopsy can be used for clinical analysis in PGS following the described array-CGH protocol.

Compliance with ethical standards The present study has been approved by the CEIC (Spanish ethical committee of clinical investigation). It is a biomedical study not implying any contact with human beings (only embryo biopsies); moreover, in this blinded study, all the samples were anonymized before re-analysis.

References

- Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol.* 2008;51:84–95.
- Campos-Galindo I, García-Herrero S, Martínez-Conejero JA, Ferro J, Simón C, Rubio C. Molecular analysis of products of conception obtained by hysteroembryoscopy from infertile couples. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(5):839–48.
- Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update.* 2015;21(6):727–47.
- Handyside A. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril.* 2013;100:595–602.
- Werner MD, Leondires MP, Schoolcraft WB, Miller BT, Copperman AB, Robins ED, et al. Clinically recognizable error rate after the transfer of comprehensive chromosomal screened euploid embryos is low. *Fertil Steril.* 2014;102(6):1613–8.
- Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet.* 2004;363(9421):1633–41.
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 1990;5(7):826–9.
- Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC, et al. Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod.* 2011;26(1):41–6.
- Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2008;23(11):2596–608.
- Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophoctoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2013;28(8):2298–307.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet.* 1997;99(6):755–60.
- Rubio C, Mercader A, Alama P, et al. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod.* 2010;25(9):2290–7.
- Mercader A, Valbuena D, Simón C. Human embryo culture. *Methods Enzymol.* 2006;420:3–18.
- Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendía P, Mateu E, Milán-Sánchez M, et al. False positive rate of an arrayCGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(1):143–9.
- Mamas T, Gordon A, Brown A, Harper J, SenGupta S. Detection of aneuploidy by array comparative genomic hybridization using cell lines to mimic a mosaic trophoctoderm biopsy. *Fertil Steril.* 2012;97(4):943–7.
- Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod.* 2010;25(7):1812–7.
- Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril.* 2011;95(3):953–8.
- Cobo A, Bellver J, Domingo J, et al. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. *Reprod BioMed Online.* 2008;17(1):68–72.
- Rubio C, Castillón G, Rodrigo L, Bellver J, Guillem A, Remohí J, et al. Improvement of clinical outcome in severe male factor infertility with embryo selection based on array-CGH: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2014;102 Suppl 3:e24–5.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. 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(1):24–9.
- Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott Jr RT. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is

- significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(8):583–9.
22. Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott Jr RT. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(8):590–600.
 23. Novik V, Moulton EB, Sisson ME, Shrestha SL, Tran KD, Stern HJ, et al. The accuracy of chromosomal microarray testing for identification of embryonic mosaicism in human blastocysts. *Mol Cytogenet.* 2014;7(1):18.
 24. Rubio C, Rodrigo L, Mir P, Mateu E, Peinado V, Milán M, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril.* 2013;99(4):1044–8.
 25. Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Cobo AC, Peinado V, Milán M, et al. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res Int.* 2014;2014:517125. doi:10.1155/2014/517125.

3. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Acerca del diseño

En la presente tesis doctoral para la consecución de los objetivos primero y segundo, se han reanalizado blastocistos aneuploides completos mediante la técnica de FISH que permite obtener información individual de cada una de las células. Los resultados presentados en el tercer objetivo corresponden a blastocistos reanalizados mediante la técnica de array-CGH, que permite analizar la totalidad del blastocisto en su conjunto, sin poder identificar diferencias individuales.

Como hemos mencionado, el reanálisis de un blastocisto completo mediante la técnica de FISH, permite el análisis individual de cada una de sus células. Sin embargo, a pesar de que todo el embrión es fijado a la vez, las células quedan extendidas en el portaobjetos, y las señales de FISH de cada una de ellas pueden ser analizadas individualmente. En cambio, no todas las células se fijan correctamente, de manera que no todas ellas pueden ser analizadas de manera óptima. Además, la mayor limitación de este tipo de reanálisis de embriones mediante FISH es que no permite analizar todos los cromosomas simultáneamente. Esto es debido a que existe una limitación del número de cromosomas que se pueden analizar en cada una de las sucesivas hibridaciones (máximo 4 ó 5 cromosomas, ver metodología), y según nuestra experiencia durante la parte experimental del presente trabajo, la cromatina de estas células va degradándose en cada una de las sucesivas rondas de hibridación, por lo que las señales de FISH son de peor calidad tras cada hibridación. De esta manera, cualquier célula embrionaria fijada, no admite más de 3 hibridaciones sucesivas con buena calidad de señales (máximo 4 hibridaciones en casos excepcionales).

En cambio, cuando el reanálisis de embriones completos se realiza mediante la técnica de array-CGH, el embrión es analizado como un conjunto, es decir, todas las células son analizadas simultáneamente como una única muestra. A pesar de que mediante este método de reanálisis no se perdería el contenido de ninguna célula, el hecho de analizarlas a la vez hace que no sea posible definir el número exacto de células que contenían la anomalía observada en dicho análisis. De hecho, se ha descrito que la técnica de array-CGH es capaz de detectar mosaicismo con suficiente claridad cuando la misma anomalía está presente en un mínimo del 25-40% de las células (Mamas *et al.*, 2012), pero no hay una manera precisa de calcular el porcentaje exacto de células que presentan dicha anomalía.

Con respecto al diseño, conviene destacar que los estudios encontrados en la literatura se han centrado en la determinación de falsos positivos, con el reanálisis de embriones aneuploides, dada la dificultad para calcular la tasa de falsos negativos con reanálisis de embriones euploides. De forma indirecta podemos tener una estimación de la tasa de falsos negativos a nivel clínico en los casos en los que se ha conseguido embarazo. En este sentido, la tasa de error clínico descrita en programas de DGP-A ha sido muy baja (Werner *et al.* 2014). En concreto, la tasa de error clínico detectado por embrión diagnosticado como euploide fue 0.21% (95% IC 0.10–0.37), mientras que la tasa de error clínico detectado por transferencia fue 0.32% (95% IC 0.16–0.56) (Werner *et al.* 2014).

5.2. Acerca de la tecnología aplicada en DGP-A

Los primeros estudios RCT publicados utilizando la técnica de FISH mediante biopsia embrionaria en día 3, no mostraron mejora de los resultados clínicos de un programa de DGP-A comparado con ciclos de FIV/ICSI convencional. Posteriormente, se publicó un metaanálisis con la recopilación de estos trabajos (Mastenbroek *et al.*, 2011), y tras su publicación, la aplicación de DGP-A quedó en entredicho. Por otro lado, estos trabajos fueron criticados metodológicamente, argumentando que un buen diseño experimental no era suficiente para aceptar las conclusiones de un RCT sobre los beneficios clínicos del DGP-A, sino que, además, se requería de experiencia y una buena *praxis* en la biopsia embrionaria y en la posterior aplicación de la técnica de FISH y de la interpretación de resultados (Simpson *et al.*, 2008, Rubio *et al.*, 2009).

Al inicio de la presente tesis doctoral, nuestro programa de DGP-A mediante FISH en biopsias de día 3 ofrecía unos resultados clínicos esperanzadores (Rubio *et al.*, 2005). En un análisis de las diferencias metodológicas entre nuestro programa de DGP-A y los expuestos en el resto de publicaciones, encontramos tres diferencias relevantes:

- a) El número de cromosomas analizados: en nuestra metodología de DGP-A para FISH en blastómera única analizábamos 9 cromosomas, mientras que algunos de los trabajos anteriormente mencionados únicamente analizaban 7 cromosomas (en Blockeel *et al.*, 2008 se analizaron los cromosomas X, Y, 13, 16, 18, 21 y 22, sin incluir el cromosoma 15, uno de los más implicados en aneuploidías encontradas en restos abortivos (Hassold *et al.*, 1996);
- b) La presencia de rondas adicionales de hibridación: en ninguno de estos trabajos se describió la presencia de estas hibridaciones adicionales bajo ninguna circunstancia, en cambio, sí había constancia en la literatura de la presencia de “falsas monosomías”, sobre todo para el cromosoma 16, (Colls *et al.*, 2004) y de la tendencia de la técnica de FISH a dar señales de interpretación dudosa (Colls *et al.*, 2007), pero no existía en la literatura una recomendación clara sobre cuando incorporar estas hibridaciones;
- c) Tasa de embriones “no informativos”: en nuestro laboratorio, antes de incluir rondas de hibridación adicionales no era superior al 5%, y tras incluir estas hibridaciones, la tasa de embriones no informativos tras FISH descendió a 0,9%; en cambio, algunos de estos trabajos presentaban hasta un 20% de embriones no informativos, que finalmente eran transferidos sin analizar (Mastenbroek *et al.*, 2007).

En este escenario, decidimos incorporar en nuestra metodología de DGP-A rondas de hibridación adicionales en dos situaciones concretas: para casos de interpretación dudosa de algunas de las señales de FISH, y para casos no informativos para alguno de los cromosomas analizados. En estas biopsias, incorporamos rondas de hibridación para los mismos cromosomas analizados, pero esta vez usando sondas de FISH dirigidas a regiones cromosómicas diferentes a las usadas en las rondas previas, con el fin de evaluar si la combinación de varios tipos de sondas aumentaba la tasa de informatividad y reducía la tasa de falsos positivos anteriormente descrita para esta técnica. Los resultados en ambos grupos de embriones fueron diferentes, pero la mejora global del diagnóstico fue patente.

En concreto, en el grupo de embriones con diagnóstico no concluyente, se redujo drásticamente la tasa de embriones “no-informativos” en un 99%, y además un 59% de los embriones incluidos en el estudio fueron candidatos a transferencia embrionaria al ser finalmente diagnosticados como

cromosómicamente normales para los cromosomas analizados. En el caso de embriones con presencia de una única aneuploidía con resultado dudoso, cuando la aneuploidía era una monosomía, el 19,6% de embriones fueron rescatados como cromosómicamente normales para ser transferidos, pero no fue así en el caso de las trisomías donde prácticamente todas se confirmaron (98.9%).

Para corroborar la aportación al diagnóstico de la incorporación de dichas hibridaciones, un grupo de estos embriones (n=80) en los que se habían incluido hibridaciones adicionales y seguían siendo cromosómicamente anormales, fueron reanalizados en su totalidad en día 5 mediante FISH. Estos resultados fueron comparados con otro grupo de embriones de características similares, pero sin rondas de hibridación adicionales. La tasa de falsos positivos se redujo de un 17,3% a un 5% ($p=0,443$) gracias a la incorporación de estas hibridaciones.

Aplicando esta metodología de FISH en biopsias de día 3, se mejoró el éxito reproductivo en pacientes sometidas a DGP-A, tal y como se mostró en dos estudios RCT. El artículo publicado, que recoge los datos de ambos estudios, demostró un incremento estadísticamente significativo en las tasas de recién nacido vivo tras la aplicación de DGP-A en pacientes de 41 a 44 años comparado con población similar sin DGP-A (30/93 pacientes [32.3%] *versus* 14/90 pacientes [15.5%]; odds ratio=2.585; IC= [1.262–5.295]) (Rubio *et al* 2013a), mientras que en el otro estudio realizado en parejas con fallo de implantación, a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia a favor del grupo de pacientes sometidos a DGP-A (23/48 [47.9%] *versus* 12/43 [27.9%]) (Rubio *et al* 2013a).

A pesar de la mejora de los resultados clínicos con esta tecnología, la técnica de FISH adaptada a DGP-A no permitía aplicar simultáneamente sondas de FISH para los 23 pares de cromosomas. Por otro lado, los estudios de restos abortivos habían demostrado la presencia de aneuploidías para otros cromosomas no comúnmente incluidos en los paneles de FISH (Hassold *et al.*, 1996), por lo que se hacía cada vez más necesario el uso de alguna tecnología capaz de analizar los 24 cromosomas simultáneamente.

Cuando iniciamos la búsqueda de la técnica para analizar todos los cromosomas de la biopsia embrionaria simultáneamente, las opciones disponibles en el campo de DGP-A estaban basadas en hibridación genómica comparada, y en concreto, array-CGH ofrecía las mejores condiciones en cuanto a tiempo de trabajo en laboratorio para adaptar el análisis a la rutina que practicábamos en DGP-A: biopsia de una blastómera en día 3, y transferencia de embriones euploides en fresco en día 5 de desarrollo (Wells *et al.*, 2008). Por ello, fue array-CGH la tecnología para el segundo y tercer objetivo de la presente tesis doctoral.

La primera fase de la validación de la plataforma de array-CGH fue comprobar que mediante esta técnica éramos capaces de detectar las anomalías que encontrábamos en nuestro diagnóstico de rutina mediante FISH. Durante la fase de validación de la plataforma de array-CGH, todas las aneuploidías detectadas mediante FISH fueron detectadas también por array-CGH y, además, en el 37,1% de los embriones, se detectaron mediante array-CGH aneuploidías para cromosomas no incluidos en el panel de 9 cromosomas analizados mediante FISH. La tasa de falsos positivos en este grupo de embriones fue idéntica para ambas técnicas (2,7%). Con estos resultados mostramos de forma preliminar como la plataforma de array-CGH seleccionada era válida para DGP-A en nuestras condiciones de laboratorio, y ofrecía una capacidad de diagnóstico mayor que FISH al permitir analizar todos los cromosomas simultáneamente.

En la actualidad, se ha extendido el uso de la técnica de NGS en DGP-A, y los primeros trabajos publicados comparando los resultados de array-CGH y NGS, muestran una alta tasa de concordancia tanto para aneuploidías completas como para aneuploidías parciales cuando el mismo producto amplificado mediante WGA es analizado con ambas técnicas (Fiorentino *et al.*, 2014; Vera *et al.*, 2017a).

5.3. Acerca del tipo de biopsia embrionaria

Tras la validación de la técnica de array-CGH, ésta pasó a ser la técnica preferente para el diagnóstico de rutina en DGP-A. Pero esta validación fue inicialmente realizada en nuestro laboratorio únicamente en biopsias de día 3, ya que en el periodo de tiempo en el que se realizó la validación, ésta era la estrategia de biopsia embrionaria más generalizada y todavía no se había incorporado la biopsia de trofoectodermo en la práctica clínica del centro en el que se realizó este estudio.

Sin embargo, la biopsia de trofoectodermo se extendió tras la publicación del primer RCT en mujeres jóvenes y con transferencia de un único embrión en las que el DGP-A se realizó mediante biopsia de trofoectodermo analizada con array-CGH. En este estudio se mostró un incremento significativo en la tasa de gestación evolutiva en el grupo de pacientes con DGP-A comparado con la transferencia de blastocistos sin analizar (69,1% *versus* 41,7%, respectivamente; $p = 0,009$) (Yang *et al.*, 2012).

En el siguiente estudio RCT que se publicó en biopsias de trofoectodermo con análisis de 24 cromosomas, la técnica de análisis fue qPCR (Forman *et al.*, 2013). Este trabajo también fue realizado en pacientes jóvenes (edad media $35,1 \pm 3,9$) con transferencia de un único blastocisto euploide. Comparando los resultados con el grupo control de pacientes de edad similar en los que se transfirieron dos blastocistos de buena morfología sin analizar, las tasas de gestación evolutiva fueron similares en ambos grupos (60,7% en DGP-A *versus* 65,1%; 95% CI: 0,7- 1,2), y la tasa de aborto fue menor en el grupo de pacientes con DGP-A, aunque no estadísticamente significativa (11,5% *versus* 20,0%; $P=0,2$) (Forman *et al.*, 2013). Con estos resultados los autores confirmaron que en este grupo de pacientes jóvenes, la gestación evolutiva es la misma transfiriendo un blastocisto analizado que transfiriendo dos blastocistos sin analizar, y destacan la ventaja de obtener elevadas tasas de gestación mediante la transferencia de un único embrión reducirá la vez que se reduce drásticamente la tasa de gestación múltiple.

Tras la publicación de estos resultados en biopsias de trofoectodermo, el siguiente paso de la presente tesis doctoral fue validar el mismo protocolo de array-CGH que ya habíamos validado en biopsia de blastómera, pero esta vez aplicado a biopsias de trofoectodermo. Tras la validación, se comparó la tasa de detección de aneuploidías y la tasa de falsos positivos en ambos tipos de biopsias. En biopsias de trofoectodermo la tasa de falsos positivos con reanálisis de embriones mediante array-CGH fue de **3,4%** (Mir *et al.*, 2016), mientras que en biopsias de día 3, la tasa de falsos positivos en embriones reanalizados con FISH fue de **2,4%** (Mir *et al.*, 2013) y en embriones reanalizadas mediante array-CGH fue de **2,0%** (Mir *et al.*, 2016).

Por tanto, en base a los resultados de estos estudios pudimos concluir que con la técnica de array-CGH, la tasa de falsos positivos y la capacidad de detección de aneuploidías era similar en biopsias de blastómera y de trofoectodermo. Además, las tasas de falsos positivos obtenidas en todos estos estudios estuvieron en el rango del 2-3% publicado por otros autores con biopsias previamente

analizadas mediante array-CGH (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2012, Capalbo *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2017).

Los resultados de la presente tesis doctoral tenían como objetivo la evaluación de las técnicas empleadas en un programa de DGP-A previa a su extensiva aplicación clínica. Y, con esta misma metodología, nuestro grupo de DGP-A publicó un RCT en mujeres de edad materna avanzada con edades comprendidas entre los 38 y 41 años, aplicando la técnica de array-CGH en biopsias de blastómera (Rubio *et al.*, 2017). En dicho estudio se muestra la ventaja de la aplicación de DGP-A en este grupo de pacientes, ya que las tasas de nacido vivo son muy superiores al grupo control de pacientes del mismo rango de edad, pero sin biopsia embrionaria. Las diferencias en las tasas de nacido vivo son estadísticamente significativas a favor del grupo de pacientes sometidas a DGP-A, tanto por número de transferencias realizadas (52,9% vs. 24,2%; $p=0.0002$), como por número de pacientes incluidas (36,0% vs. 21,9%; $p=0.0309$). Además, la reducción observada en la tasa de aborto clínico es altamente significativa (2,7% vs. 39,0%; $p<0.0001$) (Rubio *et al.*, 2017).

5.4. Impacto del mosaicismo en los resultados de DGP-A

Los primeros estudios sobre mosaicismo embrionario son trabajos de reanálisis realizados en embriones previamente diagnosticados como anormales en día 3 aplicando la técnica de FISH. La metodología más aplicada en estos trabajos era similar a la expuesta en la presente tesis doctoral, y básicamente consistía en extender y fijar el resto del embrión en día 5 o día 6 para analizar todas las células mediante sondas de FISH específicas. En esta época, la incidencia de mosaicismo embrionario publicada oscilaba entre el 30-45% (Magli *et al.* 2000, Li *et al.* 2005, Munné *et al.* 2005, Baart *et al.* 2006, DeUgarte *et al.* 2008).

Posteriormente, se publicaron estudios de reanálisis de embriones aneuploides cuyas biopsias habían sido analizadas mediante array-CGH. En estos trabajos los resultados fueron muy diferentes, y se observó una elevada concordancia (en torno al 97-98%) entre el resultado de la biopsia embrionaria y el contenido cromosómico del resto del embrión (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2011, Capalbo *et al.*, 2013, Huang *et al.* 2017). Estos datos son concordantes con la tasa de falsos positivos mostrada en la presente tesis doctoral al aplicar la técnica de array-CGH para DGP-A tanto en biopsias de blastómera en día 3 (2,2%; 2/92 embriones) (Mir *et al.* 2013, Mir *et al.* 2016), como en biopsias de trofoectodermo (3,4%; 2/59 embriones) (Mir *et al.* 2016). En base a estos resultados, y considerando también las bajas tasas de error clínico (Werner *et al.*, 2004), el impacto del mosaicismo en el diagnóstico no afectaría a más del 5-7% de embriones analizados (Capalbo *et al.* 2017b, Rubio *et al.* 2017, Simón 2017).

La discrepancia de resultados entre el análisis de la biopsia y el análisis del resto del embrión puede tener causas diversas. La presencia de mosaicismo embrionario podría explicar este hecho, pero también un artefacto de la técnica de análisis empleada. A su vez, un artefacto a nivel técnico podría explicarse por diversos motivos, bien sea una deficiente manipulación del embrión y/o la biopsia, una deficiente lisis celular, una limitación inherente a la técnica, o bien una asincronía en el ciclo celular (Pujol *et al.*, 2004, Dimitriadou *et al.*, 2014).

Respecto a la capacidad de detección de mosaicismo con biopsia de un número limitado de células de trofoectodermo, se han descrito diferentes rangos de detección en función de la tecnología utilizada y de los criterios de diagnóstico de cada grupo. En algunos trabajos se ha establecido el

límite mínimo de detección de mosaicismo mediante NGS en el 20% (Munné *et al.* 2017). En cambio, en otros trabajos se ha considerado el 30% (Vera *et al.* 2017b). Por otro lado, mediante la tecnología de array-CGH se estableció el límite de detección en un rango comprendido entre el 25-40% (Mamas *et al.*, 2012). En cualquier caso, el nivel mínimo de mosaicismo que se quiera detectar no va a depender sólo de la tecnología sino también del criterio de diagnóstico utilizado. Se han realizado varios trabajos para determinar el equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad en la detección de mosaicismo (Goodrich *et al.*, 2016).

Con estas nuevas opciones para identificar la presencia de mosaicismo, en la literatura podemos encontrar varios trabajos que muestran el resultado de transferir embriones diagnosticados como mosaico. El primer trabajo recoge los datos de gestación y nacido vivo en 18 casos en los que se transfirieron embriones diagnosticados como mosaico mediante array-CGH, obteniendo 6/18 (33,3%) gestaciones evolutivas (Greco *et al.* 2015). Los últimos trabajos publicados se han enfocado en los resultados de transferir embriones diagnosticados como mosaico tras biopsia de trofoectodermo analizada mediante NGS. En estos trabajos, se ha observado que las tasas de implantación, gestación evolutiva y niño nacido vivo son significativamente menores comparadas con la transferencia de embriones euploides; y en cambio, las tasas de aborto son significativamente superiores cuando se transfieren embriones mosaico. Y más en detalle, se ha descrito que el éxito reproductivo cuando se transfiere un embrión mosaico es progresivamente menor cuanto más severa es la anomalía encontrada en mosaico en la biopsia (Fragouli *et al.*, 2017, Munné *et al.*, 2017), y cuanto mayor sea la cantidad de células anormales presentes en el embrión mosaico.

Algunos de estos autores, tras analizar los resultados de las series de embriones mosaico que han sido transferidos, recomiendan establecer un límite en el grado de mosaicismo máximo aceptable a la hora de transferir estos embriones en un máximo del 40% de células aneuploides (Munné *et al.*, 2017). De hecho, en estos trabajos, se observa mejores resultados reproductivos tras la transferencia de embriones mosaico con menos del 40% de células aneuploides, y dentro de ellos, los embriones con grado de mosaicismo del 20% son los que presentan los mejores resultados. Este hecho puede explicarse desde un punto de vista biológico si asumimos que cuanto mayor es el grado de mosaicismo mayor será el impacto negativo que las células aneuploides puedan presentar en el desarrollo del embrión. Pero también, desde un punto de vista más técnico, en los casos en los que se establece el nivel de detección de mosaicismo en el 20%, existe el riesgo de sobreestimar el diagnóstico de mosaicismo dadas las limitaciones de la técnica de WGA aplicada a biopsias embrionarias. En este escenario, en algunos de los casos publicados, se podrían haber transferido embriones euploides en lugar de embriones mosaico. Por ello, resulta fundamental la validación de cualquier plataforma de NGS aplicada a DGP-A con líneas celulares de cariotipo conocido, tanto en términos de detección de aneuploidías, como para establecer los valores de detección de mosaicismo con el fin de encontrar un equilibrio entre falsos positivos y falsos negativos (Goodrich *et al.*, 2016).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La incorporación de rondas de hibridación adicionales en el análisis mediante FISH de biopsias de blastómeras redujo drásticamente el número de embriones con resultado no concluyente, aumentando así el número de embriones disponibles para transferencia embrionaria en el programa de DGP-A.
2. Las rondas de hibridación adicionales con nuevas sondas de FISH para un mismo cromosoma redujeron la tasa de falsos positivos en biopsias de blastómeras, particularmente en el caso de las monosomías. En cambio, las trisomías fueron confirmadas en la mayoría de los casos.
3. Se observó una elevada concordancia entre los resultados de FISH y los de array-CGH en biopsias realizadas sobre un mismo embrión.
4. La tasa de falsos positivos utilizando la técnica de array-CGH fue similar en biopsias de día 3 y en biopsias de trofoectodermo, permitiendo su aplicación tanto para biopsias de blastómera como de trofoectodermo.
5. Los reanálisis realizados en blastocistos completos mostraron una baja tasa de falsos positivos, que en parte se podrían justificar por la presencia de mosaicismo de bajo grado, con convivencia de líneas celulares euploides y aneuploides.

REFERENCIAS

- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T. and Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod.Biomed.Online*, 2003, 6: 226-231.
- Al-Asmar N, Peinado V, Vera M, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Hassold T, Rubio C. Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage. *Fertil Steril*. 2012;98(1):145-50.
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 2006 Jan;21(1):223-33.
- Bellver J, Soares SR, Alvarez C, Muñoz E, Ramírez A, Rubio C, Serra V, Remohí J, Pellicer A. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*. 2008 Feb;23(2):278-84.
- Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL et al. History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006;107:1098–102.
- Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice: Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 2010;363:1740–7.
- Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, Haentjens P, Van der Elst J, Devroey P. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online*. 2008 Dec;17(6):848-54.
- Campos-Galindo I, García-Herrero S, Martínez-Conejero JA, Ferro J, Simón C y Rubio C. Molecular analysis of products of conception obtained by hysteroembryoscopy from infertile couples. *J Assist Reprod Genet* (2015) 32:839–848
- Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L. and Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum.Reprod.*, 2013, 28: 2298-2307.
- Capalbo A, Ubaldi FM, Rienzi L, Scott R and Treff N. Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities. *Hum Reprod*. 2017a Mar 1;32(3):492-498.
- Capalbo A. and Rienzi L. Mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Fertil Steril*. 2017b May;107(5):1098-1106.
- Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, and Rienzi L. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. Volume 2016, Article ID 7193075, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7193075>.
- Coates A, Hesla JS, Hurliman A, Coate B, Holmes E, Matthews R, Mounts EL, Turner KJ, Thornhill AR, Griffin DK. Use of suboptimal sperm increases the risk of aneuploidy of the sex chromosomes in preimplantation blastocyst embryos. *Fertil Steril*. 2015 Oct;104(4):866-72.
- Cohen,J., Wells,D. and 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: 496-503.
- Colls P, Sandalinas M, Pagidas K and Munné S. PGD analysis for aneuploidy in a patient heterozygous for a polymorphism of chromosome 16 (16qh-). *Prenat Diagn*. 2004 Sep;24(9):741-4.

- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil. Steril.* 2007 Jul;88(1):53-61.
- De Souza E, Halliday J, Chan A, Bower C, Morris JK. Recurrence risks for trisomies 13, 18, and 21. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(12):2716-22.
- DeUgarte,C.M., Li,M., Surrey,M., Danzer,H., Hill,D. and DeCherney,A.H. 2008 . Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil.Steril.* 90, 1049-1054
- De Vos A, Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 2001;21(9):767-80.
- Diez-Juan, A., Rubio, C., Marin, C., Martinez, S., Al-Asmar, N., Riboldi, M., et al. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: Less is better. *Fertility and Sterility*, 2015: 104, 534–541.
- Dimitriadou E, Van der Aa N, Cheng J, Voet T y Vermeesch J. Single cell segmental aneuploidy detection is compromised by S phase. *Molecular Cytogenetics* 2014, 7:46.
- Escudero T, Estop A, Fischer J y Munné S. Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements. *Am J Med Genet A.* 2008 Jul 1;146A(13):1662-9.
- Fiorentino F, Bono S, Biricik A. et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum.Reprod.*, 2014, 29: 2802-2813.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Babariya D, Tarozzi N, Borini A, Wells D. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts. *Hum Genet.* 2017 Jul;136(7):805-819.
- Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, Treff NR, Scott RT Jr. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2013;100(1):100-7.
- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril.* 2014 Mar;101(3):656-663.
- García-Herrero, S., Rodrigo, L., Mateu, E., Peinado, V., Milán, M., Campos-Galindo, I., et al., *Medecine therapeutique/Medecine de la reproduction, gynecologie et endocrinologie.* John Libbey Eurotext, 2014, 14(2): 112–119.
- Garcia-Herrero S, Cervero A, Mateu E, Mir P, Póo ME, Rodrigo L, Vera M y Rubio C. Genetic Analysis of Human Preimplantation Embryos. *Curr Top Dev Biol.* 2016; 120:421-47. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.04.009. Epub 2016 May 31.
- Goodrich D, Tao X, Bohrer C et al., A randomized and blinded comparison of qPCR and NGS-based detection of aneuploidy in a cell line mixture model of blastocyst biopsy mosaicism. *J Assist Reprod Genet* (2016) 33:1473–1480.
- Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med* 2015; 373:2089–90.
- Gravholt CH, Juul S, Naeraa R and Hansen J. Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study. *BMJ* 1996;312:16.
- Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J. et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil.Steril.*, 2011, 95: 953-958.

- Haddad G, He W, Gill J, et al. Mosaic pregnancy after transfer of a “euploid” blastocyst screened by DNA microarray. *J Ovarian Res* 2013;6(1):70.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*. 1989 Feb 18;1(8634):347-9.
- Hanson C, Hardarson T, Lundin K, Bergh C, Hillensjö T, Stevic J, Westin C, Selleskog U, Rogberg L y Wikland M. Re-analysis of 166 embryos not transferred after PGS with advanced reproductive maternal age as indication. *Hum Reprod*. 2009 Nov;24(11):2960-4.
- 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 Dec;23(12):2806-12.
- Harper,J.C., Coonen,E., Ramaekers,F.C. et al. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum.Reprod*, 1994, 9: 721-724.
- Harris BS, Bishop KC, Kemeny HR, Walker JS, Rhee E y Kuller JA. Risk Factors for Birth Defects. *Obstet Gynecol Surv*. 2017 Feb;72(2):123-135.
- 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 Oct;44(Pt 2):151-178.
- Hassold T, et al. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ. Mol. Mutagen* 1996; 28:167–175.
- Hassold T, Hall H y Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R203-8.
- Hassold, T. and Hunt, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.*, 2001; 2, 280–291.
- Hodes-Wertz,B., Grifo,J., Ghadir,S. et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil.Steril.*, 2012, 98: 675-680.
- Huang J, Yan L, Lu S, Zhao N and Qiao J. Re-analysis of aneuploidy blastocysts with an inner cell mass and different regional trophectoderm cells. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34:487-493.
- Jacobs, P.A., Melville,M., Ratcliffe,S., Keay,A.J. and Syme,J. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann.Hum.Genet.*, 1974, 37: 359-376.
- Jacobs PA. The chromosome complement of human gametes. *Oxf Rev Reprod Biol*. 1992; 14:47-72.
- Jacobs, P.A., Baikie, A.G., Court Brown, W.M. and Strong, J.A. The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet*, 1959; 1, 710.
- Kahraman,S., Bahce,M., Samli,H. et al. 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.
- Keltz MD, Vega M, Sirota I et al. Preimplantation genetic screening (PGS) with comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages. *J Assisted Reprod Genet* 2013;30(10):1333–9.
- 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.
- Lathi RB, Gray Hazard FK, Heerema-McKenney A, Taylor J y Chueh JT. First trimester miscarriage evaluation. *Semin Reprod Med*. 2011 Nov;29(6):463-9.

- Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A, Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril*. 2005 Nov;84(5):1395-400.
- Machiela et al., Characterization of large structural genetic mosaicism in human autosomes. *Am J Hum Genet*. 2015 Mar 5;96(3):487-97.
- Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod*. 2000 Aug;15(8):1781-6.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Gordts S, Fredericks V, Crippa A. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online*. 2009 Apr;18(4):536-42.
- Mamas T, Gordon A, Brown A, et al. Detection of aneuploidy by array comparative genomic hybridization using cell lines to mimic a mosaic trophoctoderm biopsy. *FertilSteril* 2012;97(4):943-7.
- 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 Jul 5;357(1):9-17.
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F et al. Preimplantation genetic screening: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011; 17:454–66.
- Mateu E, Rodrigo L, Prados N, Gil-Salom M, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. High incidence of chromosomal abnormalities in large-headed and multiple-tailed spermatozoa. *J Androl*. 2006 Jan-Feb;27(1):6-10.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil. Steril*. 2005 Dec;84(6):1628-1636.
- Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohí J, Pellicer A y Simón C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2003 Nov;80(5):1162-8.
- Mercader A., Valbuena D. and Simón C., “Human embryo culture,” *Methods in Enzymology*, 2006, vol. 420, pp. 3–18.
- Milán, M., Cobo,A.C., Rodrigo,L. et al. Redefining advanced maternal age as an indication for preimplantation genetic screening. *Reprod.Biomed.Online*, 2010, 21: 649-657.
- Montag M, Köster M, Strowitzki T, Toth B. Polar body biopsy. *FertSteril* 2013;100(3):603-7.
- Munné 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 Jul-Aug;7(1):91-97.
- Munné 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 Aug;84(2):331-335.
- Munné S, Blazek J, Large M. et al., Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil. Steril*. 2017 Jul;108(1): 62-71.
- Musters AM, Repping S, Korevaar JC et al. Pregnancy outcome after preimplantation genetic screening or natural conception in couples with unexplained recurrent miscarriage: A systematic review of the best available evidence. *Fertil Steril* 2011; 95:2153–7.
- Nagaoka SI, Hassold TJ y Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet*. 2012 Jun 18;13(7):493-504.

- Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 1991 Jun 8;337(8754):1375-1377.
- Nielsen, J. and Wohler, M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum. Genet.*, 1991, 87: 81-83.
- Nybo Andersen, A.M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J. and Melbye, M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ.*, 2000, 320: 1708-1712.
- Obradors A, et al. Whole-chromosome aneuploidy analysis in human oocytes: focus on comparative genomic hybridization. *Cytogenet. Genome Res.* 2011; 133:119–126.
- Pagidas, K., Ying, Y. and Keefe, D. Predictive value of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated IVF-ET cycles among women with recurrent implantation failure. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2008, 25: 103-106.
- Pehlivan, T., Rubio, C., Rodrigo, L. et al. 2003. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod. Biomed. Online.* 6, 232-237.
- PGDIS Newsletter, PGDIS position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage, Chicago, Illinois, July 19, 2016.
- Pujol A, Benet J, Campillo M, Codina-Pascual M, Egozcue J y Navarro J. The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD. *Cytogenet Genome Res.* 2004;105(1):29-35.
- Rai, R. and Regan, L. 2006. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 368, 601-611.
- Rodrigo L., Rubio C., Mateu E., Simon C., Remohí J., Pellicer A. and Gil-Salom M. Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in situ hybridization. *Hum Reprod.* 2004;19: 118–123.
- Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Cobo AC, Peinado V, Milán M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, García-Herrero S, Mir P, Simón C, Rubio C. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res Int.*, 2014: 517125.
- Roizen NJ y Patterson D. Down's syndrome. *Lancet.* 2003 Apr 12;361(9365):1281-9.
- Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendía P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod. Biomed. Online* 2005 Oct;11(4):497-506.
- Rubio, C., Bellver, J., Rodrigo, L. et al. 2013a. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil. Steril.* 99, 1400-1407.
- Rubio, C., Rodrigo, L., Mir, P. et al. 2013b. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil. Steril.* 99, 1044-1048.
- Rubio, C., Giménez, C., Fernández, E. et al. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum. Reprod.* 2009, 24, 2045-2047.
- Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castellón G, Guillén A, Vidal C, Giles J, Ferrando M, Cabanillas S, Remohí J, Pellicer A, Simón C. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril.* 2017 May;107(5):1122-1129.
- Rubio C, Castellón G, Rodrigo L, Bellver J, Guillem A, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Improvement of clinical outcome in severe male factor infertility with embryo selection based on array-CGH: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2014, 102 (Suppl), e24-e25.

- Ruttanajit,T., Chanchamroen,S., Cram,D.S. et al. Detection and quantitation of chromosomal mosaicism in human blastocysts using copy number variation sequencing. *Prenat.Diagn.* 2016, 36, 154-162.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munné S, Katz-Jaffe MG and Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2010 Oct;94(5):1700-6.
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. 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.* 2013a;100(3):697-703.
- Scott R., Upham K, Forman E, Zhao T, Treff N. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 2013b;100:624–30.
- Segawa T, Kuroda T, Kato K, Kuroda M, Omi K, Miyauchi O, Watanabe Y, Okubo T, Osada H, Teramoto S. Cytogenetic analysis of the retained products of conception after missed abortion following blastocyst transfer: a retrospective, largescale, single-centre study. *Reprod Biomed Online.* 2017 Feb;34(2):203-210.
- Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 2004 May 15;363(9421):1633-1641.
- Simón C. To transfer or not transfer...a mosaic embryo, that is the question. *Fertil Steril* 2017 May;107(5):1083-1084.
- Simpson JL. Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient. *Hum. Reprod.* 2008 Jul 9.
- Simpson JL and Rechitsky S. Preimplantation diagnosis and other modern methods for prenatal diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017 Jan;165(Pt A):124-130.
- Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, Sermon K. Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum Mutat.* 2006 May;27(5):496-503.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. 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 Dec;19(12):2849-58
- Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: A case-control study. *Hum Reprod* 2002; 17:446–51.
- Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2012; 27:2297–303.
- Templado C, Vidal F, Estop A. Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet. Genome Res.* 2011; 133:91–99.
- Treff, N. R. et al. 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, 819-824.
- Velilla,E., Escudero,T. and Munné,S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod. Biomed. Online* 2002, 4: 210-217.
- Vera-Rodríguez, M y Rubio, C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 2017a May;107(5):1107-1112.

- Vera-Rodríguez M., Navarro R., Lopez P., et al. Custom NGS algorithm for consistent and accurate diagnosis of mosaicism in trophectoderm biopsies. 16th International Conference on Preimplantation Genetics - PGDIS 2017, Valencia, Spain, 26-29 March, 2017b.
- Verlinsky Y, Cohen J, Munné S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, et al. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil. Steril.* 2004 Aug;82(2):292-294.
- Verlinsky Y, Tur-Kaspa I, Cieslak J. et al. Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients. *Reprod.Biomed.Online*, 2005, 11: 219-225.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M. et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum.Reprod.* 1995, 10: 1923-1927.
- Vidal F, Giménez C, Rubio C, Simón C, Pellicer A, Santaló J y Egozcue J. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet.* 1998 May;15(5):310-3.
- Visootsak J and Graham J. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006,1:42.
- Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 2008; 51:84–95.
- Wells,D., Alfarawati,S. and Fragouli,E. 2008 . Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol.Hum.Reprod.* 14, 703-710.
- Werner,M.D., Leondires,M.P., Schoolcraft,W.B. et al. Clinically recognizable error rate after the transfer of comprehensive chromosomal screened euploid embryos is low. *Fertil.Steril.* 2014, 102: 1613-1618.
- Wilton,L., Voullaire,L., Sargeant,P., Williamson,R. and McBain,J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil.Steril.*, 2003, 80: 860-868.
- Wilton, L., Thornhill, A., Traeger-Synodinos, J., Sermon, KD. and Harper, JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Human Reproduction*, Vol.1, No.1 pp. 1–8, 2009.
- Yang Z, Liu J, Collins GS. et al. 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, 24-8166-5-24.

Glosario de abreviaturas

- AMA: Advanced maternal age
- arrayCGH: array de Hibridación Genómica Comparativa.
- BAC: Bacterial Artificial Chromosome
- DGP: Diagnóstico Genético Preimplantacional
- DGP-A: Diagnóstico Genético Preimplantacional para aneuploidías
- EMA: Edad materna avanzada
- eSET: elective Single embryo transfer
- etc.: etcétera
- FISH: Hibridación in situ Fluorescente
- FIV: Ciclo de Fecundación in vitro
- GWAS: genome-wide association study
- ICSI: intracytoplasmic sperm injection
- NGS: Next Generation Sequencing
- OAT: Oligoastenoteratozoospermia
- PB: Polar Body
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PGDIS: Preimplantation Genetic Diagnosis International Society
- PTP: Previous trisomic pregnancy
- qPCR: Quantitative PCR
- RCT: randomized clinical trials
- RIF: Repetitive implantation failure
- RM: Recurrent miscarriage
- SMF: Severe male factor
- SNP: Single nucleotide polymorphism
- vs.: versus
- WGA: Whole Genome Amplification