



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Importancia del estudio cromosómico de los restos abortivos mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS) y arrays de CGH para un adecuado consejo reproductivo

Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis Doctoral del Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Valencia, junio 2018

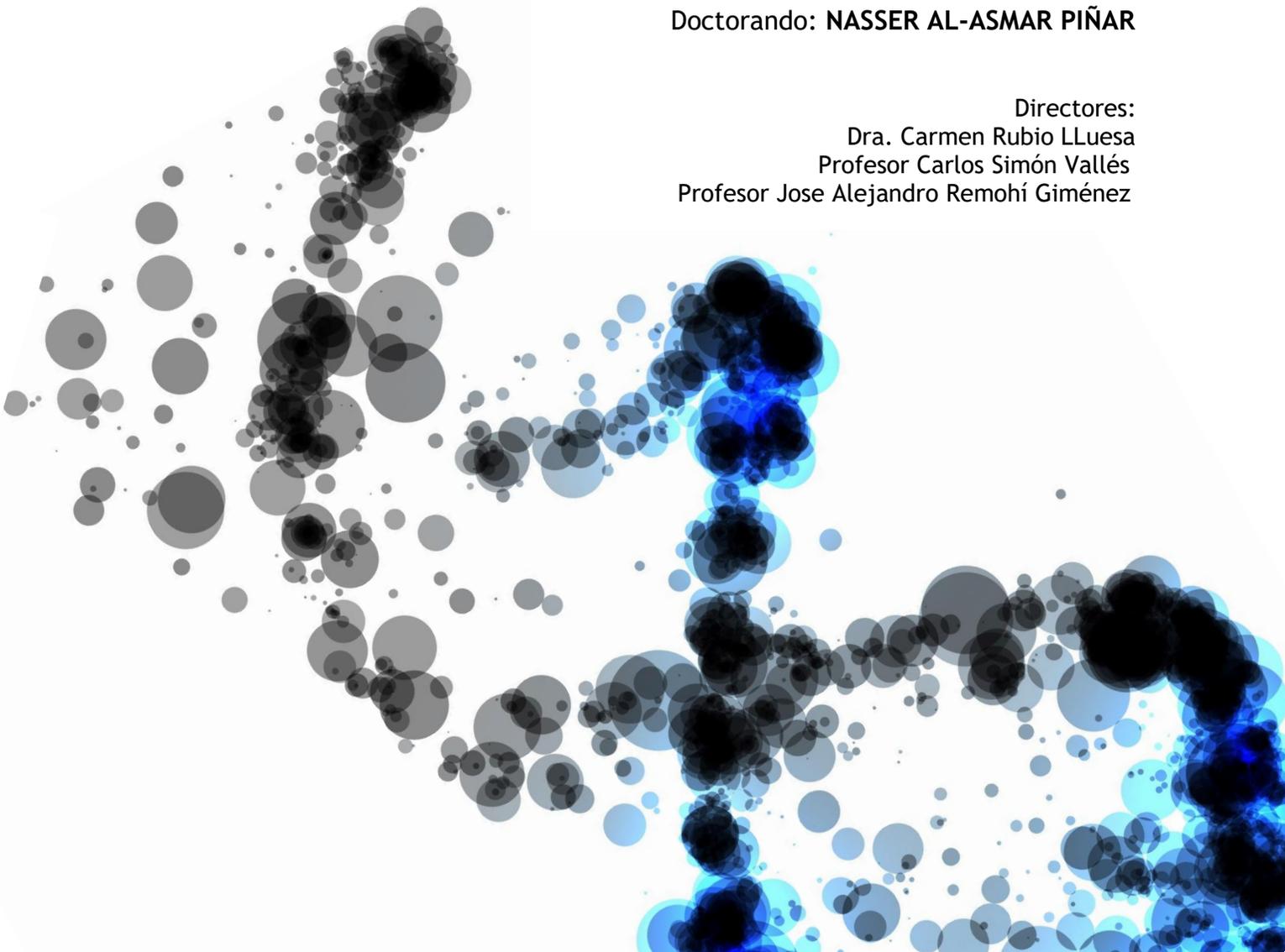
Doctorando: NASSER AL-ASMAR PIÑAR

Directores:

Dra. Carmen Rubio LLuesa

Profesor Carlos Simón Vallés

Profesor Jose Alejandro Remohí Giménez



Importancia del estudio cromosómico de los restos abortivos mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS) y arrays de CGH para un adecuado consejo reproductivo

VNIVERSITAT ID VALÈNCIA



Facultad de Ciencias Biológicas

Tesis Doctoral del Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Doctorando:

Nasser Al-Asmar Piñar

Directores:

Dra. Carmen Rubio Lluesa

Profesor Carlos Simón Vallés

Profesor José Alejandro Remohí Giménez

Valencia, 2018

Dra. Carmen Rubio Lluesa, Doctora en Ciencias Biológicas;

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

Profesor Jose Alejandro Remohí Gimenez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: **“Importancia del estudio cromosómico de los restos abortivos mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS) y arrays de CGH para un adecuado consejo reproductivo”**, ha sido realizado por **D. Nasser Al-Asmar Piñar** 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 25 de Junio de 2018.

Fdo. Dra. Carmen Rubio Lluesa

Fdo. Profesor Carlos Simón Vallés

Fdo. Profesor Jose Alejandro Remohí Giménez

Fdo. Dra. Mercedes Costell Roselló
Tutora

A Raquel, Layla e Imad.

Mi alegría de vivir, de sentir, de soñar, de reír, de jugar, de amar, de llorar.

Mi todo.

De ayer, de hoy, de mañana, eternamente...

Si para alguien es este esfuerzo, sin duda alguna es para vosotros.

Os quiero mucho.

فقط من القلب، يمكنك لمس السماء.

Sólo desde el corazón,
puedes tocar el cielo.

- Rumi -

Importancia del estudio cromosómico de los restos abortivos mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS) y arrays de CGH para un adecuado consejo reproductivo.

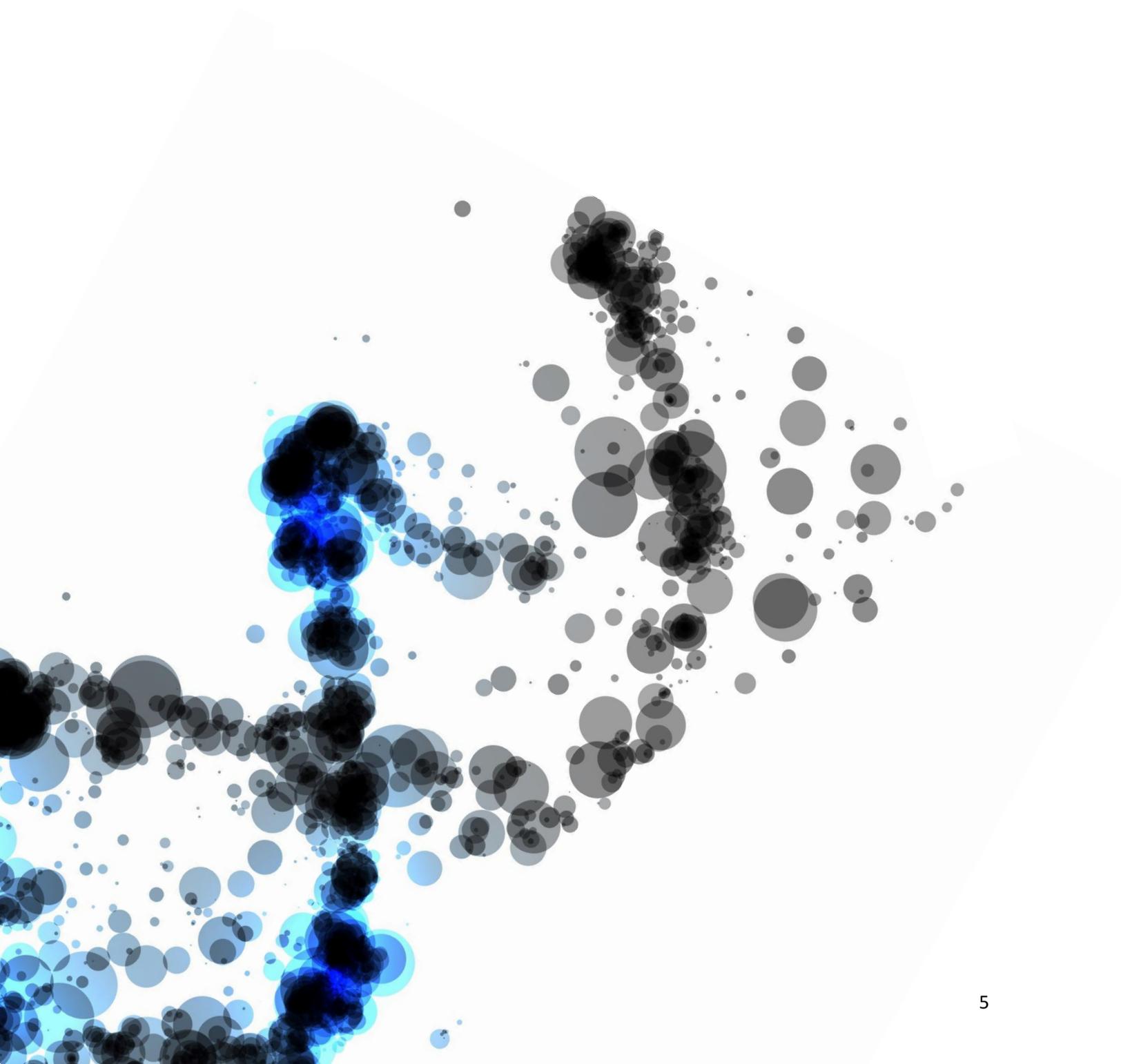
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Definición, incidencia y etiología del aborto espontáneo (AE) y aborto recurrente (AR)	7
Causas genéticas	8
Causas inmunológicas	8
Factores anatómicos.....	9
Causas endocrinológicas	9
Factores hematológicos	9
Infecciones.....	9
Microbioma endometrial	10
Obesidad	10
1.2 Contribución de las anomalías cromosómicas en abortos espontáneos	10
1.3 Incidencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos tras tratamientos de reproducción asistida	13
1.4 Origen y etiología de las anomalías cromosómicas	14
1.4.1 Aneuploidías de cromosomas sexuales.....	14
1.4.2 Trisomías autosómicas	15
1.4.3 Triploidías.....	17
1.4.4 Tetraploidías.....	19
1.5 Indicaciones para realizar estudios en restos abortivos	20
1.5.1 Parejas con aborto recurrente o concepción previa aneuploide.....	20
1.5.2 Parejas infértiles sometidas a TRA	20
1.5.3 Parejas con factor masculino severo.....	20
1.5.4 Parejas con exposición ambiental a disruptores endocrinos.....	21
1.6 Técnicas utilizadas para los análisis de restos abortivos	21
1.6.1 Obtención de tejido fetal	21
1.6.2 Análisis cromosómico	21
Arrays de Hibridación Genómica Comparada (aCGH).....	23
Arrays de polimorfismos de nucleótido único (SNP)	24
NGS (secuenciación masiva).....	24

1.6.3 Importancia de los estudios complementarios para descartar contaminación materna y poliploidías	25
1.7 Hipótesis.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo principal.....	31
2.2 Objetivos secundarios.....	31
3. MATERIAL & MÉTODOS	35
3.1 Diseño del estudio	35
3.2 Recogida, almacenamiento y transporte de muestras	36
3.3 Técnicas utilizadas para el análisis del ADN fetal.....	38
3.3.1 Extracción del ADN	38
3.3.2 Análisis cromosómico del ADN fetal.....	39
3.3.2.1 Protocolo de arrays de CGH	39
Amplificación genómica completa (WGA).....	40
Marcaje del ADN embrionario y control.....	40
Precipitación.....	40
Hibridación.....	41
Lavado	41
Escaneado de arrays de CGH e interpretación de resultados.....	41
3.3.2.2 Protocolo de NGS.....	43
Extracción y amplificación del ADN genómico.....	43
Lisis.....	43
Pre-amplificación.....	43
Amplificación	43
Preparación de las librerías, purificación y cuantificación	44
Combinación	44
Purificación.....	44
Cuantificación y dilución	45
Dilución de la muestra en función de indicaciones del Lab	45
Preparación del ION CHEF.....	45

3.3.2.3 Análisis de STRs.....	46
AmpFLSTR Identifier Plus Kit PCR (amp 16str).....	47
Electroforesis	48
3.3.2.4 Interpretación global de los resultados	49
Normal	49
Anormal.....	49
ADN no detectado.....	49
No informativo.....	49
Contaminación materna.....	49
3.3.2.5 Riesgos y limitaciones del test	50
3.4 Análisis de datos.....	51
4. RESULTADOS	55
4.1 Análisis de los datos según la técnica molecular utilizada	55
4.2 Análisis de los datos por cromosoma	57
4.3 Análisis de los datos por edad materna	60
4.4 Análisis de los datos por edad gestacional	63
4.5 Análisis de los datos por origen de los ovocitos	66
4.6 Análisis de los datos por localización geográfica	68
5. DISCUSIÓN	73
5.1 Discusión de los datos según la técnica molecular utilizada.....	74
5.2 Discusión de los datos según la edad materna.....	76
5.3 Discusión de los datos según la edad gestacional	76
5.4 Discusión de los datos según el origen de los ovocitos.....	77
5.5 Discusión de los datos según la localización geográfica	78
5.6 Limitaciones.....	79
Diseño del estudio	79
Aislamiento de tejido fetal en la colección de muestras	80
Presencia de mosaicismo de bajo grado.....	80
Detección de del/dup por debajo de la resolución de la plataforma	80
5.7 Consejo genético y reproductivo tras la pérdida gestacional.....	81
6. CONCLUSIONES	85

ANEXOS	87
Anexo 1. Solicitud del test de restos abortivos.....	89
Anexo 2. Consentimiento informado	90
BIBLIOGRAFIA	95
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	109
AGRADECIMIENTOS	113

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición, incidencia y etiología del aborto espontáneo (AE) y aborto recurrente (AR).

Se define aborto a toda pérdida gestacional que ocurra antes de que el feto sea viable. Teniendo esto en cuenta, se suele considerar como aborto a las pérdidas durante el embarazo que ocurran antes de la semana 20 o en aquellos fetos cuyo peso sea inferior a 500 g.

En cuanto a su incidencia, algunos estudios han publicado que hasta un 65% de los embarazos humanos terminan con una pérdida subclínica, pasando la mayoría desapercibidas ya que suelen ocurrir antes incluso de que la mujer sepa que está embarazada. La incidencia del aborto clínico espontáneo en la población general es del 15%. La mayoría de ellos (~80%) ocurre antes de la semana 12 de gestación, lo que podría considerarse como una barrera biológica. El 1% de las embarazadas presenta al menos dos abortos previos, y el 0,3% presentan tres o más abortos previos (*Coulam et al., 1986*).

La definición de aborto recurrente o de repetición ha estado en discusión a lo largo de los años, habiendo diferencias entre lo considerado por la escuela europea (Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología, ESHRE) y lo considerado por la escuela americana (Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, ASRM). El concepto de AR ha ido modificándose, lo que hace que estudiar el fenómeno y determinar a qué parejas y cómo aconsejarlas o tratar sea más complicado. Como ejemplos, varias definiciones han incluido:

1. Dos o más embarazos clínicos fallidos según lo documentado por ecografía o examen histopatológico (*Practice Committee of ASRM, 2013*).
2. Tres pérdidas de embarazo consecutivas, que no se requiere que sean intrauterinas (*Jauniaux et al., 2006*).

Actualmente sigue siendo un término controvertido, aunque parece que se ha podido llegar a cierto consenso, y las dos definiciones que se admiten actualmente consideran AR como la pérdida de dos o más embarazos clínicos intrauterinos (*Practice Committee of ASRM, 2013; Guideline of the ESHRE, 2017*).

Las causas más comunes de abortos espontáneos y abortos recurrentes son las siguientes:

1) **Causas genéticas:** Podrían dividirse en genéticas propiamente dichas y cromosómicas. Se sabe que, en alrededor de un 3-5% de los casos de aborto recurrente, existe una anomalía estructural bien sea en los cromosomas maternos o bien en los cromosomas paternos (*Li et al., 2002; ACOG practice Bulletin, 2002; Frannssen et al., 2005*) con el doble de frecuencia en la madre (*Simpson et al., 1981; Porter, 2005*). Las alteraciones más frecuentes son las translocaciones equilibradas o balanceadas (60% recíprocas; 40% Robertsonianas). El riesgo de aborto en parejas con translocaciones recíprocas o Robertsonianas oscila entre el 35 y el 64% (*Sierra and Stephenson, 2006*). Sin embargo, la mayor parte ellas se originan *de novo* en los gametos o en los embriones, por errores meióticos o mitóticos, aumentado en frecuencia conforme lo hace la edad materna (*Fischer et al., 2009*).

2) **Causas inmunológicas:**

- ✓ Autoinmunes: El Síndrome antifosfolípido (SAF) es la única causa no genética que ha demostrado invariablemente, a través de ensayos clínicos prospectivos randomizados, revisiones sistemáticas y metaanálisis, ser origen de abortos recurrentes, pues su tratamiento etiológico reduce drásticamente la probabilidad de un nuevo aborto (*Rai and Regan, 2006*). Se considera responsable de un 10-15% de los casos (*Rai, 2002*).
- ✓ Alloinmunes: Los trastornos aloinmunes se relacionarían con el aborto por el rechazo, por parte de la madre, de los antígenos de origen paterno expresados por el feto (*Rezaei and Dabbagh, 2002; Tang et al., 2011*) pero todavía no está del todo demostrado.

En los últimos años, se ha publicado acerca de la tolerancia materno-fetal como factor para tener en cuenta como una posible causa de aborto. Dicha tolerancia comienza a nivel uterino. La incapacidad de que se produzca de manera correcta el revestimiento uterino a un trofoblasto “invasor” es el defecto principal en los trastornos del embarazo, como el AR. Este proceso está regulado por la interacción entre los receptores tipo inmunoglobulina materno killer (KIR), los cuales son expresados por células Natural Killer uterinas (NKu), y su antígeno leucocitario humano (HLA) C, expresado por el trofoblasto. Los embarazos tienen un mayor riesgo de trastornos en madres con KIR AA cuando el feto tiene HLA-C2 paterno. Un artículo reciente ha indicado que la expresión de más de un

HLA-C paterno por el trofoblasto en técnicas de reproducción asistida (TRA) puede afectar la placentación en madres con KIR AA (*Alecsandru et al., 2017*).

- 3) **Factores anatómicos:** Las alteraciones de la anatomía uterina, congénitas o adquiridas, llevan muchos años relacionándose con el aborto, fundamentalmente de segundo trimestre de embarazo por incompetencia cervical, pero también con un 10-15% de los de primer trimestre (*ACOG practice Bulletin, 2002*). De todas ellas, las que más se han asociado a la pérdida fetal son las anomalías müllerianas, de origen congénito. La más frecuente y de peor pronóstico en lo que se refiere a la reproducción, es el útero septo (*Saravelos et al., 2008; Chan et al., 2011*). Otras posibles son el útero bicorne, unicorno y didelfo, aunque con menor prevalencia (*Lin, 2004; Porter, 2005*).
- 4) **Causas endocrinológicas:** Insuficiencias de cuerpo lúteo, síndrome de ovarios poliquísticos, diabetes mal controlada, alteraciones tiroideas, etc. Todas estas patologías están generalmente aceptadas como origen de AR, incluidas en muchos protocolos de estudio, pero con escasa evidencia científica a su favor. Se trata de causas no demostradas y poco probables (*Karamardian and Grimes, 1992; Clifford et al., 1996; Li et al., 2002*).
- 5) **Factores hematológicos:** Trombofilias no antifosfolípido. Pueden ser adquiridas, como el SAF o algunos casos de resistencia a la proteína C activada (APCR), o congénitas, como los déficits de proteína C o S y de antitrombina III, o mutaciones puntuales de genes implicados en la cascada de la coagulación (*Ozcan and Copel, 2002*). En principio, todas ellas producirían complicaciones gestacionales por su efecto trombogénico.
- 6) **Infecciones:** Hasta hace poco se consideraba como causa de abortos esporádicos, y solamente en la prevención del parto prematuro y de algunos abortos tardíos tendría papel el cribado y tratamiento de la vaginosis bacteriana en el primer trimestre de gestación, en pacientes con historia previa de parto prematuro (*Brocklehurst et al., 2000*). En los últimos tiempos, se ha publicado acerca de la importancia en la evaluación del entorno microbiológico que el embrión encontrará en el momento de la implantación. El estudio microbiológico del endometrio podría ser beneficioso para las pacientes con antecedentes de aborto recurrente y/o fallo de implantación recurrente, ya que la endometritis crónica se ha relacionado con estos eventos (*Moreno et al., 2018*).

- 7) **Microbioma endometrial:** Sabemos que el microbioma humano desempeña un papel importante en nuestra fisiología, tanto en la salud como en la enfermedad, a través de la modulación de funciones esenciales, incluida la reproducción (*Human Microbiome Project Consortium, 2012*). La microbiota endometrial existe, es diferente al de la vagina y se asocia con el resultado reproductivo en pacientes con fallo de implantación y aborto recurrente. La existencia de bacterias que no son *Lactobacillus* en el endometrio tiene un impacto negativo en la función reproductiva y debe considerarse como una causa emergente de fracaso de la implantación y pérdida del embarazo (*Moreno et al., 2016; Moreno and Franasiak, 2017*).

- 8) **Obesidad:** Existen publicaciones en las que se han encontrado diferencias significativas en las tasas de aborto cuando se estudian pacientes con $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, cuyas tasas fueron de un 38,1%, frente a pacientes con normo peso (13,3%) (*Bellver et al., 2003*). Este mismo grupo realizó un estudio del análisis cromosómico comparando a pacientes con peso normal ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$) y pacientes con sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) analizando sus restos abortivos, y no vieron diferencia significativa entre ambos grupos. Eso sí, comentaban que para determinar el riesgo real de abortos espontáneos cromosómicamente anormales en mujeres con un IMC elevado, se deben realizar más estudios utilizando otros rangos de peso corporal, como obesidad clase I ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$), II ($\geq 35 \text{ kg/m}^2$), o III ($\geq 40 \text{ kg/m}^2$), y controlando todos los posibles factores de confusión (*Bellver et al., 2011*).

A pesar de conocerse multitud de factores etiológicos, algunos abortos siguen siendo de causa desconocida.

1.2 Contribución de las anomalías cromosómicas en abortos espontáneos.

Los estudios realizados en los años 60 y 70 ya demostraron que una pequeña proporción de recién nacidos presentaban anomalías cromosómicas, numéricas o estructurales, con un impacto clínico muy relevante. De hecho, en una revisión de estudios en más de 50.000 nacidos, Hook y Hamerton (*Hook and Hamerton, 1977*) describieron anomalías en aproximadamente 1/200 individuos siendo las más comunes las trisomías para los cromosomas sexuales (47,XXX, 47,XXY y 47,XYY) y la trisomía 21. Estudios similares en material de restos abortivos tardíos (por ejemplo, de muerte perinatal) indicaron un nivel mucho mayor de anomalías cromosómicas, pero en general, el tipo de anomalías fue el mismo que en los identificados en las series de recién nacidos (*Bauld et al., 1974*). Estos resultados hicieron que los investigadores se preguntaran si en las pérdidas gestacionales ocurridas entre las semanas 6-8 y la 20 de embarazo, podrían deberse también a anomalías cromosómicas.

Como ya se ha mencionado, los AE se presentan con una incidencia ~15% en la población general y su frecuencia es similar en parejas infértiles que se someten a tratamientos de fecundación “*in vitro*” (FIV). Un porcentaje muy elevado de AE se producen por la presencia de anomalías cromosómicas y los estudios clásicos de citogenética en abortos, revelan una incidencia de anomalías cromosómicas que oscila entre el 50% y 70% de los casos. La mayor parte de las trisomías dan lugar a pérdidas fetales intraútero o muerte perinatal y son pocas las que sobrepasan este periodo. Por estos motivos, y por lo comentado en el párrafo anterior, la incidencia de anomalías cromosómicas en AE es 10 veces superior a la observada en mortinatos y ésta a su vez, es 10 veces superior a la que se encuentra en recién nacidos vivos, con sólo un 0,6% de anomalías cromosómicas viables (Machín, 1974; Nielsen and Sillesen, 1975; Boué and Boué, 1976).

Las anomalías cromosómicas observadas en AE son principalmente anomalías numéricas, aproximadamente el 95% del total de anomalías. En la mayoría de estos casos, los padres tienen cariotipo normal y entre las anomalías más frecuentes destacan las trisomías autosómicas (60,4%) y las poliploidías (15,7%), seguidas por la monosomía para el cromosoma X (10,8%), siendo esta la alteración cromosómica que de forma individual se presenta con mayor frecuencia en las pérdidas gestacionales del primer trimestre (revisado por Soler et al., 2017).

A continuación, se muestra una tabla resumen (Tabla 1) sobre la frecuencia relativa de los distintos tipos de anomalías cromosómicas:

Estudio	Trisomía única	Monosomía X	Triploidía	Tetraploidía	Aneuploidía múltiple	Anomalía estructural
Eiben et al., 1990	60,3	10,5	12,4	4,5	1,8	4,8
Menasha et al., 2005	66	9	10,6	1,6	6,1	4,2
Shearer et al., 2011	58,4	14,2	12,1	3	2,8	7,3
Jenderny et al., 2014	47	7,6	13,1	3,8	4,6	4,2
Wang et al., 2014	66	13	14	4	NR	2
Soler et al., 2017	64,9	10,7	13,1	1,4	4,5	5,2

Tabla 1. Frecuencia relativa de los distintos tipos de anomalías cromosómicas. Todos los valores están dados en porcentaje. NR: No reportado. Adaptado de Soler et al., 2017.

Se han identificado trisomías para todos los cromosomas, aunque algunas (por ejemplo, las trisomías 1 y 19) son extremadamente raras. Por el contrario, otras trisomías son bastante comunes. La trisomía 16 es la trisomía más comúnmente identificada y, junto con las trisomías 15, 21 y 22, representan más de la mitad de todas las trisomías individuales. Es importante destacar que estos resultados están en consonancia con estudios preimplantacionales realizados en embriones humanos tras embarazos a través de TRA. Por ejemplo, al igual que en los AE, los cromosomas 15-22 tienen más probabilidades de ser aneuploides que los cromosomas más grandes (*Fragouli et al., 2013; Franasiak et al., 2014*). Por lo tanto, aunque parece claro que existe una selección que elimina una gran cantidad de embriones aneuploides entre el momento de la concepción y el momento del reconocimiento clínico de embarazo, también parece probable que ciertos cromosomas sean más propensos que otros a sufrir una mala segregación meiótica.

Además de las anomalías cromosómicas, existen dos clases de poliploidías que son comunes en los AE: las triploidías, que representan el 12,6% de los casos y las tetraploidías, que se producen en el 3,1% de los AE (*Revisado por Soler et al., 2017*). Sorprendentemente, las anomalías estructurales que son casi tan comunes como las anomalías numéricas en las series de recién nacidos estudiadas (*Hook and Hamerton, 1977*), son poco comunes en AE, representando solo el 4,6% de los casos reportados en la *Tabla 1*. Además, la aplicación actual de los estudios moleculares de restos abortivos que deberían permitir identificar anomalías estructurales más sutiles (mayor poder de resolución), no parece haber aumentado sustancialmente la frecuencia de tales anomalías en los AE (*Levy et al., 2014*).

	AE (Hassold et al., 1996) (n= 4.088)	AR (Stephenson et al., 2002) (n= 420)
% Monosomía X	8,6	4,3
% Trisomías Autosómicas	26,8	30,9
Trisomía 13	1,1	2,6
Trisomía 15	1,7	5,2
Trisomía 16	7,5	4,5
Trisomía 18	1,1	0,9
Trisomía 21	2,3	2,6
Trisomía 22	2,7	3,8
% Trisomías Sexuales	0,3	0,5
% Poliploidías	9,8	8,8
% Anomalías estructurales	2	1,9

Tabla 2: Anomalías cromosómicas en abortos espontáneos y abortos de repetición.

1.3 Incidencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos tras tratamientos de reproducción asistida.

Se han realizado varios estudios que han encontrado que los pacientes sometidos a TRA presentan tasas más altas de restos abortivos cromosómicamente anormales en comparación con los controles de la misma edad (*Campana et al., 1986*). Algunos estudios han informado tasas de anomalías cromosómicas en restos abortivos de pacientes infértiles que varían entre el 63% y el 76%, valores que serían superiores al 50% estimado para la población general (*Werner et al., 2012*).

No solo las anomalías cromosómicas son más elevadas en la población infértil sometida a TRA, sino que el porcentaje y tipo de aneuploidías varían dependiendo del tipo de TRA utilizado (*Martínez et al., 2010*). Se ha demostrado un mayor porcentaje de anomalías cromosómicas en AE tras inseminación intrauterina (IUI) en comparación con los procedentes de FIV, que todavía es inferior cuando procede de un programa de donación de ovocitos (*Martínez et al., 2010*). Así mismo, los tipos de anomalías cromosómicas son diferentes entre la población general y las pacientes infértiles, donde la monosomía X se duplicó, mientras que la poliploidía presentó el doble de incidencia en el grupo de embarazo espontáneo comparado con el que recibió TRA (*Figura 1*).

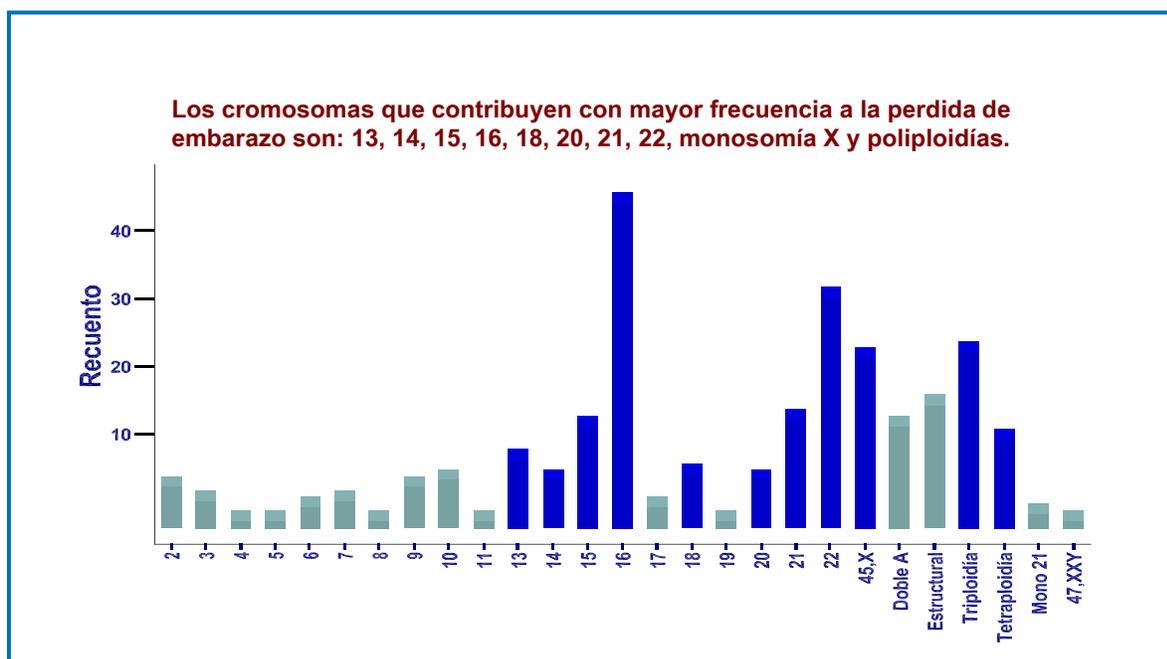


Figura 1: Distribución de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos. $n=676$ (*Martínez et al., 2010*). Doble A: Doble aneuploidía.

1.4 Origen y etiología de las anomalías cromosómicas.

Para muchos de los trastornos genéticos humanos, la baja frecuencia de las anomalías complica los intentos de estudiar directamente el origen de la mutación o mutaciones subyacentes. En su lugar, es necesario realizar estudios alternativos, como por ejemplo análisis *in vitro* o recreación en modelos animales. Sin embargo, este no es el caso para las anomalías cromosómicas numéricas. Por razones que todavía desconocemos, las tasas de aneuploidías numéricas en humanos tienen un orden de magnitud superior a otras especies de mamíferos que han sido ampliamente estudiados, por lo que se dispone de una gran cantidad de material para el estudio. Dada la gran incidencia y variedad de estas anomalías en fetos abortados espontáneamente, los AE han sido especialmente útiles para la investigación del origen de las aneuploidías.

1.4.1 Aneuploidías de cromosomas sexuales.

Para las trisomías de los cromosomas sexuales (47,XXX, 47,XXY y 47,XYY) el origen reside en un elevado porcentaje en la no-disyunción durante la meiosis paterna o en las divisiones post-cigóticas (*Jacobs and Hassold, 1995*). Para el caso concreto de la trisomía 47,XXY es tan probable que sea de origen paterno como materno (*Hassold et al., 1991*).

En las monosomías 45,X solo es posible determinar el origen parental (paterno o materno) del cromosoma X que está disponible y, por exclusión, el origen parental del cromosoma sexual que falta. En las monosomías X, el origen del cromosoma X presente es normalmente de origen materno (80% de los casos), lo que implica errores en la meiosis paterna dando lugar a espermatozoides nulisómicos para los cromosomas sexuales (*Chandley, 1981*) (ver tabla 3). Los análisis de anomalías cromosómicas en espermatozoides de varones infértiles han descrito una mayor incidencia de espermatozoides con anomalías cromosómicas para los cromosomas sexuales, especialmente en varones con bajo recuento espermático y con azoospermia secretora (*Rodrigo et al., 2010, 2014*).

Mientras podemos obtener información del origen parental de la monosomía de los cromosomas sexuales, la ausencia del cromosoma "erróneo" nos impide estudiar el mecanismo o la etapa de origen del error. No obstante, la elevada frecuencia de la condición 45,X en comparación con las trisomías de cromosomas sexuales, que como decíamos, se cree que se originan a partir de errores en la no disyunción meiótica (*Skuse et al., 1997*), sugieren que los 45,X surgen de un mecanismo diferente. La pérdida aleatoria de un cromosoma sexual, presumiblemente en una división meiótica temprana, es una posibilidad atractiva ya que esto generaría un aparente sesgo hacia los casos de origen materno, lo que explicaría dicho fenómeno. Es decir, asumiendo una misma probabilidad de perder en estadio temprano el cromosoma X

o Y en embriones 46,XX y 46,XY, deberíamos esperar el generar embriones 45,Y (presuntamente muertes tempranas) y embriones 45,X cuyos 2/3 serían portadores de un solo cromosoma X de origen materno.

1.4.2 Trisomías autosómicas.

El origen de las trisomías autosómicas es principalmente materno y sólo entre 5-10% son de origen paterno. En el caso de la trisomía 16, se ha observado un origen materno en el 100% de los casos. Las trisomías autosómicas de origen materno están frecuentemente asociadas a errores en meiosis I, excepto la trisomía 18 donde predominan los errores en meiosis II (*revisado por Nicolaidis and Petersen, 1998*).

En la mayor parte de los casos los progenitores presentan cariotipos normales lo que sugiere que se trata de anomalías cromosómicas “*de novo*”. Se supone que la anomalía ha surgido como un evento esporádico en la gametogénesis, siendo la meiosis I materna el estadio más vulnerable. De los estudios de abortos trisómicos se concluye que detrás de estas no-disyunciones está más bien el azar que una predisposición biológica individual. Sin embargo, estudios realizados en ovocitos de pacientes de FIV han mostrado un 26% de aneuploidías, y esta cifra se eleva hasta un 50% en pacientes de edad avanzada (*Gianaroli et al., 1999*). *Sandalinas y colaboradores (Sandalinas et al., 2002)*, utilizando la técnica de SKY (“spectral karyotyping”), obtuvieron resultados similares, con un 29% de ovocitos aneuploides procedentes de mujeres menores de 35 años y un 56% de ovocitos aneuploides en mujeres mayores de 35 años. Por otro lado, los estudios en espermatozoides han demostrado que varones con problemas de fertilidad presentan un incremento de anomalías cromosómicas numéricas no sólo para los cromosomas sexuales, sino también para algunos autosomas (*Rubio et al., 2001; Rodrigo et al., 2014*). También se ha descrito el fenómeno de división prematura del centrómero en algunas familias con historia de abortos espontáneos e infertilidad. En estos casos, se ha sugerido que las anomalías en los centrómeros podrían dar lugar a un mayor riesgo de inestabilidad cromosómica (*Bajnóczy and Gardó, 1993*). Se han propuesto diferentes mecanismos sobre la génesis de las aneuploidías como son la presencia de mutaciones en genes relacionados con los procesos fundamentales de la meiosis como son sinapsis y recombinación. Estos estudios han encontrado un incremento de este tipo de mutaciones en mujeres con aborto de repetición (*Bolor et al., 2009*) y en varones infértiles (*Sato et al., 2006*).

	% Origen Materno	% Origen Paterno	% Origen Post-cigótico
Trisomía 13	88	12	-
Trisomía 16	100	-	-
Trisomía 18	89	-	11
Trisomía 21	88	8	3
Trisomía 22	97	3	-
Trisomía XXX	76	6	18
Trisomía XXY	51	46	3
Trisomía XYY	-	60	40
Monosomía X	20	80	-

Tabla 3: Origen parental de las aneuploidías (Jacobs and Hassold, 1995; Nicolaidis and Petersen, 1998; Hassold and Hunt, 2001 y Hassold and Hunt, 2007).

De entre todas las trisomías, la mayor parte de los estudios se ha centrado en la trisomía del cromosoma 21. La mayoría de las trisomías 21 conllevan errores en la meiosis I materna. Por ejemplo, en el mayor estudio publicado por Sherman y colaboradores (Sherman *et al.*, 2006), se describió que aproximadamente el 90% de los casos eran de origen materno, con el 70% de ellos atribuibles a errores en la meiosis I, y el resto a errores en la meiosis II (Middlebrooks *et al.*, 2014). Dentro de la meiosis, la recombinación anormal es un contribuyente importante a la trisomía 21 por alguno de los siguientes motivos: a) Fallo en la recombinación con errores en meiosis I materna; b) Entrecruzamientos extremadamente distales con errores en meiosis I materna; c) Entrecruzamientos extremadamente proximales con errores aparentes en meiosis II materna.

La recombinación meiótica en mujeres ocurre en el ovario fetal, por lo que una proporción de los ovocitos humanos están ya predispuestos a una mala segregación desde el inicio de la meiosis en el ovario fetal, dentro del útero materno. Sin embargo, la relación entre estas combinaciones de factores de riesgo y el otro único factor conocido para la trisomía 21 (la edad materna avanzada) sigue sin estar claro. Oliver y colaboradores (Oliver *et al.*, 2014) publicaron un incremento en entrecruzamientos a nivel telomérico en meiosis I en casos de pacientes jóvenes, un incremento en recombinación pericentromérica en meiosis II en casos de pacientes de mayor edad, y una asociación lineal no clara entre la edad materna y los casos de fallo de recombinación. Así, el efecto de la recombinación en la trisomía es complejo,

presumiblemente reflejando el hecho de que existen múltiples rutas edad materna-dependientes e independientes para la trisomía 21.



Figura 2: Cariotipo de resto abortivo de sexo masculino con anomalía cromosómica. Trisomía en el cromosoma 22.

Dada la complejidad de los errores relacionados con el cromosoma 21, quizás no sorprenda que otras trisomías exhiban similitudes y diferencias. Por ejemplo, al igual que ocurre en la trisomía 21, los errores meióticos maternos predominan para la mayoría de las trisomías, y se han observado errores en la recombinación (especialmente la ausencia de entrecruzamientos) para todas las trisomías que han sido debidamente estudiadas (*Lamb, 2005*). Sin embargo, existen diferencias entre cromosomas. Por ejemplo, la trisomía 18 típicamente implica errores maternos en la meiosis II, no en meiosis I (*Bugge et al., 1998*). La trisomía 16, la más común de las trisomías, está asociada a entrecruzamientos más distales y teloméricos, pero raramente, si es que ocurre alguna vez, con fallos en la recombinación (*Hassold et al., 1995*).

1.4.3 Triploidías.

La triploidía es el tercer tipo de anomalía más frecuente en abortos espontáneos. La mayor parte de las triploidías son de origen paterno (*Zaragoza et al., 2000; Egozcue et al., 2002*), debido a la fecundación de un ovocito por más de un espermatozoide o también por la fecundación de un ovocito por un espermatozoide diploide, más frecuentes en varones oligozoospermicos (*Egozcue et al., 2002*). La

diploidía no es tan frecuente en ovocitos, ya que las alteraciones del huso meiótico resultan fundamentalmente en aneuploidías (*Eichenlaub-Ritter et al., 1999*), aunque se ha descrito un aumento en la proporción de ovocitos diploides a medida que aumenta la edad materna (*Roberts and O'Neill, 1995*). El origen de las triploidías en abortos de reproducción asistida es distinto en la mayor parte de los casos, ya que en los casos de ICSI se ha descrito la no extrusión del segundo corpúsculo polar como el origen más frecuente (*Grossmann et al., 1999*).



Figura 3: Cariotipo de resto abortivo. Triploidía, 69, XXX.

La triploidía puede ser el resultado de una contribución diploide del padre (diandria), bien sea a partir de la fecundación por dos espermatozoides (dispermia) o por un espermatozoide diploide. Alternativamente, la triploidía puede ser de origen materno (diginia) debido al fallo de una de las dos divisiones meióticas. Análisis de polimorfismos en el ADN indicaron que la dispermia es el más común de los orígenes, con más de dos tercios de los casos (*Zaragoza et al., 2000; Joergensen et al; 2014*). De los restantes casos de origen materno, los errores en la meiosis II parecen ser la fuente más común del set haploide adicional (*McFadden and Langlois, 2000*), aunque también se han descrito errores en la meiosis I y la fusión de dos ovocitos (*Hassold et al., 1991*).

A diferencia de la mayoría de las otras anomalías numéricas, el origen parental de la triploidía tiene un profundo efecto sobre el fenotipo. Específicamente, los triploides diándricos abortan normalmente entre las semanas 10-20 de gestación, con un desarrollo limitado de estructuras fetales pero un buen desarrollo de las membranas y vellosidades extraembrionarias (*Pflueger, 1999*). De hecho, los triploides diándricos a menudo se diagnostican como molas hidatiformes parciales (*Szulman and Surti, 1978*). Por el contrario,

parece haber dos categorías generales de triploides de origen materno. La categoría más común aborta muy temprano en el embarazo. Pero un subconjunto de casos se asocia con un buen desarrollo fetal y con un aborto tardío en la gestación; de hecho, se cree que la proporción extremadamente pequeña de casos de triploidía que sobreviven a término es de origen materno. Por lo tanto, la triploidía proporciona un ejemplo importante de la existencia de impronta génica para determinados loci, aunque no se conoce la contribución fenotípica de loci específicos.

1.4.4 Tetraploidías.

Existen muy pocos trabajos centrados en el origen de la tetraploidía. Sin embargo, prácticamente todos los abortos espontáneos tetraploides tienen cariotipos 92,XXYY (ver figura 4) o 92,XXXX, lo que podría explicarse como una dotación cromosómica doble de ovocitos fecundados 46,XY o 46,XX.

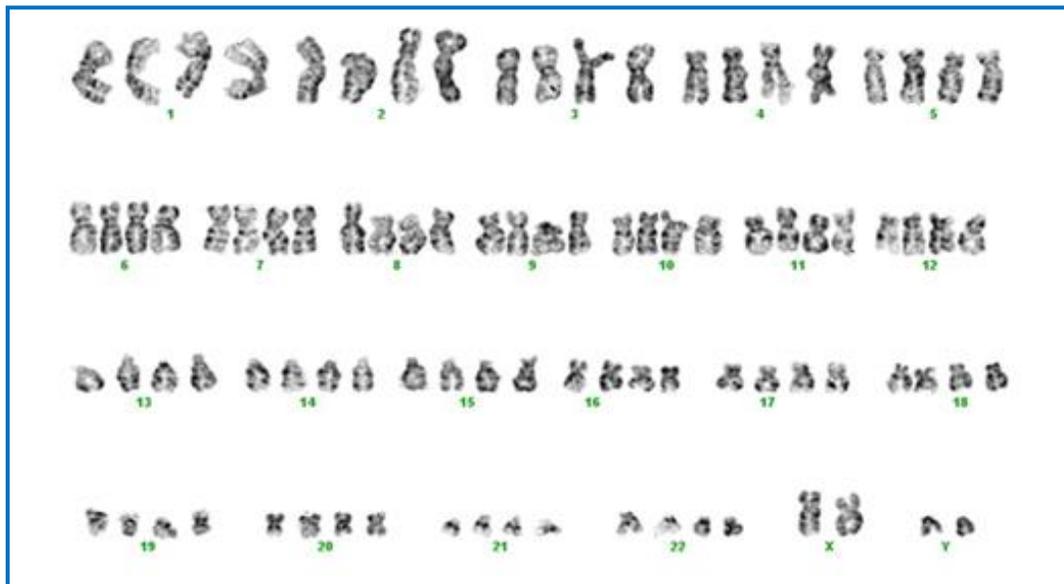


Figura 4: Cariotipo de resto abortivo. Tetraploidía, 92, XXYY.

Diferentes estudios con marcadores polimórficos han mostrado la presencia de dos conjuntos duplicados de cromosomas (*Kajii and Niikawa, 1977*). Por lo tanto, parece probable que la mayoría de los tetraploides surjan de un fallo de los cromosomas al dividirse en la primera división o en una división celular embrionaria muy temprana.

1.5 Indicaciones para realizar estudios en restos abortivos.

La recomendación sería realizar los estudios en aquellas parejas que experimentan abortos espontáneos recurrentes, así como en los pacientes infértiles sometidos a TRA, si bien sería útil analizar todo aborto involuntario que se produzca.

1.5.1 Parejas con aborto recurrente o concepción previa aneuploide.

Varios estudios han demostrado que en las parejas con abortos recurrentes o concepciones aneuploides debido a los cromosomas sexuales o a los autosomas, aumenta el riesgo posterior de aneuploidía fetal. Las mujeres que han tenido un embarazo trisómico previo, particularmente aquellas menores de 35 años parecen estar en mayor riesgo de embarazos trisómicos subsecuentes. El riesgo relativo de trisomía 21 posterior a la misma trisomía es mayor para las mujeres menores de 35 años en el embarazo anterior (*Warburton et al., 2004; Al-Asmar et al., 2012*). Las tasas de implantación y embarazo disminuyeron y las tasas de aborto espontáneo aumentaron a medida que el número de abortos espontáneos previos fue mayor (*Rubio et al., 2009*).

1.5.2 Parejas infértiles sometidas a TRA.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en la población general el AE representa no menos del 15-20% de todos los embarazos clínicamente reconocidos durante el primer trimestre. La incidencia de anomalías cromosómicas en la pérdida espontánea del embarazo es aproximadamente del 50% (*Hassold, 1980*) y esta incidencia puede aumentar en parejas infértiles, debido sobre todo a la edad materna avanzada y el factor masculino severo.

1.5.3 Parejas con factor masculino severo.

Campos-Galindo y colaboradores publicaron en 2015 (*Campos-Galindo et al., 2015*) que las parejas de TRA con ovocitos propios en los que el varón tenía una concentración de espermatozoides inferior a 5 millones/ml tenían como resultado en sus estudios de restos abortivos el 75% con anomalías cromosómicas. Aquellos con una concentración superior a 5 millones/ml produjeron el 51% de los resultados anormales. Los hombres con oligoastenozoospermia, baja motilidad y/o altas concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH) muestran anormalidades sinápticas frecuentes que conducen a la producción de espermatozoides aneuploides y/o diploides. El riesgo de aborto recurrente aumenta por la presencia de anormalidades cromosómicas en los espermatozoides (*Rubio et al., 2001; Egozcue et al., 2002*). Esto significa que el factor masculino debe considerarse como un factor importante después de un aborto espontáneo.

1.5.4 Parejas con exposición ambiental a disruptores endocrinos.

Muchos compuestos químicos conocidos como disruptores endocrinos químicos (EDC), tienen influencia en el sistema endocrino de animales y humanos. Se sospecha que existe un vínculo entre la exposición a los EDC y el aborto espontáneo, pero los resultados son limitados (*Lathi et al., 2014*). La exposición ambiental a los metales se ha asociado con la pérdida del embarazo. Aun así, la literatura científica existente sobre este tema sigue siendo controvertida (*Ajayi et al., 2012; Rahman et al., 2016; Buck et al., 2017*). Hay una serie de estudios que sugieren la relación entre la exposición a bisfenol A (BPA) y el aborto u otros resultados prenatales adversos (*Lathi et al., 2014; Mikotajewska et al., 2015; Li et al., 2016*). Hunt et al. demostraron que la exposición diaria a dosis orales de BPA causa aneuploidía meiótica en hembras de ratón (*Hunt et al., 2003*). En varones, un estudio de Vrooman y colaboradores sugieren en sus resultados que una breve exposición estrogénica exógena puede causar cambios sutiles en el conjunto de las células madre que producen alteraciones permanentes en la espermatogénesis (es decir, recombinación reducida en meiocitos) en el varón adulto (*Vrooman et al., 2015*).

Por lo tanto, en parejas con exposición conocida a disruptores endocrinos, podría estar indicado el análisis cromosómico de los restos abortivos.

1.6 Técnicas utilizadas para los análisis de restos abortivos.

1.6.1 Obtención de tejido fetal.

Una vez que se ha producido la pérdida gestacional, si es posible se recupera una muestra de tejido fetal por métodos quirúrgicos, como el legrado o la histeroscopia-legrado. Estos métodos presentan siempre riesgo de contaminación con células maternas debido a la mezcla del tejido materno y fetal durante el procedimiento. En algunos estudios se ha descrito la posibilidad de realizar histeroembrioscopia y posterior biopsia dirigida que permite la biopsia directa y selectiva de embriones y corion, lo que disminuye la probabilidad de contaminación materna y evita el riesgo de un diagnóstico erróneo (*Ferro et al., 2003*). Sin embargo, la histeroembrioscopia requiere un especialista en la tecnología y se trata de un procedimiento quirúrgico que implica mayor coste y recuperación para la paciente. Es por ello por lo que este enfoque no es una práctica habitual en el campo obstétrico.

1.6.2 Análisis cromosómico.

Los estudios citogenéticos clásicos de análisis de restos abortivos se realizaban mediante cultivo y tinción con bandas G para obtener cariotipos con diferente resolución. La mayor parte de los datos de incidencia de anomalías cromosómicas en restos abortivos se han obtenido con esta técnica. Sin embargo, presenta serias limitaciones, ya que en un porcentaje que según los distintos estudios varían entre el 10 y el 60% el tejido fetal no crece adecuadamente o la calidad de las metafases no es la óptima para obtener un

cariotipo de resolución adecuada (*Fritz et al., 2001; Shah et al., 2017*). Pero este no es el único problema, los estudios citogenéticos no pueden distinguir entre un resultado femenino normal que proviene del feto y un resultado femenino normal debido a contaminación materna. También hay un alto porcentaje de pruebas no informativas debido a la posible degradación del tejido haciendo un cariotipo estándar.

Los métodos moleculares son más robustos y no requieren un cultivo celular previo, evitando la posibilidad de fallo de este y aumentando por tanto la tasa de resultados informativos. Así mismo, con las técnicas moleculares, la calidad del tejido aun habiendo transcurrido varios días desde la detención del embarazo no representa ningún problema, y se reduce el tiempo de análisis al no requerir cultivo y se pueden obtener resultados en un tiempo mucho menor que con el cariotipo convencional. Finalmente, los estudios moleculares permiten mejorar la resolución en la mayor parte de los casos pudiendo identificar desequilibrios mayores de 5-6 Mb. Hay que indicar que las técnicas moleculares no permitirían en la mayoría de los casos la identificación de anomalías cromosómicas equilibradas.

CARIOTIPO CONVENCIONAL	ESTUDIOS MOLECULARES
Requiere de cultivo celular in vitro	No requiere de cultivo celular in vitro
42% de los test realizados no son informativos debido a la degradación del tejido	Se obtienen resultados en más de un 98,6% de los casos
33,3% de falsos negativos debido a la contaminación materna	Descarta falsos negativos causados por la contaminación materna
Resultados en 3-4 semanas	Resultados en 1 semana
Análisis de baja resolución	Mayor resolución que el cariotipo convencional

Tabla 4: Comparación entre cariotipo convencional vs. análisis molecular (*Ferro et al., 2003; Martínez et al., 2010; Campos-Galindo et al., 2012*).

Desde 2008, se han utilizado diferentes técnicas moleculares como parte de un enfoque de diagnóstico robusto y preciso para evaluar las aneuploidías de cualquiera de los 24 cromosomas: los 22 autosomas y los cromosomas sexuales (*Rodrigo et al., 2014*). Se han aplicado técnicas tales como Arrays de Hibridación Genómica Comparada (aCGH) cromosómico, secuenciación masiva (NGS), Bacs on beads (BOBs), hibridación in situ fluorescente (FISH), amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA) y reacción cuantitativa de cadena de polimerasa fluorescente (QF-PCR) (*Rubio et al., 2005; Campos-Galindo et al., 2012; Rubio et al., 2013; Vera-Rodríguez et al., 2016*).

Entre las técnicas mencionadas anteriormente, algunas de ellas sólo son capaces de analizar un panel limitado de cromosomas, como los BOBs o la FISH. Sin embargo, otras de las técnicas son capaces de analizar todos y cada uno de los 24 cromosomas.

A continuación, se describen las técnicas más comúnmente utilizadas para el análisis de los 23 pares cromosómicos:

✓ **Arrays de Hibridación Genómica Comparada (aCGH).**

Para realizar un análisis de CGH, primero se debe realizar una extracción de ADN de los tejidos del resto abortivo. Una pequeña porción de tejido se dilacera mecánicamente usando una hoja de bisturí. Luego, se realiza la extracción de ADN seguido del marcaje de las muestras de ADN de los restos abortivos y el ADN de control con fluoróforos Cy3 y Cy5. Las mezclas bien etiquetadas pueden combinarse e hibridarse durante 6-12 horas en plataformas comerciales tales como arrays 24sure BAC (Cromosoma Artificial Bacteriano, Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Cada sonda es específica de una región cromosómica diferente y ocupa un lugar determinado en el portaobjetos. Los diferentes puntos se distribuyen con 1Mb de distancia. Las pérdidas o ganancias cromosómicas se revelan por el color adoptado por cada punto después de la hibridación. La intensidad de fluorescencia se detecta usando un escáner con láser y un software específico (Rodrigo *et al.*, 2014) (Figura 5). Varios estudios que usaron el aCGH para realizar análisis en restos abortivos han demostrado una mayor capacidad de diagnóstico en comparación con las pruebas citogenéticas clásicas (Robberecht, 2009). En el estudio de Shah y colaboradores, la tasa de resultados satisfactorios fue del 85%. Cuando al estudio mediante aCGH se le sumaban los análisis de STRs (Short Tandem Repeats), dichos resultados mejorarían para llegar al 92%. El tiempo que lleva dicha técnica para proporcionar resultados está en torno a una semana, más rápido en comparación con la citogenética clásica que está entre tres semanas y un mes (Shah *et al.*, 2017).



Figura 5: Imagen de restos abortivos analizados con un ADN control masculino mediante aCGH. Resultado anormal masculino, trisomía cromosoma 21.

✓ **Arrays de polimorfismos de nucleótido único (SNP).**

Para realizar el array de SNP, la muestra de tejido se lava con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separa de la sangre y la decidua materna mediante técnicas estandarizadas. A continuación, el tejido se lava de nuevo en PBS estéril y se disecciona en muestras de vellosidades/fetales del tamaño de unos 3 mm³ y se colocan en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Luego, se extrae el ADN de las vellosidades y la muestra de sangre materna utilizando un kit de ácido nucleico circulante QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN purificado se analiza en microarrays de Illumina Cyto 12 SNP mediante un protocolo estándar (*Lathi et al., 2014*). En el estudio comentado anteriormente de Shah y colaboradores, la tasa de resultados satisfactorios fue del 93%, muy similar a la conseguida con los aCGH + STRs. Igualmente, el tiempo de resultados fue similar al de los aCGH con gran ventaja frente al cariotipo convencional (*Shah et al., 2017*).

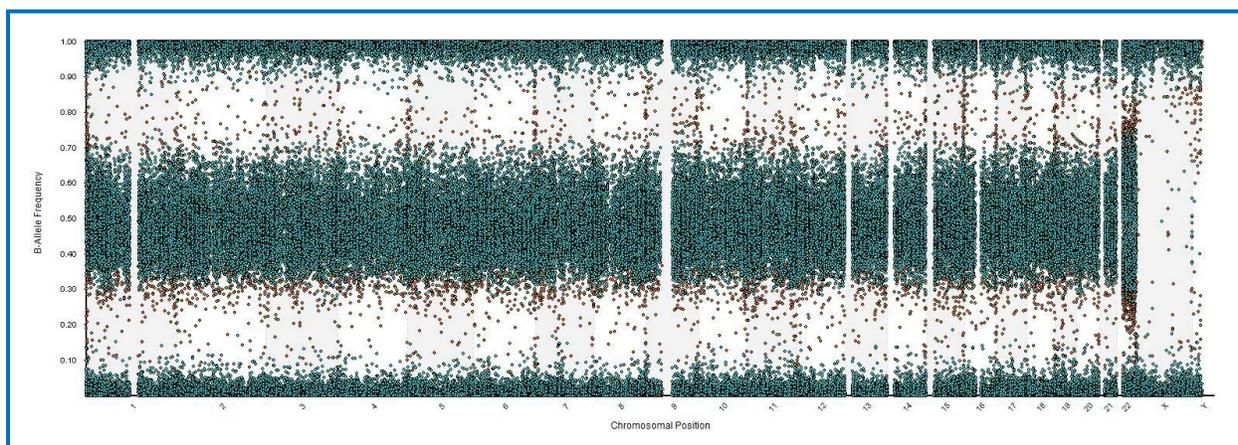


Figura 6: Imagen de restos abortivos analizados mediante SNPs array. Resultado anormal masculino, trisomía cromosoma 22. Cortesía del Dr. Antonio Capalbo y Laura Girardi.

✓ **NGS (secuenciación masiva).**

Esta es la tecnología más innovadora en este momento. Existen diferentes plataformas comerciales que tienen un kit desarrollado para detección de aneuploidías, mosaicismo y aneuploidías segmentales o parciales. Dicha técnica ha sido aplicada ampliamente en estudios de PGT-A (Técnica de screening genético para aneuploidías) (*Fiorentino et al., 2014; Vera et al., 2016*).

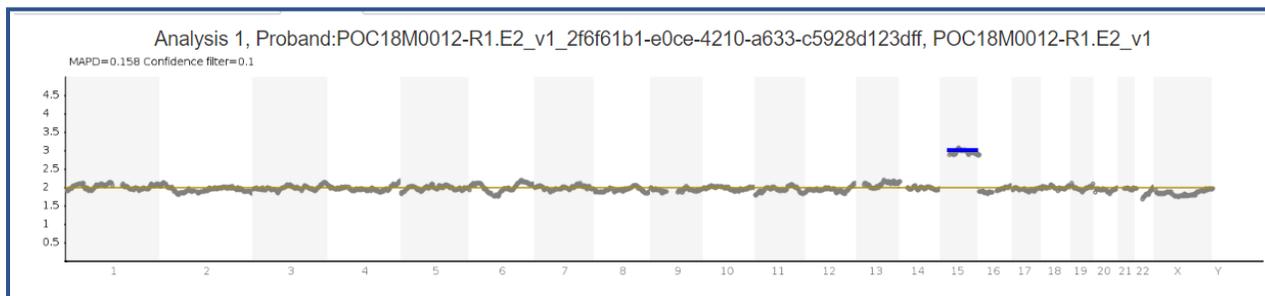


Figura 7: Imagen de restos abortivos analizados mediante NGS. Resultado anormal femenino, trisomía cromosoma 15.

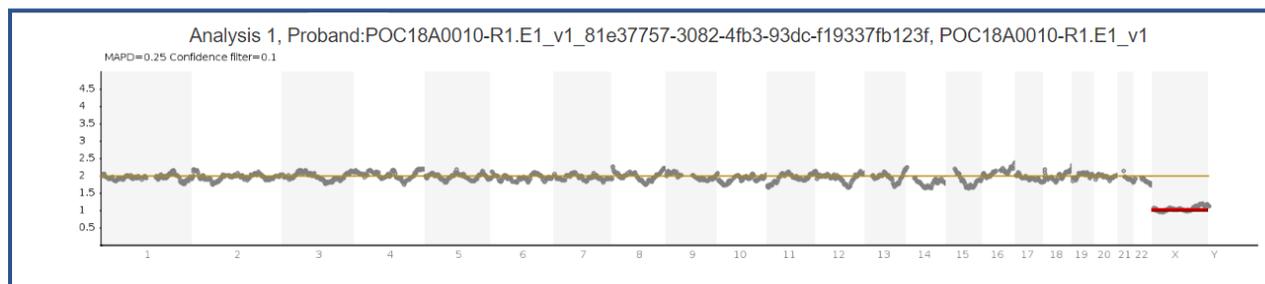


Figura 8: Imagen de restos abortivos analizados mediante NGS. Resultado anormal, monosomía 45,X.

1.6.3 Importancia de los estudios complementarios para descartar contaminación materna y poliploidías.

La contaminación materna es una de las principales fuentes de diagnóstico erróneo o resultados no informativos cuando se analizan los restos abortivos. Un estudio retrospectivo mostró que más de la mitad de los resultados normales de 46, XX en los especímenes de aborto espontáneo se debieron a contaminación materna (Lathi *et al.*, 2014). Errores como este pueden conducir a diagnósticos erróneos y/o asesoramiento inapropiado. Tener un resultado preciso es la única forma en la que el médico y el equipo médico pueden brindar un asesoramiento reproductivo adecuado a la pareja cuando ocurre una pérdida gestacional después de un embarazo natural o tras técnicas de reproducción asistida. Para descartar contaminación materna, se pueden realizar estudios paralelos a lo que sería el análisis cromosómico propiamente dicho. Uno de ellos sería el análisis mediante Short Tandem Repeats (STRs).

Esta técnica molecular utiliza 15 STRs más el gen de la amelogenina (que comparten los cromosomas X e Y) y nos ayuda a comparar loci específicos del ADN materno extraído en sangre periférica de la mujer frente a loci específicos del ADN extraído de los restos fetales. Así podemos saber si una muestra proviene de la madre o del feto. Si es tejido materno, sabemos que no podremos ir al análisis cromosómico ya que el mismo nos daría un falso negativo como resultado, el cual sería normal femenino. Si nos indica que no hay contaminación materna, ya podemos hacer el análisis cromosómico con toda tranquilidad. Aunque

el resultado final fuera normal femenino, sabríamos que dicho resultado viene del feto y no de la madre. Otra ventaja que ofrecen los STRs, es que nos indican si el embarazo se detuvo por una poliploidía (triploidía, tetraploidía...) que como veíamos anteriormente, es la causa del aproximadamente 15% de los abortos del primer trimestre (Hassold et al., 1996; Soler et al., 2017).

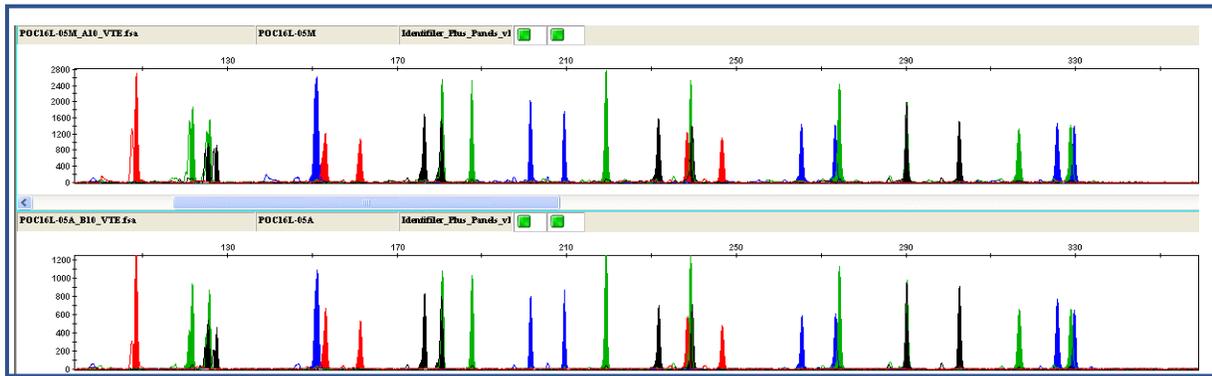


Figura 9: Contaminación materna. En la parte superior se puede ver el ADN de la madre. En la parte inferior ADN fetal. Todos los picos o alelos coinciden entre madre y feto. Esto quiere decir que la muestra que se supone que es feto no lo es, sino que realmente es ADN que proviene de la madre, lo que lleva a un resultado de contaminación materna.

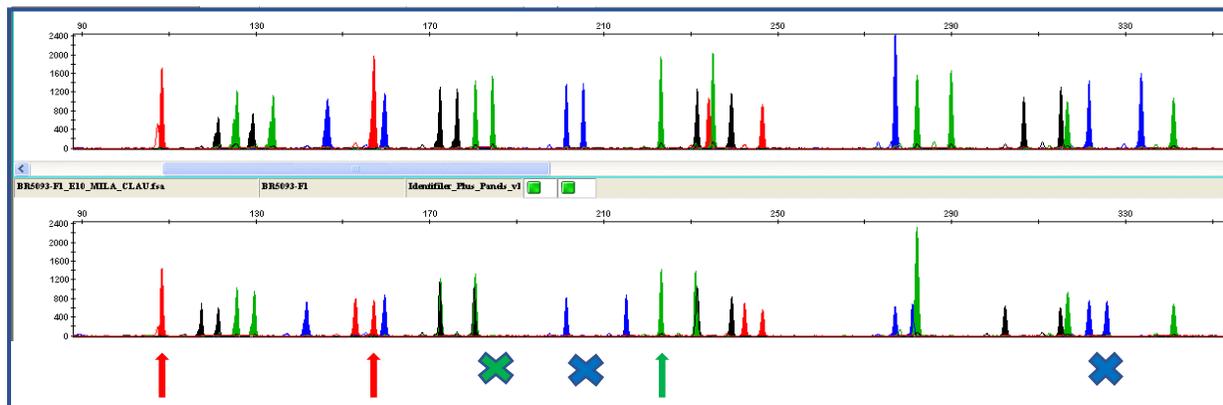


Figura 10: Ausencia de Contaminación Materna. En la parte superior se puede ver el ADN de la madre. En la parte inferior el ADN fetal. Algunos de los alelos coinciden entre madre y feto, están tanto en la parte superior como en la inferior (flechas). Algunos de los alelos están presentes en la madre, pero no en el feto, están en la parte superior pero no en la inferior (cruces). Esto quiere decir que lo que se supone que es ADN fetal lo es, y que no hay contaminación. La muestra será catalogada como normal o anormal después de llevar a cabo el estudio de aneuploidías.

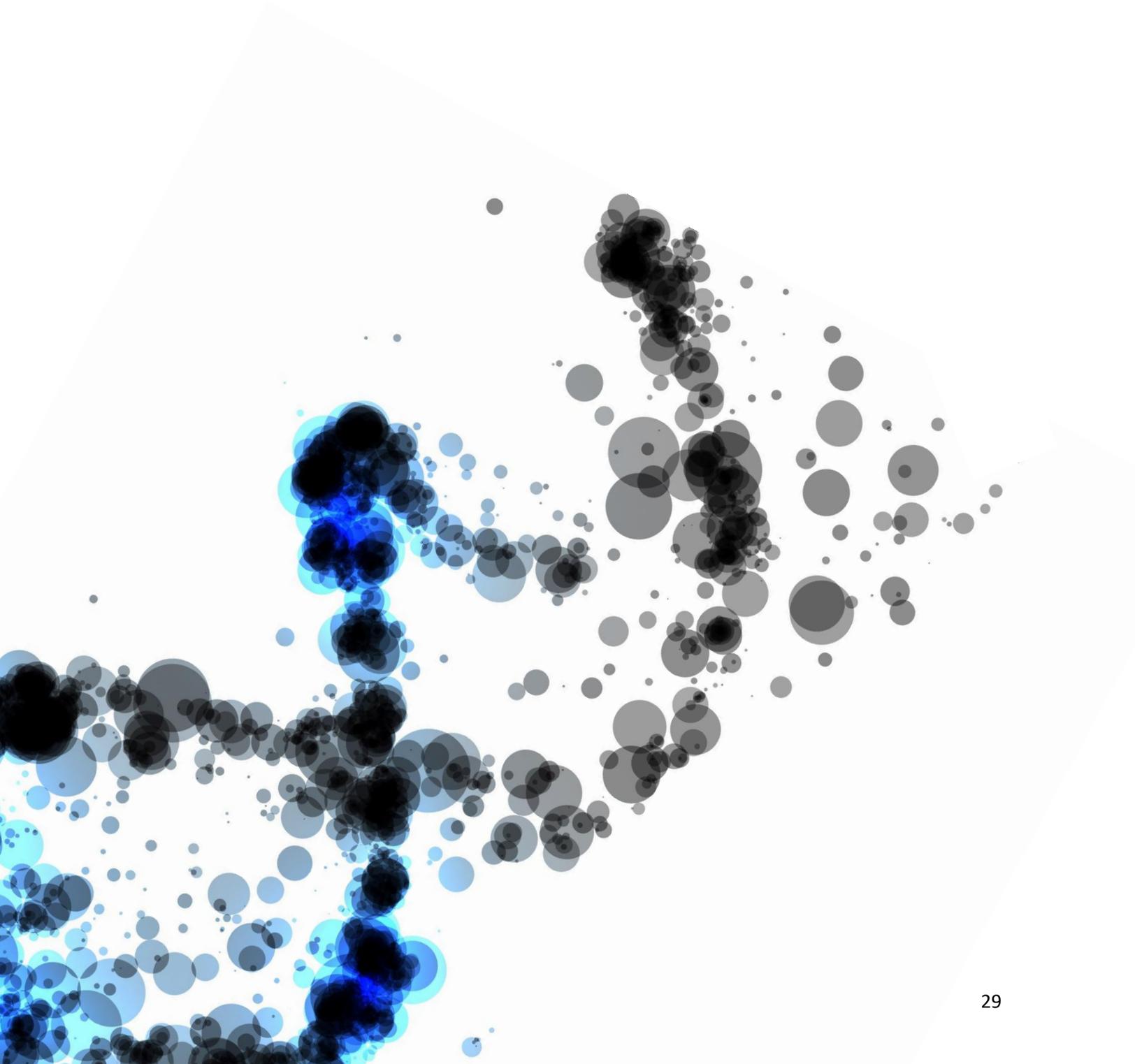
1.7 Hipótesis.

Nuestra hipótesis consiste en que con el análisis molecular de los restos abortivos vamos a aumentar el número de casos en los que se obtienen resultados, al no requerir cultivo de tejido previo al análisis.

Por otro lado, el análisis complementario con STRs y su comparación con el perfil genómico de la madre nos va a permitir aumentar la sensibilidad de la técnica, detectando los casos de falsos negativos con resultado femenino normal.

Consideramos que no deberían existir diferencias en los resultados obtenidos con aCGH y con NGS, ya que en ambas técnicas se utilizan protocolos de extracción de ADN similares, y la resolución de las plataformas utilizadas para cada una de las técnicas fue similar.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal:

Determinar el valor de las técnicas moleculares de array de CGH y NGS para el análisis del ADN en restos abortivos con el objetivo de aumentar la eficiencia en la detección de anomalías cromosómicas fetales en los abortos espontáneos.

2.2 Objetivos secundarios:

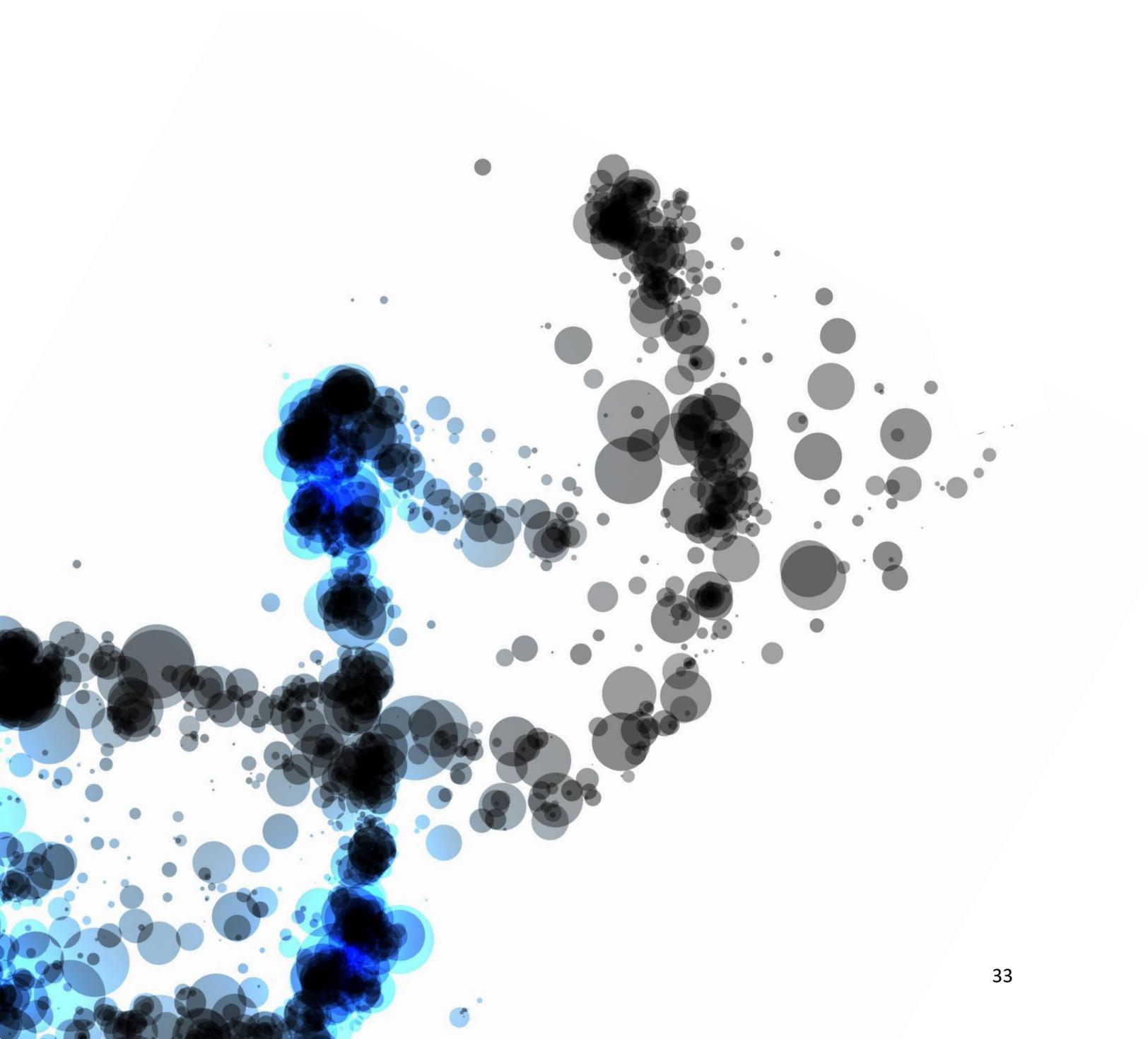
2.2.1 Evaluar el efecto de la edad materna en la incidencia de anomalías cromosómicas, tanto en general como por tipos de alteraciones cromosómicas como trisomías, monosomías o poliploidías.

2.2.2 Analizar el efecto de la edad gestacional en las incidencias de anomalías cromosómicas y en las tasas de contaminación materna obtenidas.

2.2.3 Comparar los resultados en función del origen de los ovocitos, con ovocitos propios frente a casos con donación de óvulos.

2.2.4 Valorar las diferencias en la incidencia de aneuploidías y en la informatividad en función de la localización geográfica.

MATERIAL & MÉTODOS



3. Material & Métodos.

3.1 Diseño del estudio.

Estudio prospectivo observacional que comprende las muestras de restos fetales analizadas durante el periodo de tiempo que comprendió entre enero de 2014 hasta diciembre de 2017, ambos meses incluidos. En total se estudiaron 2.531 muestras de restos abortivos, y las muestras se analizaron mediante las técnicas de array de CGH (n = 675) entre enero de 2014 y diciembre de 2015 y NGS (n = 1.856) entre enero de 2016 y diciembre de 2017.

Todas las muestras fueron analizadas en los laboratorios de Igenomix (España, USA/Canadá, Brasil, México/Latam, EAU e India).

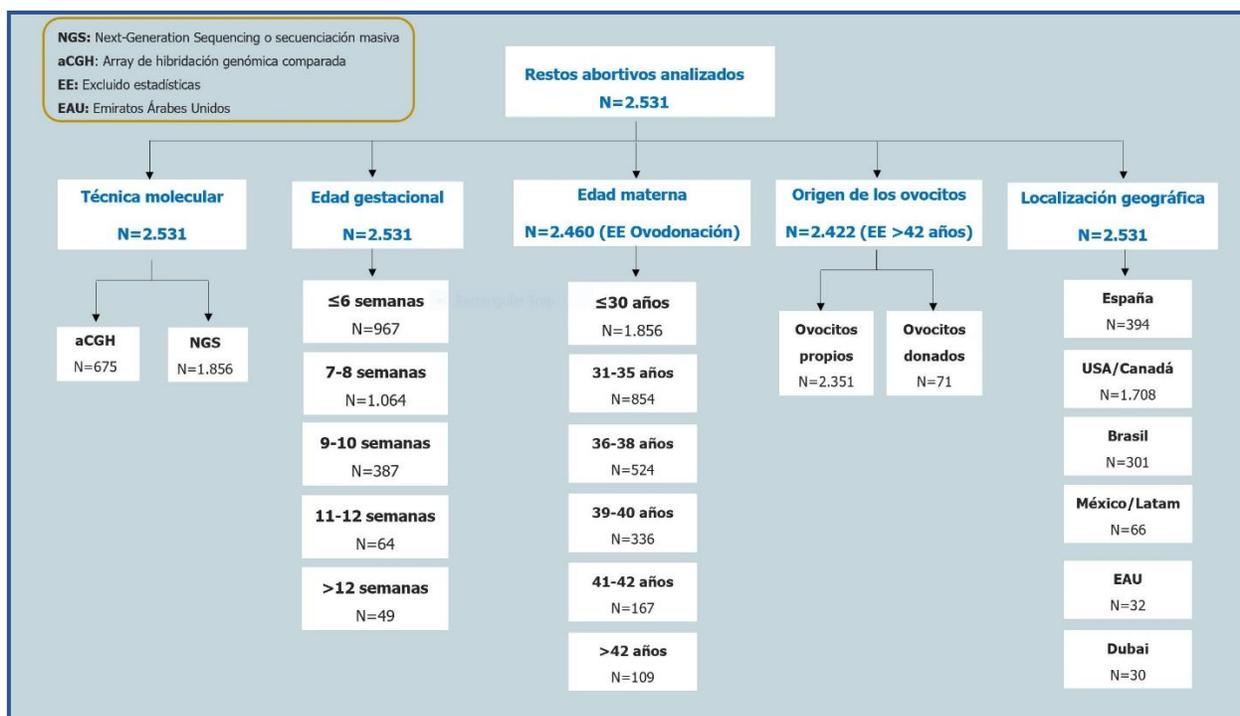


Figura 11: Diseño del estudio.

3.2 Recogida, almacenamiento y transporte de muestras.

Para realizar el estudio de restos abortivos, se suministra a las clínicas con un kit de recogida que lleva lo siguiente:

- Un tubo EDTA para la extracción de 3-4 ml aproximadamente de sangre materna. La comparación del ADN materno y del ADN fetal nos permite detectar la presencia de contaminación celular materna y posibles poliploidías y con ello ofrecer un diagnóstico más certero de la dotación cromosómica fetal.
- Un frasco para la recogida de restos fetales (legrado convencional).
- Bolsa biohazard para depositar en su interior los tubos de recogida de las muestras de sangre y restos fetales.

Los tipos de tejidos que se analizaron podrían provenir de:

- Saco gestacional vacío.
- Abortos diferidos con más de 2 a 4 semanas.
- Restos fetales expulsados espontáneamente y recogidos en casa (aunque se prefieren muestras obtenidas tras legrado o histeroembrioscopia).
- Restos fetales de gestaciones múltiples. En estos casos es indispensable utilizar kits independientes para cada feto con una sola muestra de sangre materna.
- Muestras recogidas en cualquier momento de la gestación.

Las instrucciones para la recogida de muestra de manera correcta fueron las siguientes:

1. Tomar una muestra de tejido de tamaño mínimo 3x3 mm. Es preferible una muestra pequeña pero limpia, sin sangre, antes que una muestra de mayor tamaño.
2. Retirar de la muestra de tejido los coágulos grandes de sangre.
3. Usar una solución salina estéril para lavar los tejidos.
4. A continuación colocar el tejido en el frasco con suficiente solución salina como para cubrir la muestra.

5. Asegurarse de extraer sangre de la madre antes o después del procedimiento de D&C, y que la sangre se extraiga en el tubo EDTA para evitar su coagulación.
6. Sellar todos los tubos o frascos con cinta adhesiva tipo parafilm o esparadrapo.
7. Identificar todos los tubos mediante etiqueta adhesiva o rotulación. Identificar la muestra con nombre completo del paciente + fecha de nacimiento.

Documentos que se solicitaron a los pacientes para realizar el estudio:

- Solicitud del test de restos abortivos. Complimentar correctamente (Anexo 1).
- Consentimiento: se requiere la firma del paciente o la de su pareja (Anexo 2).

Instrucciones para el envío de los restos abortivos para el análisis.

Colocar en el interior del kit de restos abortivos lo siguiente:

- El tubo o frasco con la muestra de restos abortivos correctamente cerrado y sellado, dentro de la bolsa Biohazard disponible para ello.
- El tubo de sangre materna en el interior de la misma bolsa Biohazard referida anteriormente.
- La solicitud de restos abortivos cumplimentada, el consentimiento informado firmado.

Tomar como referencia la imagen adjunta donde se muestra el aspecto de las vellosidades de la decidua en un tejido limpio (ver imagen a) y el aspecto de una muestra hemática (ver imagen b). En un tejido recogido en buenas condiciones, la decidua parece rosa, es densa, y con aspecto de hoja. Las vellosidades cuando se enjuagan bien tienen tendencia a flotar y con un aspecto más blanco y con plumas en comparación con la decidua.

a) Muestra de tejido fetal sin restos de tejido o sangre materna.



b) Muestra de tejido fetal con restos de sangre materna.

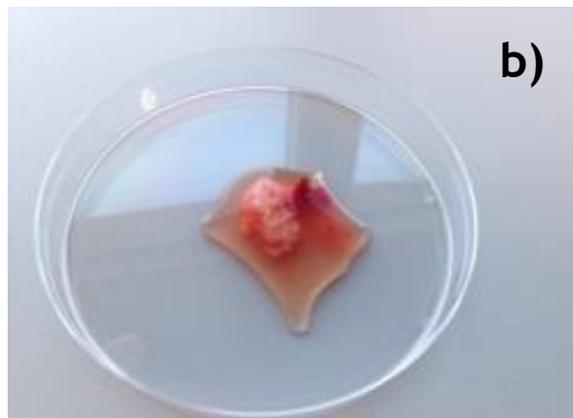




Figura 12. Muestra de resto abortivo previa a la dilaceración.

3.3 Técnicas utilizadas para el análisis del ADN fetal.

3.3.1 Extracción del ADN.

El protocolo de extracción de ADN se realizó utilizando el Kit comercial de Qiagen (Hilden, Alemania), como se detalla a continuación:

Previo al inicio del mismo se procedió a encender el termobloque a 70°C.
Se dilaceró el tejido en placa Petri con bisturí. Se llevó a Eppendorf de 1,5 ml.
Añadir 80 µl de ddH ₂ O. Vortex.
Añadir 100 µl de Buffer ATL. Vortex.
Añadir 20 µl de PROTEINASA K.
Añadir 200 µl de BUFFER AL. Vortex. Spin.
Incubar a 70°C, 30', 850 rpm. Spin. No deben quedar restos de tejido. Si los hay, aumentar el tiempo.
Añadir 200 µl de ETANOL 100%. Vortex. Spin.
Pasar por columna (blanca) (Vol. Max 700 µl). Reusar tantas veces la columna como sea necesario.
Centrifugar a 6000g, 1'. Eliminar eluido.
Añadir 500 µl BUFFER AW1. 6000g, 1'. Eliminar eluido.
Añadir 500 µl BUFFER AW2. 20000g (14100g), 3'. Eliminar eluido.
Cambiar tubo colector.
Centrifugar a 20000g (14100g), 1'.

Llevar columna a Eppendorf de 1,5 ml.
Añadir 60 µl de BUFFER AE . No tocar la columna.
Incubar 5´ a R.T. (tubo cerrado).
Centrifugar 6000g, 3´.
Descartar la columna.
Cuantificar DNA. Para blanco usar BUFFER AE .
Rotular Eppendorf: NHC-TEJIDO [ADN]

3.3.2 Análisis cromosómico del ADN fetal.

3.3.2.1 Protocolo de arrays de CGH.

Tras la recepción de los tubos eppendorf de 0,2 µl con las blastómeras, en el laboratorio de genética se comienza con una etapa de amplificación que se realiza en condiciones de esterilidad y en una campana de flujo laminar. A continuación, se detallan las diferentes etapas del protocolo de arrays de CGH para el estudio de los 23 pares de cromosomas utilizando la plataforma 24sure (Illumina, CA, USA).

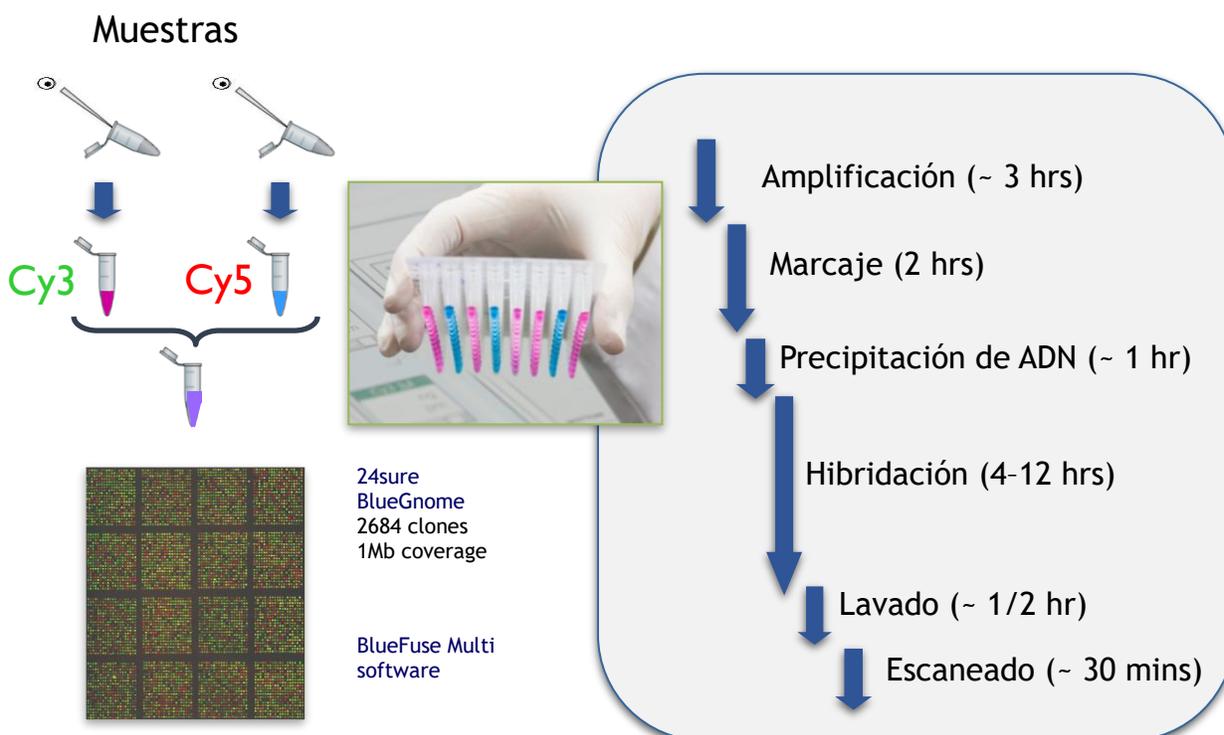


Figura 13: Esquema del protocolo de arrays de CGH para el estudio de aneuploidías de 23 pares de cromosomas.

· Amplificación genómica completa (WGA):

Consta de una fase de lisis en la que se añaden 3 µl de Cell Extraction Buffer en el tubo de PCR con la muestra a amplificar y 5 µl de un mix compuesto por 4,8 µl de Dilution buffer y 0,2 µl de Extraction Enzyme. Se llevan los tubos al termociclador con el programa de termociclado proporcionado por la casa comercial. Seguidamente, se realiza una pre-amplificación en la que se añade a cada tubo 5 µl del mix compuesto por 4,8 µl de Pre-amplification Buffer y 0,2 µl de Pre-amplification Enzyme. Se llevan los tubos al termociclador con el programa de pre-amplificación establecido por la casa comercial. Por último, se realiza la amplificación, en la que se añade a cada tubo 60 µl del mix compuesto por 34,2 µl de H₂O (Nuclease-free water), 25 µl de Amplification Buffer y 0,8 µl de Amplification Enzyme. Se introducen los tubos en el termociclador con el programa de temperaturas de amplificación establecido por la casa comercial (todos los reactivos provienen del Kit de amplificación, Sureplex (Illumina, CA, USA). Se realiza una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia/ausencia de amplicones.

· Marcaje del ADN embrionario y control:

En una placa de 96 pocillos se dispensan 5 µl de Primer Solution. A continuación, se añaden 8 µl de ADN amplificado de cada muestra destinando 2 pocillos al control masculino SureRef male reference (Illumina, CA, USA) y 2 pocillos al control femenino SureRef female reference (Illumina, CA, USA). Se introducen los tubos en el termociclador y se desnaturaliza el ADN a 94°C durante 5 minutos. Posteriormente, se extraen los tubos del termociclador y se pasan inmediatamente a una gradilla refrigerada a 4°C durante 5 minutos. Seguidamente, se preparan dos tubos eppendorf de 1,5 ml, uno para el mix con el fluorocromo Cyanine 3 (Cy3) y otro para el mix con Cyanine 5 (Cy5). En ambos tubos se añaden 5 µl de Reaction Buffer por muestra/control, 5 µl de dCTP mix por muestra/control y 1 µl de enzima de marcaje Klenow por muestra/control. A uno de los tubos se le añade 1 µl del fluoróforo Cy3 dCTP por muestra/control y al otro 1 µl del fluoróforo Cy5 dCTP por muestra/control. Se dispensan 12 µl del mix con Cy3 a las filas impares de la placa de 96 pocillos y 12 µl del mix con Cy5 a las filas pares de la placa de 96 pocillos. Esta placa se lleva al termociclador y durante 2 horas a 37°C se marcará el ADN amplificado (Kit Labelling System, Illumina, CA, USA).

· Precipitación:

Finalizado el marcaje, se extrae la placa del termociclador. Se dispensan 25 µl de COT Human DNA. Se combina el contenido de la primera fila de la placa marcada con Cy3 con la segunda fila de la placa marcada con Cy5, la tercera con la cuarta, y así sucesivamente. Se lleva a cabo la precipitación del ADN mediante centrifugación en vacío a 75°C durante 1 hora (Genevac, Ipswich, UK) (Kit de precipitación, Illumina, CA, USA).

· Hibridación:

Se añaden 21 μ l de tampón de hibridación (Illumina, CA, USA) atemperado a 75°C y se desnaturaliza el ADN precipitado en un termobloque Hybex (SciGene, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) a 75°C durante 10 minutos. Tras dejar enfriar, y en la campana de extracción de gases, se añaden 18 μ l de cada muestra a un cubreobjetos de 22x22 mm, y se monta sobre el área de hibridación del array. Los arrays se incuban toda la noche en una cámara de hibridación que contiene una solución de SSC y formamida (Roche, IN, Estados Unidos) y se hibridan incubando estas cámaras en un baño térmico a 47°C.

· Lavado:

En campana de extracción de gases, se sacan los arrays de la cámara de hibridación y se elimina el cubreobjetos por deslizamiento humedeciéndolos con una solución de 2xSSC/0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA). Sin dejar secar, se lavan en agitación a 850 rpm y temperatura ambiente en 2xSSC/0,05% Tween20 (10 min) y 1xSSC (10 min) en 0,1xSSC a 60°C (5 min) y finalmente en 0,1xSSC a temperatura ambiente (1 min). Finalmente, se secan los arrays centrifugándolos 3 minutos a 180 rcf y se almacenan a temperatura ambiente hasta su lectura.

· Escaneado de arrays de CGH e interpretación de resultados:

La lectura de los arrays de CGH se realiza con un scanner (Powerscanner, TECAN, Männedorf, Switzerland) equipado con láser de dos canales, un canal verde (532 nm) para la excitación y la lectura de la señal Cy3 y un canal rojo (635 nm) para la excitación y lectura de la señal Cy5. Las imágenes .TIFF generadas por el scanner se analizan con un programa informático BlueFuse (Illumina, CA, USA), que genera gráficas de las que se infiere visualmente la ganancia (trisomía) o pérdida (monosomía) de cromosoma/s concreto/s.

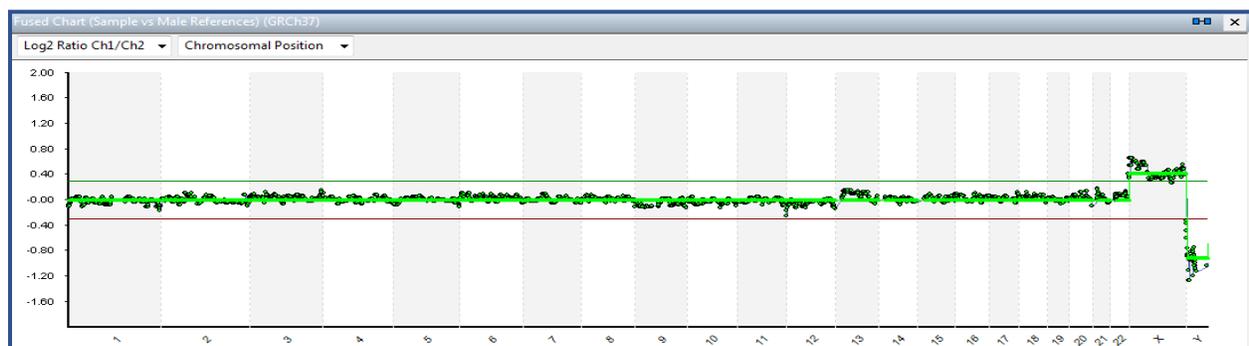


Figura 14: Imagen de restos abortivos analizados con un ADN control masculino mediante aCGH. Resultado normal masculino.

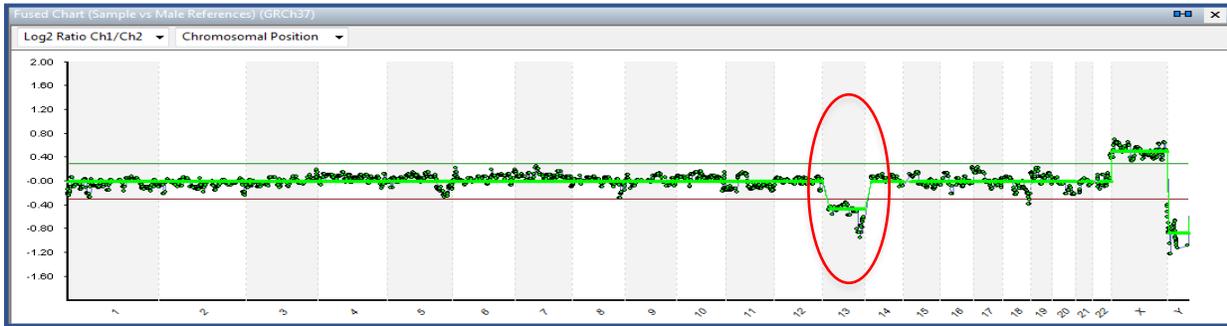


Figura 15: Imagen de restos abortivos analizados con un ADN control masculino mediante aCGH. Resultado anormal femenino, monosomía 13.

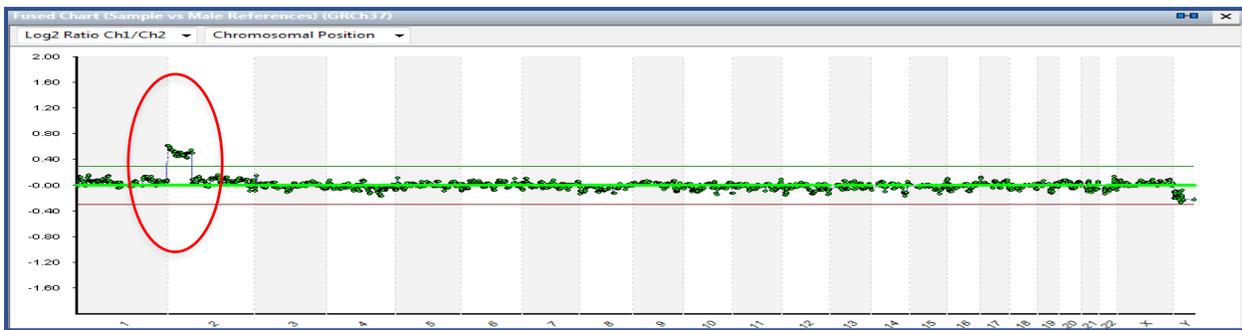


Figura 16: Imagen de restos abortivos analizados con un ADN control masculino mediante aCGH. Resultado anormal masculino, ganancia parcial (duplicación) del brazo corto (p) del cromosoma 2.

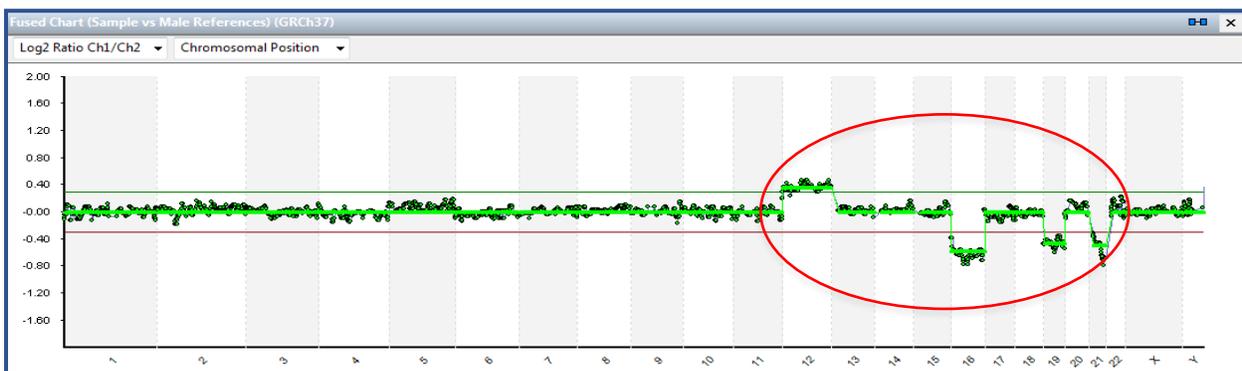


Figura 17: Imagen de restos abortivos analizados con un ADN control masculino mediante aCGH. Resultado anormal complejo, múltiples aneuploidías.

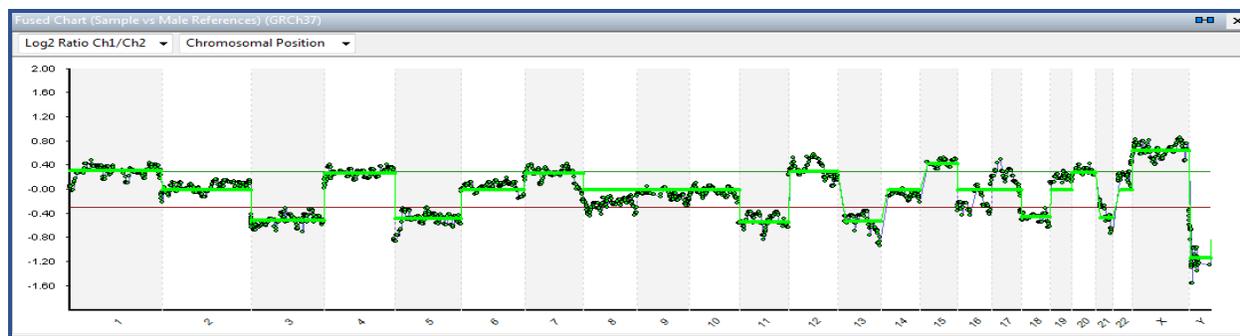


Figura 18: Imagen de restos abortivos analizados con un ADN control masculino mediante aCGH. Resultado anormal caótico.

3.3.2.2 Protocolo de NGS.

El protocolo de NGS se realizó utilizando el kit comercial Ion ReproSeq™ PGS kit (Thermo Fisher Scientific, USA), como se detalla a continuación:

Extracción y amplificación del ADN genómico:

Descongelar los reactivos de cada paso (lisis, pre-amplificación y amplificación), a excepción del enzima que siempre se mantendrá en gradilla congelada.

· Lisis:

Se prepara un Extraction Enzyme Master Mix en un tubo de 1,5 ml en hielo con los volúmenes indicados. Se vorteo brevemente y se dio un spin al mix. Se añadió 7,5 µl Extraction Enzyme Mix a cada muestra (Vf = 10 µl). Se dio un spin a las muestras. Las muestras se incubaron en un termociclador con el programa correspondiente.

· Pre-amplificación:

Se prepara un Pre-Amplification Master Mix en un tubo de 1,5 ml en hielo con los volúmenes indicados. Se vorteo brevemente y se dio un spin al mix. Se añadió 5 µl Extraction Enzyme Mix a cada muestra (Vf = 15 µl). Se dio un spin a las muestras. Las muestras se incubaron en un termociclador con el programa correspondiente.

· Amplificación:

Se centrifuga la placa brevemente. Se preparó un Amplification Master Mix en un tubo de 1,5 ml en hielo con los volúmenes indicados. Se vorteo brevemente y se dio un spin al mix. Se revisó el orden de los tubos con doble observador. Se añadió 30 µl Extraction Enzyme Mix a cada muestra (Vf = 45 µl). Se vorteo y centrifugó la placa de 96 ó 24 Barcodes. Se limpió el film superior con etanol 70% que se dejó dentro

de la campana. Se perforó el film que cubre la placa Ion SingleSeq Barcode con puntas de pipeta acopladas a una pipeta multicanal y se pipetearon 5 µl de cada uno de los SingleSeq Barcode Adapters.

Se depositaron en los tubos correspondientes siguiendo el esquema y mezclaron al depositar en los tubos pipeteando arriba y abajo:



Se centrifugaron las muestras. Se incubaron las muestras en un termociclador con el programa correspondiente.

En este punto se pueden guardar las librerías entre -30°C y -10°C.

Preparación de las librerías, purificación y cuantificación:

· *Combinación:*

Se pipetearon 5 µl de cada muestra y se mezclaron todas en un tubo de 1,5 ml. Se vorteoó brevemente y se dio un spin al mix. Se pasaron 50 µl de la mezcla a un tubo de 0,2 ml.

· *Purificación:*

Se calentó el tubo de mezcla de librerías en un termociclador con el programa correspondiente.

Se vortearon muy bien las bolitas AMPure® XP beads (1 MIN APROX.) Se transfirieron 40 µl de las librerías a un tubo Eppendorf LoBind® de 1,5 ml. Se añadió el mismo volumen de AMPure® XP beads a la mezcla de librerías. Se vorteoó y se dio spin al tubo muy brevemente. Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Durante la incubación se preparó alcohol 70% en un tubo de 1,5 ml. Se puso el tubo en el imán DynaMag®-

2 y se esperó durante 5 min para que las bolitas se peguen a la pared del tubo. Se aspiró el sobrenadante con mucho cuidado y desechó el mismo. Se lavaron las bolitas con 250 μ l de Etanol 70% dejándolo deslizarse por el lado del tubo en el que se encuentran las bolitas sin quitar el tubo del imán. Se incubó durante 30 segundos y se giró el tubo 180° para lavar bien las bolitas aproximadamente 6 veces. Se aspiró el sobrenadante con mucho cuidado y se descartó. Se repitieron los pasos anteriores. Se dio un spin al tubo y se volvió a ponerlo en el imán. Se eliminaron los restos de etanol y se dejaron secar las bolitas a temperatura ambiente durante 3-4 minutos sin quitar el tubo del imán y con la tapa abierta. Se quitó el tubo del imán y se re-suspendieron las bolitas en 40 μ l de Low TE pipeteando arriba y abajo (el ADN se despegue de las bolitas). Se incubó a temperatura ambiente durante 1 min fuera del imán. Se volvió a poner el tubo en el imán y se esperó durante 2 minutos. Se marcó un tubo Eppendorf LoBind® de 1,5 ml con el n° del run y la fecha. Se transfirió al tubo el sobrenadante, que contiene la mezcla de librerías purificada, pipeteando 35 μ l evitando arrastrar bolitas.

· **Cuantificación y dilución:**

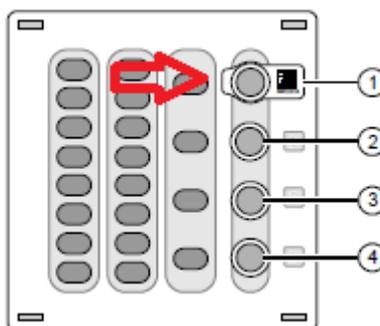
Se preparó la working solution en un tubo de 1,5 ml. Se vorteoó y se marcaron 2 tubos Qubit con 1 (Standard 1), 2 (Standard 2), 3 Qubit para cada Run que procesamos y 2 tubos para el CONTROL. Se prepararon los standards con el protocolo establecido. Se vorteoó durante 2-3 segundos sin formar burbujas. Se preparó la muestra. Se vortearon los tubos durante 2-3 segundos sin crear burbujas. Se incubaron los tubos 2 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se midieron los standards para generar la curva Standard y a continuación se midió cada muestra. Se anotaron las concentraciones en ng/ μ l. Se marcaron dos tubos Eppendorf de 0,2 ml con el n° de run y la concentración.

· **Dilución de la muestra en función de indicaciones del Lab:**

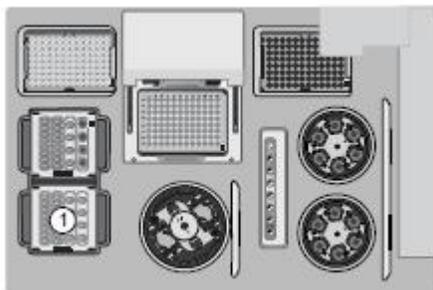
Se diluyeron las muestras hasta 80 pm siguiendo la planner de trabajo de diluciones y se imprimió. La primera dilución se hizo con LOW TE, la segunda se puede hacer con H2O NF o TE.

· **Preparación del ION CHEF:**

En el cartucho Ion S5 ExT Chef Reagents atemperado, se pipeteó los 50 μ l de la última dilución en el tubo de la posición 1 (lleva el código de barras):



Se agitó y se dieron suaves golpes para remover los reactivos del cartucho antes de cargarlos en el Chef. Se colocaron el resto de los consumibles del Chef:



Se agitó el cartucho de reactivos hasta que las beads quedaron disueltas uniformemente. Se puso el CHIP en la centrifuga siempre en la posición 1. En la posición 2 hay que poner el equilibrador en función del tipo de chip que va a cargar (530 para la run de 96 y 520 para la run de 24 muestras).

Se cerró el chef comprobando que los tubos estuvieran destapados y todo estuviera correctamente colocado en su posición.

Se subió la Planner (CSV) en el secuenciador S5 que corresponde. Se realizó la Cheak Templeating (5' aprox) para reconocer los códigos de los tubos/chip/fungible, que previamente apuntamos en la hoja de dilución y que nos sirve de control. Se programó el CHEF en función del horario de carga.

3.3.2.3 Análisis de STRs.

Para descartar el riesgo de un diagnóstico erróneo debido a contaminación materna, se puede ejecutar una estrategia complementaria realizando Short Tandem Repeats (STRs) en paralelo al método molecular (por ejemplo, la NGS) para la detección de aneuploidías. El ADN de las muestras de restos abortivos y el ADN de la madre se extraen utilizando un kit comercial, QIAamp® DNA Mini y Blood Kit (Qiagen). Se usa el protocolo de AmpFISTR Identifier Plus Kit PCR (amp16str) (Thermo Fisher Scientific, USA) para realizar la PCR y la electroforesis para detectar o descartar contaminación materna (Figura 9 y 10) y triploidías (Figura 19) *Cortesía de la Dra. Ana Cervero.*

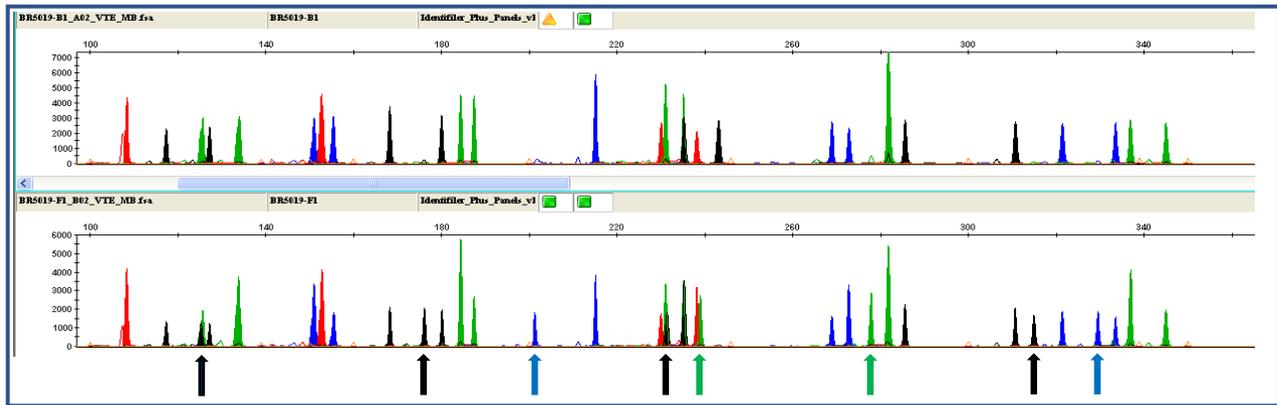


Figura 19: Poliploidía (Triploidía). En la parte superior se puede ver el ADN de la madre. En la parte inferior el ADN fetal. Se pueden observar algunos picos extra en el perfil del feto (flechas) que no se observan en el perfil de la madre. Esto quiere decir que la pérdida gestacional fue debido a un feto poliploide (triploide en este caso).

A continuación, pasamos a comentar dichos protocolos:

- **AmpFISTR Identifier Plus Kit PCR (amp16str):**

Preparar los reactivos (Vortex, Spin).

Dilución en serie: (TE Bff):[ADN]_i → 1/10 → 1/x → [ADN]_f-(A:0,1 ng/μl o B:0,2 ng/μl) en 10 μl de volumen de muestra.

Preparar el Reaction Mix (RM):

Reaction Mix	x1 muestra (μl)	Ctrl + Ctrl -	_____ muestras (μl)	V _f RM/muestra
strMaster Mix	10,0			
Primer Set	5,0			

Vortex, Spin (RM)

Identificar cada tubo de muestra de 0,2 ml.

Distribuir 14,5 μl de RM en tubos con muestra.

Dispensar y mezclar pipeteando:

A:	
10 μl TE Bff	Control negativo (Ctrl -)
10 μl 9947A ADN control	Control positivo (Ctrl +)
10 μl ADN Muestra diluida	Muestra de prueba

Correr las muestras en el termociclador según el programa indicado.

- **Electroforesis:**

Preparar el Analizador genético 310 (POP4, ddH₂O, Formamida, Bloque, Capilar, Temperatura, Calibración, Bff 1x, Hoja de muestra).

Preparar para las muestras:

Size Standard Mix (SSM)	x1 muestra (µl)	Ctrol + Ctrol -	_____ muestras (µl)	$V_f^{SSM}/muestra$
500 Liz	0,5			
Hi-Di Formamida	23,5			

Vortex, Spin al SSM.

Identificar cada tubo de muestra de 0,5 ml.

Distribuir 22,5 µl de SSM en los tubos con muestra.

Preparar para el Allelic Leader (AL):

Size Standard Mix	x1 AL (µl)	_____ AL (µl)	$V_f^{SSM}/Allelic\ Leader$
500 Liz	0,5		24,5 µl
Hi-Di Formamide	24,5		

Preparar:

Control Liz	x1 Ctrol Liz (µl)	$V_f^{Ctrol\ Liz}/Allelic\ Leader$
500 Liz	0,5	26,5 µl
Hi-Di Formamida	26	

Añadir 3,0 µl de muestra de ADN en los tubos, y mezclar pipeteando.

Añadir 1,5 µl de AL en el (los) tubo (s) de muestra del AL y mezclar pipeteando.

Sellar los tubos con los septa.

Asegurarse de que los contenidos de cada tubo se mezclen y recojan en la parte inferior.

Desnaturalizar a 95°C, 3 '.

Colocar inmediatamente los tubos en un estante frío/hielo, 3 '.

Colocar las muestras en la bandeja de muestras después de la identificación.

Colocar la bandeja de muestras en el muestreador automático.

Comenzar el proceso de la electroforesis.

Una buena estrategia para disminuir al máximo la posible contaminación materna es realizar multimuestreo. En nuestros laboratorios, una vez llega la muestra realizamos la extracción de ADN y procedemos a secuenciar para el análisis cromosómico. Si el resultado es normal, ya sea masculino o femenino, analizamos las muestras usando los STRs. El multimuestreo comprende tres disecciones de los restos abortivos en lugar de solo una. Esta acción hace posible que, por ejemplo, si después de realizar el análisis de STRs, la muestra n° 1 y la muestra n° 2 son contaminación materna (pertenecen a la madre) pero la muestra n° 3 corresponde al feto, ésta última sería la única capaz de proporcionar resultados precisos y fiables. En el escenario donde solo se realiza una disección, si se toma la muestra n° 1, el resultado final sería contaminación materna, con resultados no informativos o un resultado femenino normal erróneo si no se realizaron STRs.

3.3.2.4 Interpretación global de los resultados.

El software Ion Reporter genera un gráfico que representa cambios en el número de copias (CNV) de los cromosomas de la muestra analizada cuando se compara con la base bioinformática de referencia, generada a partir de muestras cromosómicamente normales.

- **Normal:** Un resto abortivo se considera como "normal" cuando el gráfico no muestra desviaciones respecto a la base bioinformática de referencia para ninguno de los 24 cromosomas.
- **Anormal:** Un resto abortivo se considera como "anormal" con aneuploidía de cromosoma completo [ganancia o pérdida de un cromosoma (1-22, X, Y)] o aneuploidía parcial [ganancia o pérdida de un fragmento de un brazo de cromosoma (p, q)], cuando se observan puntos que se desvían hacia la parte superior (ganancia +) o la parte inferior (pérdida -) del gráfico obtenido por el software.
- **ADN no detectado:** La ausencia de resultado debida a ADN insuficiente en la muestra se considera "ADN no detectado".
- **No informativo:** Un resto abortivo se considera "no informativo" cuando los resultados de la secuenciación no son concluyentes.
- **Contaminación materna:** Un resto abortivo se considera con "contaminación materna" cuando los resultados de gráfico muestran un perfil de "Normal XX" y el estudio de STRs muestra que hay contaminación materna en el supuesto tejido fetal.

3.3.2.5 Riesgos y limitaciones del test.

1. No todas las condiciones genéticas y/o todas las anomalías cromosómicas pueden ser detectadas. A continuación, se detallan las condiciones que no podrían ser detectadas:

- Translocaciones equilibradas e inversiones, que este test no puede testar.
- Bajos niveles de mosaicismo cromosómico.
- Mutaciones génicas individuales, como la anemia de células falciformes, la fibrosis quística o la enfermedad de Tay-Sachs.
- Con NGS no se detectarían algunas tetraploidías, como la 92, XXXX o 92, XXYY, pero detectará las triploidías 69, XXY, 69, XXX, y las tetraploidías 92, XXXY y 92, XYYY. Sin embargo si se detectarían con los STRs.
- Disomía Uniparental.
- Las trisomías completas de cromosomas acrocéntricos no se podrán distinguir de las trisomías, debido a una translocación Robertsoniana (implica a los cromosomas 13, 14, 15, 21, o 22) o isocromosomas en uno de los padres.
- Otras causas de aborto espontáneo todavía no identificadas.

2. Se informará sobre las pérdidas o duplicaciones de material cromosómico mayores de 5-6 MB.

3. Riesgo de diagnóstico erróneo. Esto se puede producir debido a la falta/error de identificación de las muestras, datos inexactos relacionados con las relaciones familiares, mosaicismo u otras anomalías genéticas no identificadas.

4. Probabilidad de contaminación de células de la madre. Estos resultados no son procesables.

5. Existe la posibilidad de que ocurran problemas impredecibles e incontrolables con el transporte, tales como aquellos relacionados con el clima y el transporte aéreo, u otras circunstancias fuera del control, las cuales no permitirían la obtención de resultados en el tiempo previsto. También existe la posibilidad de que la muestra recibida en el laboratorio sea inaceptable para su análisis, y por tanto, los resultados no puedan ser obtenidos a partir de la muestra proporcionada.

3.4 Análisis de datos.

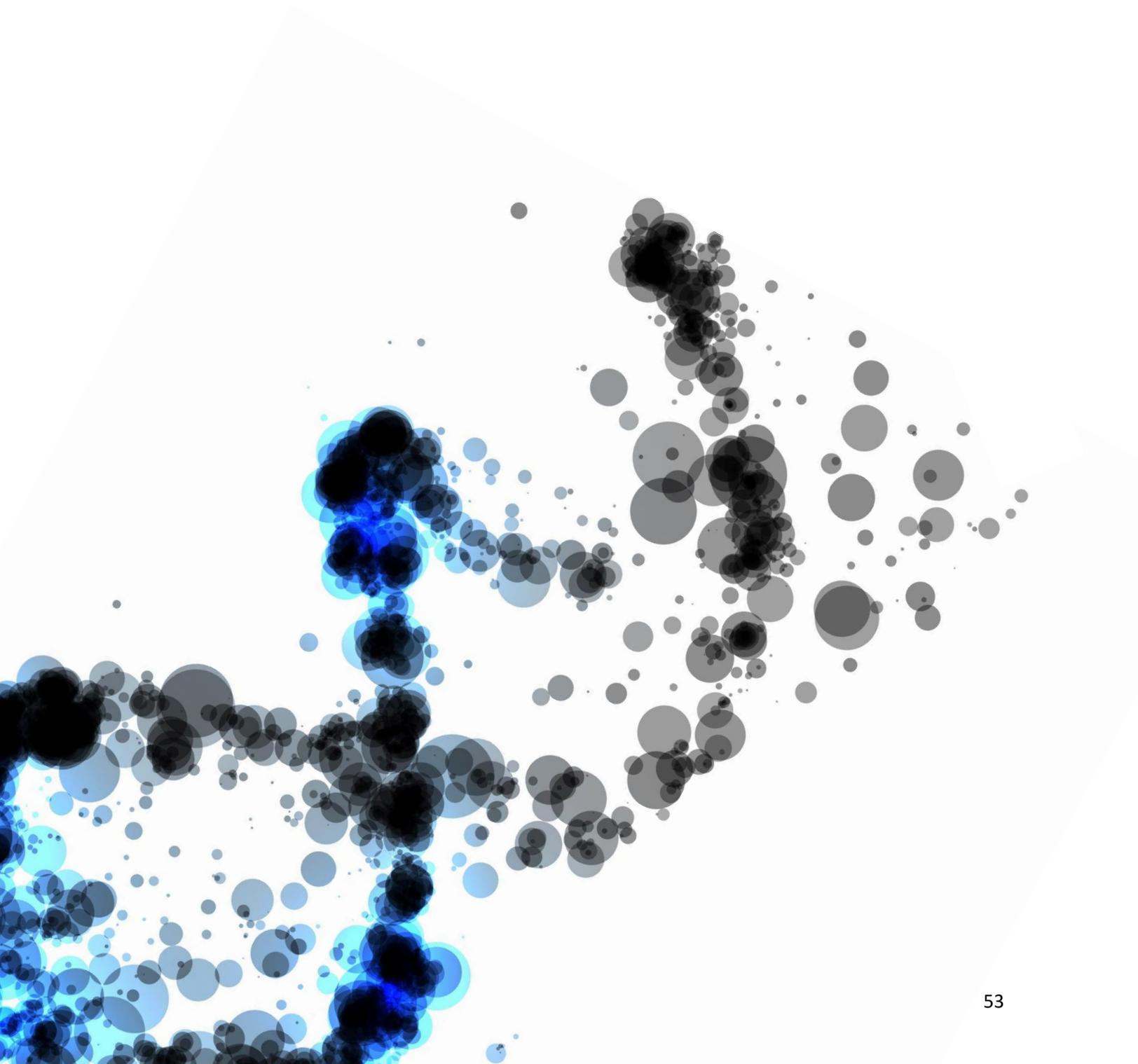
Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando el programa GraphPad InStat version 3.10 para Windows 95, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Cuando comparamos variables cuantitativas entre dos grupos aplicamos la prueba *t de Student* y utilizamos el test de ANOVA cuando la comparación se hacía entre tres o más grupos. Para determinar si las variables cuantitativas seguían una distribución normal se aplicó el método de Kolmogorov y Smirnov (KS). En aquellos casos en los que la variable no siguió una distribución normal se utilizaron test no paramétricos para las comparaciones estadísticas. Así, para las comparaciones de edad materna, edad paterna y edad gestacional donde la n entre los grupos de estudio fue muy diferente, se utilizó el test de Mann-Whitney (entre dos grupos) o el de Kruskal-Wallis junto con el test de comparaciones múltiples de Dunn (entre 3 o más grupos). Los test paramétricos también fueron aplicados, obteniendo los mismos resultados en todos los casos.

Para variables cualitativas o categóricas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado con la corrección de Yates y en función del número de casos en cada grupo, se utilizó también el test de Fisher. En todos los casos obtuvimos los mismos resultados con los test paramétricos y no paramétricos.

Se considero que los grupos comparados presentan diferencias significativas con $p < 0,05$.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Análisis de los datos según la técnica molecular utilizada.

Se estudiaron un total de 2.531 muestras, de las cuales 675 fueron analizadas mediante aCGH (durante los años 2014 y 2015) y 1.875 mediante NGS (durante los años 2016 y 2017). En ambos casos se realizaron estudios adicionales con STRs para identificar la presencia o ausencia de ADN materno y descartar así contaminación materna, así como detectar posibles poliploidías.

En la tabla 4 se muestran los resultados globales, así como de cada una de las tecnologías. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad materna se refiere siendo la media de edad de $35,3 \pm 4,9$ años; tampoco en la edad paterna, la cual fue de $37,3 \pm 5,7$ años, ni en la edad gestacional cuya media fue $7,9 \pm 2,8$ (en semanas) así como para el resto de las variables. En primer lugar, cabría destacar la alta tasa de informatividad con un 99,1% para aCGH y un 99% en NGS, siendo de un 99% para el total de los casos analizados. El porcentaje de muestras que presentó contaminación materna en todas las alícuotas analizadas fue similar entre los dos grupos, 10,8% con aCGH y 13,6% con NGS, siendo el total de 12,8%.

Los porcentajes de resultados normales y anormales, así como todas las subcategorías también fueron comparables en ambas técnicas, siendo cromosómicamente anormales el 53,5% de los restos abortivos analizados (54,1% con aCGH versus 53,3% con NGS). A destacar la incidencia de trisomías, que fue del 74,3% de las muestras anormales y las monosomías para los cromosomas sexuales, que representaron el 9,4% de las muestras anormales, siendo en su gran mayoría 45,X. Por otro lado, las anomalías que presentaron menor incidencia fueron las monosomías autosómicas (1,8%), las deleciones/duplicaciones (2,3%) y las poliploidías (4,6%).

	aCGH 2014-15	NGS 2016-17	Totales 2014-2017
Nº Casos	675	1.856	2.531
Edad Materna (DE)	35,7 (4,8)	35,2 (4,9)	35,3 (4,9)
Edad Paterna (DE)	37,7 (5,8)	37,2 (5,7)	37,3 (5,7)
Edad Gestacional (DE)	7,7 (1,8)	8,0 (3,0)	7,9 (2,8)
Informativos (%)	669 (99,1)	1837 (99,0)	2506 (99,0)
Nº de casos con contaminación materna (%)	72 (10,8)	249 (13,6)	321 (12,8)
Resultados Normales (%)	274 (45,9)	742 (46,7)	1.016 (46,5)
Resultados Anormales (%)	323 (54,1)	846 (53,3)	1.169 (53,5)
Trisomías (%)	241 (74,6)	627 (74,1)	868 (74,3)
Aneuploidía múltiple (%)	27 (8,4)	62 (7,3)	89 (7,6)
Monosomía autosomas (%)	5 (1,5)	16 (1,9)	21 (1,8)
Monosomía Cr. Sexual (%)	29 (9,0)	81 (9,6)	110 (9,4)
Deleción/Duplicación (%)	12 (3,7)	15 (1,8)	27 (2,3)
Poliploidía (%)	9 (2,8)	45 (5,3)	54 (4,6)

Tabla 4: Resultados obtenidos en función del análisis molecular realizado (aCGH vs. NGS). Los resultados de anomalías concretas tales como trisomías, monosomías... fueron analizados frente al total de resultados anormales. Test de Mann-Whitney y Chi-cuadrado ($p < 0,05$). *Ningún resultado fue estadísticamente significativo.

4.2 Análisis de los datos por cromosoma.

Una vez efectuado el análisis de los resultados por grupos de anomalías, se procedió al estudio por cromosoma comparando de nuevo ambas técnicas y luego de una manera global. En las 2.531 muestras analizadas encontramos 130 monosomías y 862 trisomías puras, es decir, aquellas muestras de restos abortivos en las que una vez realizado el análisis y habiendo salido anormal, tenían una sola monosomía o una sola trisomía. Otros patrones de anormalidad como aneuploidía múltiple (dos o más aneuploidías), del/dup o poliploidías no quedan reflejadas en estas tablas (Tablas 5, 6 y 7), ya que se mostraron de manera general en la sección anterior.

Una vez analizados los datos de aneuploidías se vio que todos y cada uno de los cromosomas analizados por las distintas técnicas, tanto los autosomas como los cromosomas sexuales, fueron comparables entre sí y no existió diferencia significativa alguna entre ellos. Siendo esto así, procedimos a valorar los resultados totales en la tabla 7.

En el análisis de las monosomías se constató que la incidencia fue muy baja como cabría de esperar ya que las monosomías suelen dar lugar a fallos de implantación, a excepción de la monosomía para los cromosomas sexuales comentada en el apartado anterior. En nuestros análisis, se vio que la incidencia de monosomía 21 (11,5%) sería relevante con respecto al resto de monosomías exceptuando a la anteriormente citada 45,X. También se observaron monosomías para otros cromosomas tales como los cromosomas 4, 13, 15 y 22, aunque la incidencia fue muy baja tal y como se muestra en las tablas 5, 6 y 7. En el estudio de las trisomías, que como veíamos en la tabla 5, son responsables de casi el 75% de resultados anormales de un análisis de restos abortivos, los cromosomas más representados fueron el cromosoma 16 (17,6%) y el 22 (16,6%), seguidos por los cromosomas 15 (13,3%), 13 (6,7%) y 21 (6,5%). No se encontró ningún caso de trisomía para el cromosoma 1, y la prevalencia fue muy baja para los cromosomas 19 (1,2%), 5 (1,0), 3 (0,9%), 17 (0,7%) y 12 (0,3%).

Habiendo hecho el análisis de estos resultados junto a los de la sección anterior en los cuales encontramos que no había diferencias significativas entre las dos técnicas, en los siguientes apartados de la sección se consideraron los resultados totales independientemente de la técnica molecular utilizada para su análisis.

Cromosoma	POR CROMOSOMA aCGH 2014-2015		POR CROMOSOMA NGS 2016-2017	
	Nº Monosomía (%)	Nº Trisomía (%)	Nº Monosomía (%)	Nº Trisomía (%)
1	0	0	0	0
2	0	7 (2,3)	0	12 (1,9)
3	0	2 (0,8)	0	6 (1,0)
4	0	9 (3,8)	2 (2,1)	8 (1,3)
5	0	2 (0,8)	0	7 (1,1)
6	0	7 (3)	0	7 (1,1)
7	0	9 (3,8)	0	23 (3,7)
8	0	10 (4,2)	0	29 (4,7)
9	0	10 (4,2)	0	24 (3,9)
10	0	6 (2,5)	0	9 (1,5)
11	0	3 (1,3)	0	11 (1,8)
12	0	0	0	4 (0,6)
13	0	18 (7,6)	1 (1,0)	41 (6,6)
14	0	4 (1,7)	0	16 (2,6)
15	1 (2,9)	28 (11,9)	0	81 (13,1)
16	0	52 (22,0)	0	108 (17,5)
17	0	2 (0,8)	0	4 (0,6)
18	0	7 (3,0)	0	24 (3,9)
19	0	2 (0,8)	0	2 (0,3)
20	0	6 (2,5)	0	26 (4,2)
21	3 (8,8)	16 (6,8)	13 (13,4)	38 (6,2)
22	1 (2,9)	32 (13,6)	0	108 (17,5)
Cr. Sexuales	29 (85,3)	4 (1,7)	81 (83,5)	29 (4,7)
TOTALES	34	236	97	617

Tablas 5 y 6: Resultados en función del análisis molecular realizado (aCGH vs. NGS) por cromosoma. Se analizó el porcentaje de trisomías y monosomías con respecto al total de las mismas. Test de Fisher. $P < 0,05$. * Ningún resultado fue estadísticamente significativo.

POR CROMOSOMA TOTALES 2014-2017		
Cromosoma	Monosomía	Trisomía
1	0	0
2	0	21 (2,4)
3	0	8 (0,9)
4	2 (1,5)	16 (1,9)
5	0	9 (1,0)
6	0	14 (1,6)
7	0	32 (3,7)
8	0	38 (4,4)
9	0	34 (3,9)
10	0	16 (1,9)
11	0	15 (1,7)
12	0	3 (0,3)
13	1 (0,8)	58 (6,7)
14	0	21 (2,4)
15	1 (0,8)	115 (13,3)
16	0	152 (17,6)
17	0	6 (0,7)
18	0	31 (3,6)
19	0	10 (1,2)
20	0	31 (3,6)
21	15 (11,5)	56 (6,5)
22	1 (0,8)	143 (16,6)
Cr. Sexuales	110 (84,6)	33 (3,8)
TOTALES	130	862

Tabla 7: Resultados totales por cromosoma (autosomas y sexuales). Se analizó el porcentaje de trisomías y monosomías con respecto al total de las mismas.

4.3 Análisis de los datos por edad materna.

Otro parámetro estudiado fue la edad materna de las mujeres que habían sufrido la pérdida gestacional. Se analizaron 2.460 restos abortivos estratificando los resultados por edad en 6 grupos distintos: ≤ 30 , 31-35, 36-38, 39-40, 41-42 y >42 años (Tabla 8a).

El porcentaje de muestras con resultados informativos mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ≤ 30 años comparado con el grupo de 36-38 años (97,9% vs. 100%; $p=0,0005$), ≤ 30 años comparado con 39-40 años (97,9% vs. 99,7%; $p=0,003$) y el grupo de 31-35 años comparado con el grupo de 36-38 (98,6% vs. 100%; $p=0,004$).

La comparación de la media de la edad gestacional entre los distintos grupos no fue estadísticamente significativa.

El análisis con respecto al porcentaje de casos con contaminación materna mostró un solo grupo con diferencias significativas, el grupo de 36-38 años frente al grupo 41-42 años (15,5% vs. 7,8%; $p=0,01$).

Los porcentajes de anomalías cromosómicas fueron aumentando progresivamente conforme a la edad materna, con excepción del grupo de >42 años, en el cual los niveles de aneuploidía fueron similares a los de pacientes jóvenes, lo que nos indicó que en dicho grupo se podrían haber incluido algunas pacientes que utilizaron ovocitos de donantes pero que no lo reflejaron en el formulario del estudio.

El porcentaje de trisomías (Tabla 8b) fue estadísticamente significativo entre los siguientes grupos: ≤ 30 años vs. 39-40 años (70,2% vs. 85,3%; $p=0,0005$); 31-35 años vs. 39-40 años (70,8% vs. 85,3%; $p=0,0001$); 36-38 años vs. 39-40 años (75,7% vs. 85,3%; $p=0,01$) y 39-40 años vs. >42 años (85,3% vs. 68,1%; $p=0,01$).

Las aneuploidías múltiples, en la mayoría de los casos la combinación de dos anomalías cromosómicas, aumentaron a medida que lo hizo la edad materna. Con diferencias significativas entre los siguientes grupos: ≤ 30 años vs. 41-42 (5,9% vs. 15,7%; $p=0,007$); ≤ 30 años vs. >42 años (5,9% vs. 21,3%; $p=0,002$); 31-35 años vs. 41-42 (4,3% vs. 15,7%; $p=0,0003$); 31-35 años vs. >42 años (4,3% vs. 21,3%; $p=0,0002$); 36-38 años vs. 41-42 años (5,2% vs. 15,7%; $p=0,001$); 36-38 años vs. >42 años (5,2% vs. 21,3%; $p=0,0008$) y 39-40 años vs. >42 años (8,4% vs. 21,3%; $p=0,01$).

El porcentaje de monosomías para los cromosomas sexuales mostró una tendencia a disminuir con el aumento de la edad materna. Se encontraron diferencias significativas para los siguientes grupos: ≤ 30 años vs. 39-40 años (13,8% vs. 2,6%; $p<0,0001$); ≤ 30 años vs. 41-42 años (13,8% vs. 4,6%; $p=0,01$); 31-35

años vs. 39-40 años (14,6% vs. 2,6%; $p < 0,0001$); 31-35 años vs. 41-42 años (14,6% vs. 4,6%; $p = 0,004$) y 36-38 años vs. 39-40 años (10,4% vs. 2,6%; $p = 0,001$).

El último tipo de aneuploidía en el que tras el análisis se encontraron algunas diferencias significativas fueron las poliploidías. Las poliploidías fueron disminuyendo a medida que aumentaba la edad de la paciente. Los grupos que mostraron diferencias significativas fueron: ≤ 30 años vs. 39-40 años (6,9% vs. 1,6%; $p = 0,01$) y ≤ 30 años vs. 41-42 años (6,9% vs. 0,9%; $p = 0,02$).

Por último, la incidencia de deleciones/duplicaciones y de monosomías autosómicas no mostró diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones entre grupos según la edad materna.

	≤30 años	31-35 años	36-38 años	39-40 años	41-42 años	>42 años
Nº Casos	470	854	524	336	167	109
Edad Materna (DE)	27,6 (2,6)	33,2 (1,4)	36,9 (0,8)	39,5 (0,5)	41,4 (0,5)	44,4 (1,7)
Edad Paterna (DE)	33,2 (5,7) ^e	35,4 (4,7) ^f	38,9 (4,7) ^g	40,2 (5,2) ^h	41,3 (4,6) ⁱ	42,9 (4,8) ^j
Edad Gestacional (DE)	8,6 (4,4)	7,8 (2,8)	7,9 (2,2)	7,8 (1,5)	8,0 (2,8)	8,0 (1,9)
Informativos (%)	460 (97,9) ^a	842 (98,6) ^b	524 (100) ^c	335 (99,7) ^d	167 (100)	109 (100)
Nº de casos con contaminación materna	59 (12,8)	109 (12,9)	81 (15,5) ^k	41 (12,2)	13 (7,8) ^l	13 (11,9)
Resultados Normales (%)	213 (53,1)	384 (52,4)	175 (39,5)	104 (35,4)	46 (29,9)	49 (51,0)
Resultados Anormales (%)	188 (46,9) ^m	349 (47,6) ⁿ	268 (60,5) ^o	190 (64,6) ^p	108 (70,1) ^q	47 (49,0) ^r

Tabla 8a: Resultados por grupos de edad. Test de Fisher y Kruskal-Wallis con test de comparaciones múltiples de Dunn. $P < 0,05$; $ac p = 0,0005$; $ad, pr p = 0,003$; $bc p = 0,004$; $ef, eg, eh, ei, ej, fg, fh, fi, fj, gj p < 0,001$; $gi p < 0,05$; $kl p = 0,01$; $mo, mp, mq, no, np, nq p < 0,0001$; $or p = 0,04$; $pq p = 0,008$.

	≤30 años	31-35 años	36-38 años	39-40 años	41-42 años	>42 años
Trisomías (%)	132 (70,2) ^a	247 (70,8) ^b	203 (75,7) ^c	162 (85,3) ^d	83 (76,9)	32 (68,1)
Aneuploidía múltiple (%)	11 (5,9) ^e	15 (4,3) ^f	14 (5,2) ^g	16 (8,4) ^h	17 (15,7) ⁱ	10 (21,3) ^j
Monosomía autosomas (%)	2 (1,1)	11 (3,2)	4 (1,5)	1 (0,5)	1 (0,9)	1 (2,1)
Monosomía Cr. Sexual (%)	26 (13,8) ^k	51 (14,6) ^l	28 (10,4) ^m	5 (2,6) ⁿ	5 (4,6) ^o	3 (6,4)
Deleción/Duplicación (%)	4 (2,1)	10 (2,9)	6 (2,2)	3 (1,6)	1 (0,9)	1 (2,1)
Poliploidía (%)	13 (6,9) ^p	15 (4,3)	13 (4,9)	3 (1,6) ^q	1 (0,9) ^r	0 (0)

Tabla 8b: Resultados por grupos de edad. Test de Fisher. $P < 0,05$; $ad p = 0,0005$; $bd, kn, in p = 0,0001$; $cd, ko, pq p = 0,01$; $ei p = 0,007$; $ej p = 0,002$; $fi p = 0,0003$; $fj p = 0,0002$; $gi, mn p = 0,001$; $gj p = 0,0008$; $io p = 0,004$; $pr p = 0,02$.

4.4 Análisis de los datos por edad gestacional.

El siguiente parámetro de estudio fue la edad gestacional (en semanas). Se analizaron 2.531 muestras las cuales fueron divididas en grupos según la semana gestacional en la que se había producido la pérdida del embarazo. Los grupos fueron: ≤ 6 semanas, 7-8 semanas, 9-10 semanas, 11-12 semanas y > 12 semanas (Tabla 9a).

Cuando se realizaron las comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos, casi todas las variables mostraron diferencias significativas para alguna de las comparaciones realizadas, excepto para la tasa de informatividad y la incidencia de poliploidía.

En cuanto al análisis de la edad materna, sólo se encontraron como estadísticamente significativas las diferencias entre los grupos de edad gestacional de ≤ 6 semanas vs. 7-8 semanas ($34,7 \pm 5,2$ vs. $35,8 \pm 4,6$; $p < 0,001$). Para la edad paterna sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre los grupos de 7-8 semanas vs. 9-10 semanas ($37,8 \pm 5,9$ vs. $35,3 \pm 5,6$; $p < 0,05$).

Sin embargo, la edad gestacional si mostró una relación inversamente proporcional con el porcentaje de muestras con contaminación materna debido a la dificultad técnica implicada. Así pues, se observaron diferencias estadísticamente significativas para las comparaciones entre los siguientes grupos: ≤ 6 semanas vs. 9-10 semanas ($17,2\%$ vs. $9,4\%$; $p = 0,0005$); ≤ 6 semanas vs. 11-12 semanas ($17,2\%$ vs. $6,5\%$; $p = 0,04$) y ≤ 6 semanas vs. > 12 semanas ($17,2\%$ vs. $2,1\%$; $p = 0,01$).

La incidencia de trisomías (Tabla 9b) fue más elevada en los grupos de edad gestacional entre 7-8 semanas y entre 11-12 semanas de gestación, con diferencias estadísticamente significativas entre los siguientes grupos: ≤ 6 semanas vs. 7-8 semanas ($67,8\%$ vs. $83,5\%$; $p < 0,0001$), 7-8 semanas vs. 9-10 semanas ($83,5\%$ vs. $67,8\%$; $p < 0,0001$), 7-8 semanas vs. > 12 semanas ($83,5\%$ vs. $56,3\%$; $p = 0,01$).

Las aneuploidías múltiples disminuyeron a medida que aumentó la edad gestacional, y la mayor parte se observaron en edad gestacional ≤ 6 semanas. Se observaron diferencias significativas entre los siguientes grupos: ≤ 6 semanas vs. 7-8 semanas ($14,1\%$ vs. $3,5\%$; $p < 0,0001$); ≤ 6 semanas vs. 9-10 semanas ($14,1\%$ vs. $3,1\%$; $p < 0,0001$) y ≤ 6 semanas vs. 11-12 semanas ($14,1\%$ vs. $0,0\%$; $p = 0,01$).

Del estudio en las monosomías autosómicas poco se puede decir debido a su baja prevalencia. Los grupos que tuvieron diferencias significativas entre ellos fueron los siguientes: ≤ 6 semanas vs. 7-8 semanas ($2,2\%$ vs. $0,4\%$; $p = 0,02$) y 7-8 semanas vs. 9-10 semanas ($0,4\%$ vs. $2,2\%$; $p = 0,03$).

El análisis de monosomías para los cromosomas sexuales mostró que, a mayor edad gestacional, mayor porcentaje de estas. Los grupos que mostraron diferencias significativas fueron: ≤ 6 semanas vs. 9-10 semanas (7,7% vs. 22,0%; $p < 0,0001$); ≤ 6 semanas vs. > 12 semanas (7,7% vs. 31,3%; $p = 0,07$); 7-8 semanas vs. 9-10 semanas (6,4% vs. 22,0%; $p < 0,0001$) y $\leq 7-8$ semanas vs. > 12 semanas (6,4% vs. 31,3%; $p = 0,003$).

Las del/dup siguieron un patrón similar, con su mayor incidencia en pacientes que tuvieron una pérdida gestacional entre las semanas 11-12. En este caso, se observaron diferencias significativas en los siguientes grupos: ≤ 6 semanas vs. 11-12 semanas (3,0% vs. 11,4%; $p = 0,03$), 7-8 semanas vs. 11-12 semanas (3,5% vs. 11,4%; $p = 0,04$) y 9-10 semanas vs. 11-12 semanas (1,8% vs. 11,4%; $p = 0,01$).

	≤6 semanas	7-8 semanas	9-10 semanas	11-12 semanas	> 12 semanas
Nº Casos	967	1.064	387	64	49
Edad Materna (DE)	34,7 (5,2) ^a	35,8 (4,6) ^b	35,5 (4,6)	35,0 (4,9)	34,7 (5,8)
Edad Paterna (DE)	37,4 (5,5)	37,8 (5,9) ^c	36,3 (5,6) ^d	37,9 (4,9) ^g	34,9 (5,2)
Informativos (%)	956 (98,9)	1.058 (99,4)	381 (98,4)	62 (96,9)	48 (98,0)
Nº de casos con contaminación materna (%)	164 (17,2) ^e	116 (11,0)	36 (9,4) ^f	4 (6,5) ^g	1 (2,1) ^h
Resultados Normales (%)	388 (49,0) ⁱ	456 (48,4) ^j	118 (34,2) ^k	23 (39,7) ^l	31 (66,0) ^m
Resultados Anormales (%)	404 (51,0)	486 (51,6)	227 (65,8)	35 (60,3)	16 (34,0)

Tabla 9a: Resultados por edad gestacional. Test de Fisher y Kruskal-Wallis con test de comparaciones múltiples de Dunn. $P < 0,05$. $ab p < 0,001$; $cd p < 0,05$; $ef p = 0,0005$; $eg p = 0,04$; $eh p = 0,01$; $ik, jk, km p < 0,0001$; $im, jm p = 0,02$; $im p = 0,01$.

	≤6 semanas	7-8 semanas	9-10 semanas	11-12 semanas	> 12 semanas
Trisomías (%)	274 (67,8) ^a	406 (83,5) ^b	154 (67,8) ^c	28 (80,0)	9 (56,3) ^d
Aneuploidía múltiple (%)	57 (14,1) ^e	17 (3,5) ^f	7 (3,1) ^g	0 ^h	0
Monosomía autosomas (%)	9 (2,2) ⁱ	2 (0,4) ^j	5 (2,2) ^k	0	0
Monosomía Cr. Sexual (%)	31 (7,7) ^l	31 (6,4) ^m	50 (22,0) ⁿ	3 (8,6)	5 (31,3) ^o
Deleción/Duplicación (%)	12 (3,0) ^p	17 (3,5) ^q	4 (1,8) ^r	4 (11,4) ^s	0
Poliploidía (%)	21 (5,2)	13 (2,7)	7 (3,1)	0	2 (12,5)

Tabla 9b: Resultados por edad gestacional. Test de Fisher. $P < 0,05$. $ab, bc, ef, eg, ln, mn p < 0,0001$; $bd, eh, rs p = 0,01$; $ij p = 0,02$; $jk p = 0,03$; $lo p = 0,007$; $mo p = 0,003$; $ps p = 0,03$; $qs p = 0,04$.

4.5 Análisis de los datos por origen de los ovocitos.

En este apartado se analizaron los resultados en dos subgrupos, por un lado, las pacientes que consiguieron gestación con ovocitos propios, y por otro lado gestaciones procedentes de receptoras de donantes de ovocitos. Se incluyeron 2.422 muestras de restos abortivos, ya que fueron excluidas las pacientes de más de 42 años por la sospecha de que en este grupo hubiera podido incluirse alguna muestra procedente de gestación con ovocitos donados. De las muestras analizadas, 2.397 fueron informativas, no siendo la diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (99,0% propios vs. 97,2% donantes). De estas, 2.351 fueron con ovocitos propios (ya sea porque usaron sus propios óvulos en TRA o por gestación natural y 71 con ovocitos de donante (Tabla 10). Todas las donantes tenían edades entre 18 y 35 años.

La edad materna y paterna mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ovocitos propios y ovocitos de donantes ($34,7 \pm 4,4$ vs. $41,4 \pm 4,7$; $p < 0,0001$ y $37,0 \pm 5,6$ vs. $41,4 \pm 5,4$; $p = 0,0007$ respectivamente). La edad materna corresponde a la edad de la receptora, ya que no se disponía de la edad de todas las donantes. La edad gestacional no fue estadísticamente significativa entre ambos grupos.

La comparación entre grupos con respecto a la incidencia de anomalías cromosómicas mostró diferencias significativas. En el grupo de pacientes con ovocitos propios el porcentaje de muestras anormales fue de 54,5%, frente al grupo de pacientes con ovocitos de donante donde fue solo 29,7% ($p = 0,001$).

Cuando se estudiaron los diferentes subtipos de aneuploidías, sólo se observaron diferencias significativas para cromosomas sexuales (9,1% en ovocitos propios vs. 36,8% en donación de ovocitos; $p = 0,001$).

	Ovocitos propios	Ovocitos de donante	P valor
Nº Casos	2.351	71	-
Edad Materna (DE)	34,7 (4,4)*	41,4 (4,7)*	<0,0001
Edad Paterna (DE)	37,0 (5,6)*	41,4 (5,4)*	0,0007
Edad gestacional (DE)	8,0 (2,8)	8,4 (2,8)	NS
Informativos (%)	2.328 (99,0)	69 (97,2)	NS
Nº de casos con contaminación materna (%)	303 (13,0)	5 (7,2)	NS
Resultados Normales (%)	922 (45,5)	45 (70,3)	-
Resultados Anormales (%)	1.103 (54,5)*	19 (29,7)*	0,001
Trisomías (%)	824 (74,7)	12 (63,2)	NS
Aneuploidía múltiple (%)	79 (7,2)	0	NS
Monosomía autosomas (%)	20 (1,8)	0	NS
Monosomía Cr. Sexual (%)	100 (9,1)*	7 (36,8)*	0,001
Delección/Duplicación (%)	26 (2,4)	0	NS
Poliploidía (%)	54 (4,9)	0	NS

Tabla 10: Resultados por origen de los ovocitos. Quedaron excluidas las pacientes >42 años. Test de Fisher y Chi-cuadrado. *P<0,05.

4.6 Análisis de los datos por localización geográfica.

En este apartado se analizaron el total de las muestras en función de la localización geográfica del laboratorio donde se realizó el análisis molecular de los restos abortivos. Las 2.531 muestras se distribuyeron en las siguientes zonas geográficas: España (n=394), USA/Canadá (n=1.708), Brasil (n=301), México/Latam (Latinoamérica) (n=394), Emiratos Árabes (EAU) (n=32) e India (n=30) (Tabla 10).

La tasa de informatividad osciló entre 99,9% y 83,3%. Los mejores resultados se obtuvieron en USA/Canadá, y fueron estadísticamente significativos cuando se compararon frente al resto de localizaciones geográficas excepto a México/Latam. Los grupos que mostraron diferencias significativas fueron los siguientes: España vs. USA/Canadá (97,4% vs. 99,9%; $p < 0,0001$); España vs. India (97,4% vs. 83,3%; $p = 0,003$); USA/Canadá vs. Brasil (99,9% vs. 98,7%; $p = 0,0006$); USA/Canadá vs. EAU (99,9% vs. 90,6%; $p < 0,0001$); USA/Canadá vs. India (99,9% vs. 83,3%; $p < 0,0001$); Brasil vs. EAU (98,7% vs. 90,6%; $p = 0,02$); Brasil vs. India (98,7% vs. 83,3%; $p = 0,0004$) y México vs. India (98,5% vs. 83,3%; $p = 0,01$).

La edad materna sólo fue estadísticamente significativa entre España vs. USA/Canadá ($36,9 \pm 4,8$ vs. $35,1 \pm 4,9$; $p < 0,0001$). En cuanto a la edad gestacional, hubo diferencias significativas comparando dos grupos, España vs. USA/Canadá ($8,5 \pm 2,4$ vs. $7,9 \pm 2,8$; $p < 0,001$) y España vs. Brasil ($8,5 \pm 2,4$ vs. $8,1 \pm 3,0$; $p < 0,001$). La edad paterna no reflejó ningún resultado estadísticamente significativo.

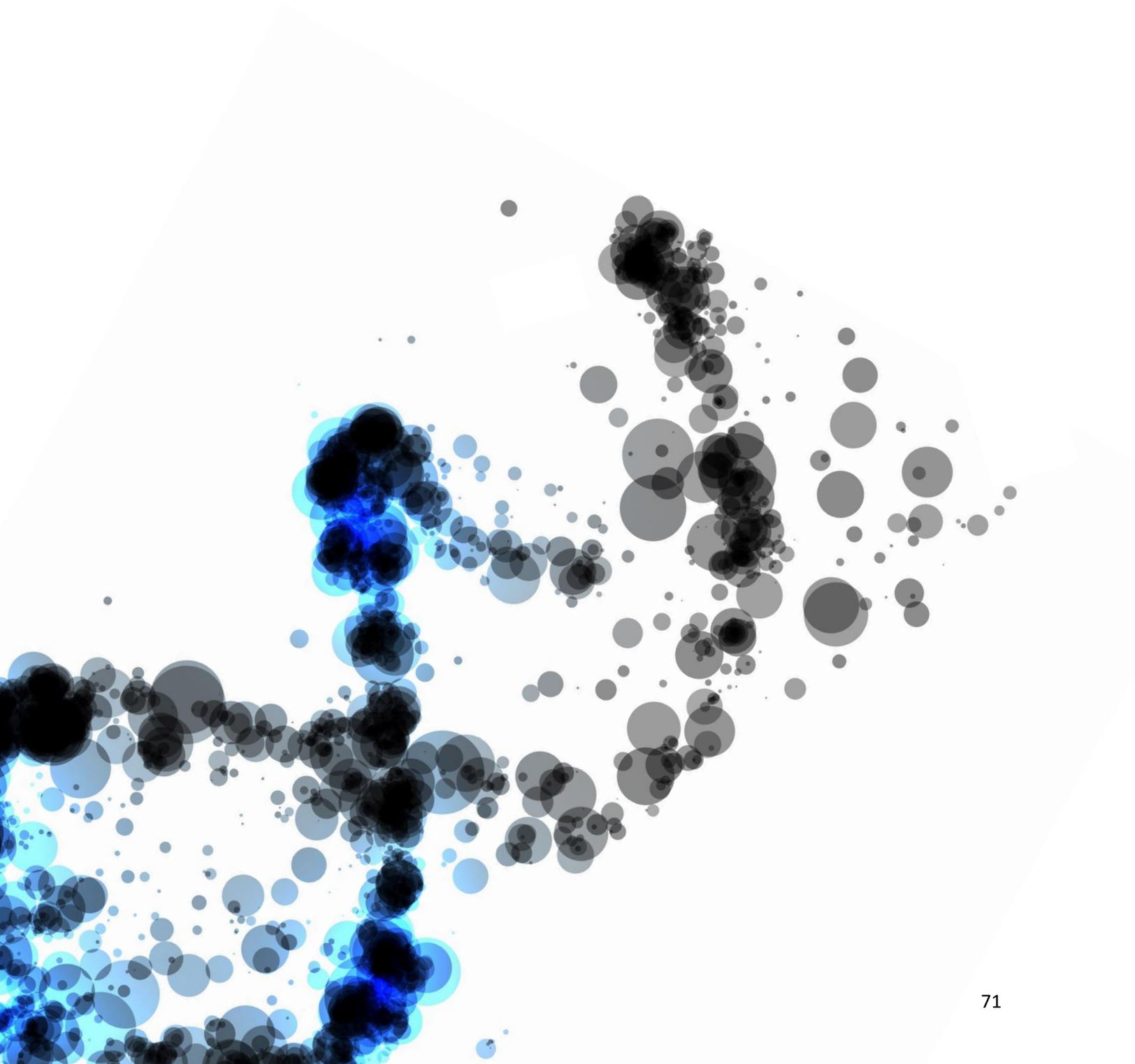
La incidencia de contaminación materna fue significativamente superior en EAU (31,0%) comparado con España (14,4%; $p = 0,02$); USA/Canadá (11,8%; $p = 0,005$) y Brasil (13,1%; $p = 0,02$).

En referencia a la incidencia de anomalías cromosómicas, el porcentaje superior se observó en Brasil (65,1%) y mostró diferencias significativas al compararlo con España (49,7%; $p = 0,002$) y USA/Canadá (52,1%; $p = 0,0001$).

	España	USA/Canadá	Brasil	México/Latam	EAU	India
No. Casos	394	1.708	301	66	32	30
Edad Materna (DE)	36,9 (4,8) ^g	35,1 (4,9) ^h	35,7 (3,9)	34,8 (5,8)	32,5 (5,2)	31,9 (4,6)
Edad Paterna (DE)	37,0 (5,6)	37,2 (5,5)	37,4 (6,2)	36,9 (6,2)	NR	33,9 (4,1)
Edad Gestacional (DE)	8,5 (2,4) ⁱ	7,9 (2,8) ^j	8,1 (3,0) ^k	8,4 (3,1)	9,5 (1,8)	8,3 (2,3)
Informativos (%)	383 (97,2) ^a	1 707 (99,9) ^b	297 (98,7) ^c	65 (98,5) ^d	29 (90,6) ^e	25 (83,3) ^f
Nº de casos con contaminación materna (%)	55 (14,4) ^l	201 (11,8) ^m	39 (13,1) ⁿ	13 (20,0)	9 (31,0) ^o	4 (16,0)
Resultados Normales (%)	165 (50,3)	722 (47,9)	90 (34,9)	19 (36,5)	9 (45,0)	11 (52,4)
Resultados Anormales (%)	163 (49,7) ^p	784 (52,1) ^q	168 (65,1) ^r	33 (63,5)	11 (55,0)	10 (47,6)

Tabla 11: Resultados por localización geográfica. Test de Fisher, Chi-cuadrado, Mann-Whitney y Kruskal-Wallis con test de comparaciones múltiples de Dunn. NR: No Reportado. $P < 0,05$. ab, $p < 0,0001$; bc $p = 0,0006$; af $p = 0,003$; be, bf $p < 0,0001$; ce, lo, no $p = 0,02$; cf $p = 0,0004$; df $p = 0,01$; ij, ik $p < 0,001$; mo $p = 0,005$; pq $p = 0,002$; qr $p = 0,0001$.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

La incidencia de aborto espontáneo en gestaciones espontáneas es de un 15-30%. La mayoría de ellos (~80%) ocurre antes de la semana 12 de embarazo, y las anomalías cromosómicas ocurren en el 45% de ellos (Coulam *et al.*, 1986).

Cuando esto sucede, es crucial saber el porqué de esa pérdida gestacional. Por una parte, sirve para darle una razón, una explicación a la paciente de lo que ha ocurrido y del por qué se ha detenido el embarazo. Por otra parte, va a ayudar al equipo médico a tomar una decisión más acertada a la hora de darle una recomendación a la pareja antes de que vuelvan a intentar conseguir el embarazo, ya sea en casa de manera espontánea o a través de un ciclo de reproducción asistida.

Hasta hace unos años, una de las pocas técnicas (y la más extendida) para realizar el estudio de restos abortivos era el cariotipo convencional. El problema más frecuentemente asociado al cariotipo y ya comentando anteriormente es el fallo o no crecimiento del cultivo en un elevado porcentaje de casos, así como la elevada incidencia de contaminación materna. Si el resultado del cariotipo es normal femenino, no podemos saber si dicho resultado proviene de la madre o del feto (Shearer *et al.*, 2001; Murugappan *et al.*, 2014; Lathi *et al.*, 2014; Babu *et al.*, 2018).

Por otro lado, en aquellos casos en los que ha fallado el cultivo se ha descrito que al realizar un estudio molecular se observaba una tasa de aneuploidía similar a la observada en los casos en los que el cultivo no había fallado (Zhou *et al.*, 2016), por lo que se estarían perdiendo resultados anormales (y normales) por fallo del cultivo.

Es por ello por lo que existe una gran necesidad de realizar el estudio cromosómico de los restos abortivos mediante técnicas novedosas, como puede ser la secuenciación masiva, junto con estudios adicionales, como los STRs, para optimizar la obtención de resultado cromosómico informativo en casos de pérdida gestacional y con ello poder realizar un adecuado asesoramiento reproductivo. Hoy en día se realizan en distintos laboratorios los estudios de restos abortivos con diferentes técnicas moleculares como aCGH (Zhou *et al.*, 2016) o SNP array (Lathi *et al.*, 2014). Pero hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el que se presenta un número tan elevado de datos analizando restos abortivos mediante NGS.

5.1 Discusión de los datos según la técnica molecular utilizada.

En la presente tesis doctoral, uno de los estudios más importantes que se quiso realizar fue valorar si las dos tecnologías que se habían utilizado para el estudio molecular de restos abortivos podían ser comparables entre sí. La validación de la técnica de NGS y su comparación con los aCGH ya se había realizado con antelación con líneas celulares, biopsias embrionarias y ADN genómico (datos no presentados). No hubo diferencias entre las técnicas, por lo que los resultados fueron comparables y se pudo realizar el resto de los estudios con el número total de muestras.

Se destacó en el apartado de resultados la alta tasa de informatividad, con un 99% de resultados informativos para el total de los casos analizados, siendo de 99,1% para aCGH y 99% para NGS. Es muy importante este porcentaje de resultados informativos, porque una de las principales desventajas de la técnica “gold standard” (cariotipo convencional) es que presenta una gran cantidad de casos con fallo en el crecimiento en el cultivo (se ha publicado desde el 10% hasta el 60%) como comentábamos en el apartado anterior (*Fritz et al., 2001; Lathi and Milki, 2002; Stephenson et al., 2002; Nikitina et al., 2005; Robberecht et al., 2012*).

El porcentaje de muestras que presentó contaminación materna fue de 12,8%. Ambas técnicas fueron comparables y no tuvieron diferencias significativas entre ellas (10,8% con aCGH vs. 13,6% con NGS). Algunos estudios utilizando técnicas moleculares como los SNP microarray citan que el porcentaje de contaminación materna supera el 20% (22%) (*Lathi et al., 2014*). Nuestro grupo realizó un estudio interno (datos no publicados) previo al comienzo del programa clínico en el cual se realizaron extracciones de ADN en diferentes localizaciones de la muestra de tejido fetal recibida. En estas muestras, en primer lugar, se realizó análisis con STRs y se comparó con el resultado de ADN materno para valorar el mínimo número de muestras necesarias para optimizar la identificación de una submuestra sin contaminación materna. Dicho multi-muestreo comprende tres, seis o hasta nueve disecciones de los restos abortivos en lugar de solo una. En dicho estudio pudimos comprobar que, tras tres muestras analizadas cuyo resultado es consistente con un perfil de contaminación materna, no es necesario realizar más disecciones para ver si se puede encontrar de alguna manera tejido fetal. Gracias al multi-muestreo, se consiguió en nuestro laboratorio disminuir el porcentaje de contaminación materna al valor mencionado con anterioridad, por debajo del 13%.

En nuestro estudio, el porcentaje de resultados cromosómicamente anormales fue del 53,5% de los restos abortivos analizados, 54,1% con aCGH vs. 53,2% con NGS, siendo las dos técnicas comparables. La incidencia de trisomías (74,3%), fue similar a lo publicado por otros grupos al igual que las monosomías para los cromosomas sexuales, que representaron casi el 10% (9,4%) de las muestras anormales, siendo en su gran mayoría 45,X (*Hassold, 1980; Shah et al., 2017; Soler et al., 2017*).

Con estos resultados pudimos concluir que la combinación de la tecnología de NGS con STRs, con resultados informativos en el 99% de los casos y con niveles de contaminación materna inferiores al 13% representa una estrategia óptima para el análisis de restos abortivos dentro de la práctica clínica.

Como ya hemos mencionado con anterioridad, al ser comparables los resultados con aCGH y con NGS, para la discusión pormenorizada de los diferentes tipos de anomalías cromosómicas vamos a considerar a continuación los resultados totales.

En el análisis por cromosoma que efectuamos, vimos que la gran mayoría de las monosomías hacen referencia a la monosomía de cromosomas sexuales, 45,X en gran parte de los casos. En cuanto a las monosomías autosómicas, la presencia de monosomía para el cromosoma 21, aunque con muy baja frecuencia, es la que tiene mayor incidencia, tal y como se ha descrito en diferentes estudios (*Martínez et al., 2010; Campos-Galindo et al., 2015*). Algunos autores han descrito que es la única monosomía autosómica presente en restos abortivos (*Hardy and Hardy, 2015*). Sin embargo, en nuestro trabajo también pudimos observar otras monosomías autosómicas en el material de aborto, tales como monosomías para los cromosomas 4, 13, 15 y 22. Estos hallazgos vienen avalados por algunos estudios que encontraron, además de la ya citada monosomía 21, monosomías para el cromosoma 22 (*Campos-Galindo et al., 2015*), para el cromosoma 16 (*Russo et al., 2016*) o monosomías para los cromosomas 8 y 13 (*Soler et al., 2017*). Hasta donde sabemos, es la primera vez que se reportan monosomías para los cromosomas 4 y 15 en restos abortivos.

Las trisomías siguen un patrón similar al de los estudios publicados anteriormente (*Hassold et al., 1996; Martínez et al., 2010; Campos-Galindo et al., 2015; Soler et al., 2017*), donde los cromosomas que tuvieron mayor incidencia en los análisis de restos abortivos fueron el cromosoma 16 y el 22, seguidos por los cromosomas 13, 15, y 21. La trisomía para el cromosoma 1 no apareció en ninguno de los estudios anteriormente citados, ni tampoco en el nuestro. Otras anomalías cuya incidencia fue muy baja fueron las trisomías para los cromosomas 3, 5, 12, 17 y 19.

Una vez efectuado el análisis general y por cromosoma a través de las técnicas de aCGH y NGS y no habiendo encontrado diferencias significativas entre ambas, se consideró que para los análisis posteriores se podrían incluir los resultados totales sin subdividirlos en función de la técnica molecular utilizada.

5.2 Discusión de los datos según la edad materna.

A medida que aumenta la edad materna, aumenta también la probabilidad de que se produzca una detención del embarazo de manera espontánea, pasando de ser de alrededor del 20% cuando la mujer tiene menos de 35 años, a ser superior al 40% cuando tiene más de 40 años y llegando incluso a superar el 90% cuando la mujer tiene más de 45 años (*Heffner, 2004*). Estos datos van en consonancia con nuestros porcentajes de restos abortivos anormales, los cuales son de casi un 50% cuando las pacientes tienen menos de 35 años, pasando por casi un 65% cuando la paciente tiene entre 35 y 40 años, llegando hasta un 70% cuando la mujer tiene entre 41 y 42 años.

Si comparamos los resultados obtenidos con los resultados que se obtienen en embriones que se han sometido a un estudio de PGT-A, nos encontramos con resultados similares, donde a mayor edad materna, mayor porcentaje de aneuploidías se ven en los embriones (*Rodrigo et al., 2014*). Los embriones aneuploides representan al menos el 10% de los embarazos y, para las mujeres que se acercan al final de su vida reproductiva, la incidencia puede superar el 50%. Los errores que conducen a la aneuploidía casi siempre ocurren en el ovocito, pero estudios recientes han arrojado nueva luz sobre la complejidad de los defectos meióticos, proporcionando evidencia de que el aumento de los errores relacionados con la edad en la mujer no es debido a un solo factor, sino a una interacción entre características de la ovogénesis y una combinación de factores endógenos y exógenos (*Nagaoka et al., 2013*).

También hubo correlación entre la edad y el porcentaje de aneuploidías múltiples, tanto en embriones preimplantatorios (*Rodrigo et al., 2014*) como en nuestro estudio, donde se observó que a medida que aumentaba la edad materna de la mujer, el porcentaje de abortos con dos o más anomalías cromosómicas fue mayor.

Todo lo contrario ocurrió con la poliploidía y la monosomía para los cromosomas sexuales (45,X). A mayor edad de las mujeres, menor fue el porcentaje de abortos con poliploidía o con monosomía 45,X, estando en consonancia con la literatura previamente publicada (*Neuber et al., 1993*).

5.3 Discusión de los datos según la edad gestacional.

Una vez analizadas las muestras según la edad gestacional, se comprobó que cuanto menor fue la edad gestacional a la que se produjo la pérdida gestacional, mayor fue el porcentaje de contaminación materna. A edades gestacionales tempranas, hay menor proporción de tejido fetal respecto al materno en las muestras obtenidas, lo que dificulta la selección y aislamiento de la parte correspondiente al feto al realizar las extracciones de ADN. El tejido embrionario que se puede identificar con una separación cuidadosa del tejido materno solo puede representar del 1% al 2% del tejido total extraído mediante dilatación y curetaje (*Lathi et al., 2014*).

En nuestro trabajo se observó que, cuanto menor fue la edad gestacional a la que se detuvo el embarazo, mayor era el porcentaje de aneuploidías múltiples. Al igual que ocurre con los embriones previos a su implantación, aquellos que tiene mayor número de aneuploidías se bloquean antes en su desarrollo (*Rubio et al., 2017*). O como en el caso de la morfocinética, donde se observó que aquellos embriones con ciertos parámetros morfocinéticos se correlacionaban con embriones caóticos con un mayor número de aneuploidías y que además tendían a bloquearse sin llegar a alcanzar el estadio de blastocisto (*Nogales et al., 2017*).

Los niveles más elevados de aneuploidías se dieron entre la semana 9 y la semana 12 de gestación. Esto marca la barrera biológica del primer trimestre. A partir de la semana 12 vimos que los niveles de aneuploidías en los restos abortivos se redujeron casi a la mitad, pasaron de un 60-65% entre las semanas 9-12 a tan solo un 34%.

Como ya se comentaba en la sección de la introducción de esta tesis doctoral, sólo el 0,6% de las anomalías cromosómicas son viables (*Machin, 1974; Nielsen and Sillesen, 1975; Boué and Boué, 1976*). Esto es debido a la letalidad que conlleva el que el embrión/feto sea portador de una determinada anomalía cromosómica, lo que en la mayor parte de los casos hace que se produzca la pérdida gestacional.

5.4 Discusión de los datos según el origen de los ovocitos.

Teniendo en cuenta lo comentado en apartados anteriores donde el porcentaje de aneuploidías en los restos fetales aumentaba a medida que aumentaba la edad materna, parece lógico encontrarnos con resultados de aneuploidía menores en las pacientes cuyo aborto vino precedido del uso de ovocitos donados en TRA, ya que las Clínicas utilizan para este fin donantes jóvenes muchas de las veces con gestación probada. En este sentido, han sido publicado resultados de restos abortivos cuyo porcentaje de aneuploidía es superior en abortos tras gestación espontánea (40,6 %) o con ovocitos propios tras TRA (62,7%) frente a los de mujeres que habían abortado tras un ciclo de ovodonación (12,8%) (*Campos-Galindo et al., 2015*). Nuestros resultados confirmaron sus hallazgos, con un tamaño muestral superior, y con una diferencia entre grupos de un 25%. El grupo de ovocitos propios ya fuera por gestación espontánea en casa o tras TRA tuvo un porcentaje de aneuplodías del 54,5% frente al 29,7% que tuvo el grupo que utilizó ovocitos de donante ($p=0,001$).

En lo que se refiere al análisis de las monosomías para los cromosomas sexuales, se vio una diferencia estadísticamente significativa y aumentada en pérdidas gestacionales de parejas que habían utilizado ovocitos de donante (9,1% vs. 36,8%; $p=0,001$). Nosotros pensamos que esto pueda ser debido al factor masculino. En estudios hechos en pacientes con factor masculino, analizando sus espermatozoides se ha

visto que un aumento de la disomía para los cromosomas sexuales genera tasas elevadas de embriones potencialmente viables cuyos cromosomas sexuales se ven afectados. Los hombres infértiles con una disomía aumentada para los cromosomas sexuales en los espermatozoides tendrían un riesgo elevado de generar embriones aneuploides potencialmente viables (*Rodrigo et al., 2010*). De la misma manera, parejas que han tenido una gestación o un aborto previo con aneuploidía para los cromosomas sexuales presentaron un aumento significativo en sus espermatozoides de las disomías para los cromosomas sexuales en comparación con el grupo control (0,59% vs. 0,20%; $p < 0,0005$), pudiendo así generar embriones aneuploides (*Al-Asmar et al., 2012*). En parejas con aborto recurrente donde se había utilizado donación de óvulos, las disomías para los cromosomas sexuales en el semen analizado del marido estaban aumentadas significativamente frente al grupo control (1,0% vs. 0,37% $p < 0,05$) (*Rubio et al., 1999*). Estos embriones son los que podrían dar lugar posteriormente a abortos aneuploides. Se ha descrito que existe un aumento en la incidencia de la monosomía X (40,0% vs. 5,33% $p < 0,001$) y una disminución de las poliploidías (5,88% vs. 21,23% $p < 0,06$) en los abortos espontáneos después de la ICSI, método que probablemente se utilizó en los TRA en el grupo que utilizó donación de óvulos (*Martínez et al., 2010*).

Nuestros resultados indican que en las parejas que tienen abortos después de una donación de ovocitos, se debe considerar la posible contribución del factor masculino. Y si se descarta el factor masculino, las causas cromosómicas no entrarían entre las probables como causa de AE o AR.

5.5 Discusión de los datos según la localización geográfica.

Lo primero que llamó la atención cuando se analizaron los datos de las muestras por localización geográfica fue el porcentaje de resultados informativos. Se observó que, en EAU la informatividad fue significativamente menor que en el resto de las localizaciones, al igual que ocurrió incluso en mayor medida con India. Cuando se observaron estos datos, se revisaron todos los protocolos y se llegó a la determinación de que pudo haber un problema con el envío, ya que el mismo se realiza a temperatura ambiente y en zonas geográficas como Oriente medio o India, la temperatura puede ser lo suficientemente elevada como para poder dañar la muestra. Desde inicios de 2018 se están haciendo los envíos refrigerados, y parece que el problema ha sido subsanado.

La edad de las pacientes por localización geográfica mostró que las mujeres de EAU e India tenían edades cerca de los 30 años, las de USA/Canadá, Brasil y México/Latam estaban cerca de los 35 años y finalmente las de España que tuvieron una media cercana a los 37 años. A pesar de la diferencia de edad, sólo fue estadísticamente significativa la diferencia de resultados anormales entre Brasil (65,1%) frente a España (49,7%; $p = 0,002$) y a USA/Canadá (52,1%; $p = 0,0001$). Esto puede ser debido a que los casos de Brasil son casi en exclusiva procedentes de pacientes que se habían sometido previamente a tratamientos de reproducción asistida, llegando a valores similares de aneuploidías encontrados en otros estudios que

diferenciaban a pacientes con embarazo espontáneo de pacientes tras TRA (*Campos-Galindo et al., 2015*).

El porcentaje de contaminación materna fue estadísticamente significativo cuando se compararon los casos de EAU frente a los de España, USA/Canadá y Brasil. Esto puede ser debido a que las muestras que llegaban de esa localización geográfica fueron en su mayor parte recolectadas en casa de la misma paciente, no siendo efectuada la recogida ni en condiciones hospitalarias ni por personal profesional que pudieran garantizar la esterilidad de la recogida y la estabilidad de la muestra, así como que pudiera encontrarse tejido fetal y no solo tejido materno. No se ha publicado ningún estudio describiendo la incidencia de anomalías cromosómicas en restos abortivos. Sin embargo, sí que se ha publicado un estudio a nivel de embriones preimplantatorios. En este estudio se comparó la incidencia de aneuploidías embrionarias en distintas etnias (europea, africana, sureste asiático o asiático central/del sur) en más de 2.300 pacientes. Los datos indicaron que no existía un riesgo particular asociado a la etnia de los pacientes ya que no encontraron diferencias significativas entre ellos (*Franasiak et al., 2016*). En otro estudio donde se compararon pacientes de etnia caucásica frente a asiáticos, encontraron que, si bien pudo haber una ligera diferencia en las tasas de llegada a blastocito, no hubo diferencia en las tasas de aneuploidías (*Kort et al., 2015*). Todo esto nos hace pensar que en nuestro estudio la diferencia en el porcentaje de aneuploidías en los restos abortivos entre diferentes localizaciones geográficas no fue debida a la etnia de los pacientes, sino que estaría más relacionada con que el porcentaje de restos abortivos provengan de tratamientos de infertilidad en cada localización geográfica.

5.6 Limitaciones.

A continuación, pasamos a discutir las limitaciones principales que nos hemos encontrado durante la realización del estudio y en el análisis de los datos recopilados:

- **Diseño del estudio:** Se trata de un estudio prospectivo observacional con las limitaciones inherentes que esto conlleva a la hora de la completa recopilación de variables de interés como podría ser si la mujer sufrió la pérdida gestacional tras embarazo espontáneo o tras TRA, o la concentración espermática de los varones para relacionarlo con el factor masculino. En este sentido, como hemos comentado en el estudio por origen de los ovocitos se tuvo que excluir a las pacientes de más de 42 años por la sospecha de que en este grupo hubiera podido incluirse alguna muestra procedente de gestación con ovocitos donados que no hubiera sido identificada como tal.

- **Aislamiento de tejido fetal en la colección de muestras:** Una de las limitaciones importantes para identificar o descartar contaminación materna y poder proporcionar resultados precisos en la mayoría de las muestras es la correcta recolección de tejido fetal. Las recomendaciones generales para la recolección adecuada de tejido fetal serían las siguientes: tomar una muestra de tejido preferiblemente pequeña pero limpia sin sangre, ni coágulos y lavar suficientemente con solución salina estéril, dejando la muestra de tejido adecuadamente embebida en la solución acuosa utilizada.
- **Presencia de mosaicismo de bajo grado:** Sabiendo que cada tecnología tiene sus propias limitaciones, datos recientes han demostrado que puede existir hasta un 33% de discrepancias entre los resultados debido a posible contaminación materna (en nuestro caso identificada con la inclusión del análisis con STRs), reordenamientos cromosómicos equilibrados (si no se dispone de cariotipos de los progenitores), poliploidía (también detectada en nuestro caso con STRs) y por último mosaicismo placentario, que no podríamos identificar si el porcentaje de células anormales fuera inferior a 20-30%. Pero independientemente de la plataforma que se utilizó, el mosaicismo se detectó en el 18% de todas las muestras (*Shah et al., 2017*). Más específicamente, el mosaicismo confinado a placenta es una condición caracterizada por la discrepancia entre el estatus cromosómico/genético del bebé y la placenta. Aproximadamente el 2% de los embarazos viables estudiados mediante análisis de vellosidades coriónicas entre las 9 a 11 semanas de gestación están confinados a la placenta (*Shah et al., 2017*).
- **Detección de del/dup por debajo de la resolución de la plataforma:** La tecnología NGS mejora la detección de del/dup ofreciendo una mejor resolución que el cariotipo convencional. Sin embargo, algunas del/dup podrían estar por debajo de la resolución de las plataformas (6Mb), en cuyo caso podrían no detectarse (*Qi et al., 2016*). Esas microdeleciones "de novo" representarían menos del 1% de los casos.

5.7 Consejo genético y reproductivo tras la pérdida gestacional.

La pérdida gestacional es sin duda un duro golpe para los pacientes en su deseo de ser padres, no sólo a nivel de salud, sino también a nivel emocional e incluso económico. Por ello, hemos establecido un protocolo el cual puede ser de fácil interpretación para los equipos médicos y poder así aconsejar de la mejor manera a los pacientes tras haber sufrido la pérdida gestacional.

Las indicaciones y el protocolo de análisis de restos fetales y de toma de decisiones se detalla en la Figura 20 y consiste básicamente en los siguiente:

- Después de un aborto espontáneo en el primer trimestre, se recolecta el material de restos abortivos y la sangre materna. Los restos abortivos se evalúan para el cribado de 24 cromosomas por NGS.
- Si se encuentra un resultado normal, debemos descartar contaminación materna realizando un análisis de STRs. Si el análisis muestra que no hay contaminación materna, le recomendamos al equipo médico que considere otras posibles causas de aborto.
- Si el resultado es anormal, podría ser una aneuploidía cromosómica completa o una pequeña deleción (pérdida) o duplicación (ganancia) de una parte del cromosoma. Si se encuentra una del/dup anormal, recomendamos verificar si la anomalía es "*de novo*" o hereditaria. En algunos casos, el resultado podría sugerir la presencia de una reorganización cromosómica equilibrada en uno de los miembros de la pareja. En este caso, recomendaríamos realizar un cariotipo en ambos miembros para establecer el riesgo de aborto involuntario en futuras gestaciones. Ya sea "*de novo*" o un resultado anormal heredado, recomendaríamos PGT-A en casos donde se sospeche origen "*de novo*", o PGT-SR en casos de reordenamientos estructurales identificados en cariotipo de los progenitores.
- Como ya hemos mencionado con anterioridad, en casos de abortos tras gestación con donación de ovocitos, el análisis cromosómico de los espermatozoides, previo a una próxima donación podría resultar también de utilidad.
- Otras opciones podrían ser el cambio de gametos o la prueba prenatal.

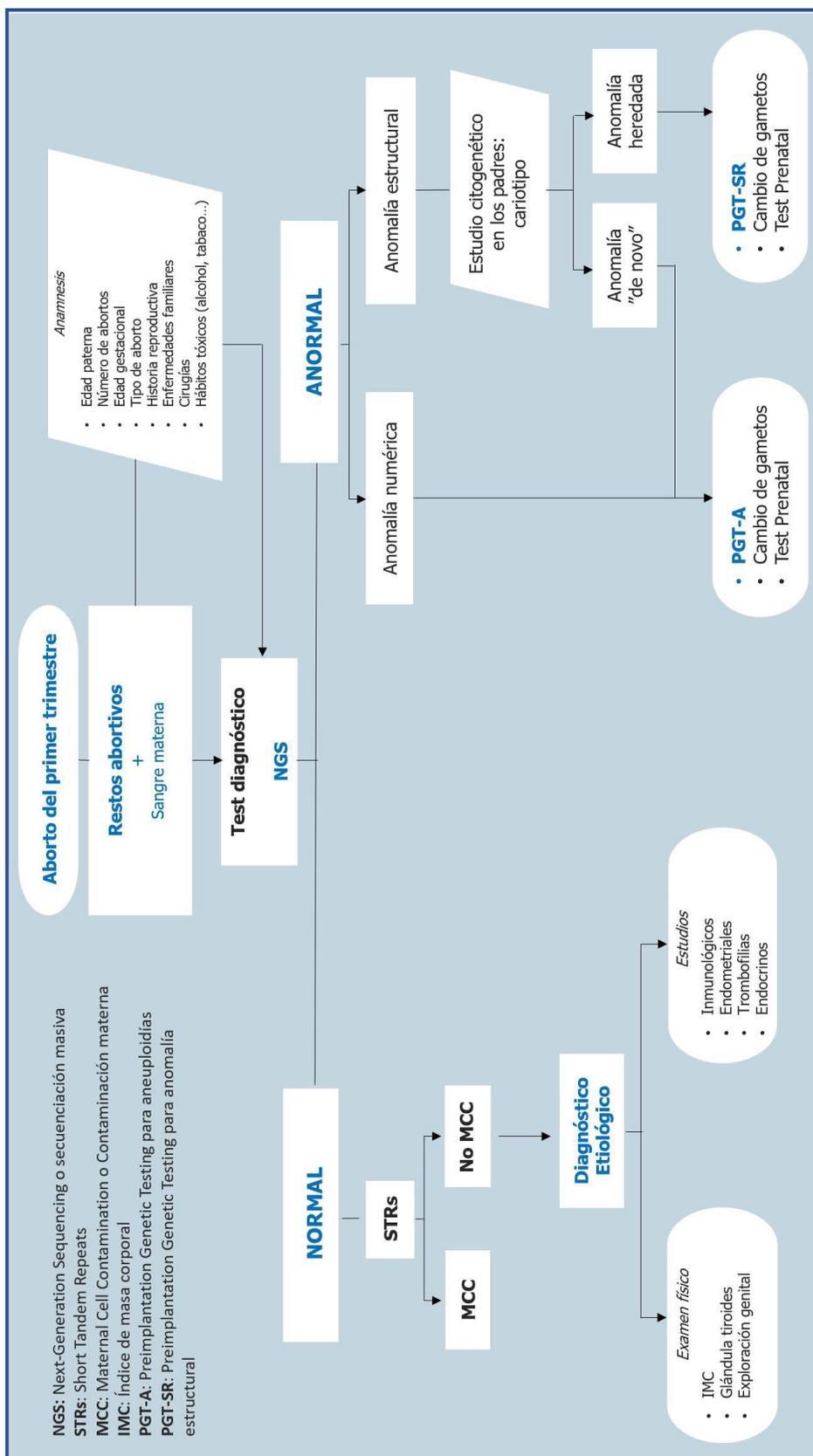
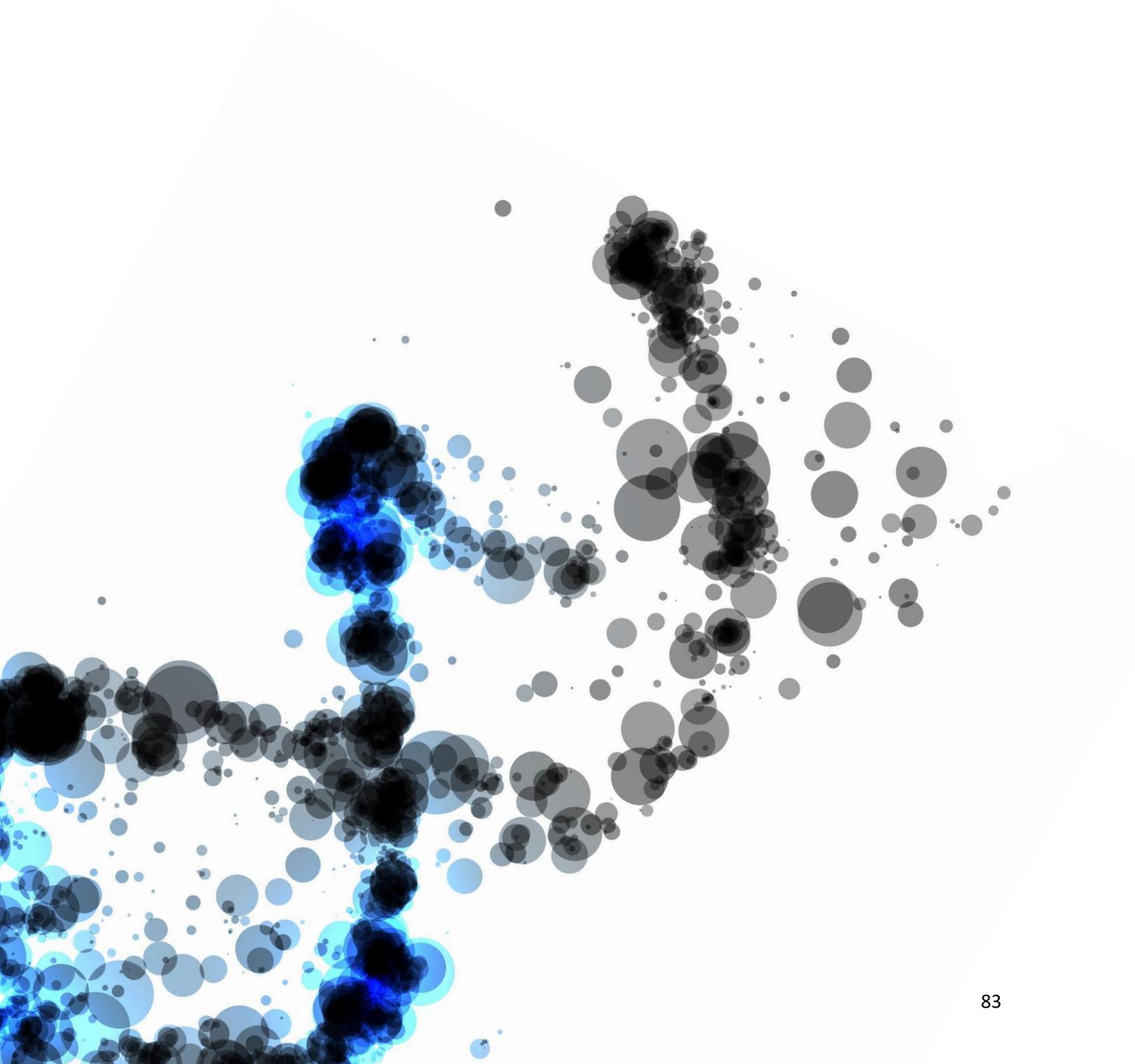


Figura 20. Diagrama de flujo, protocolo de análisis de restos fetales y toma de decisiones.

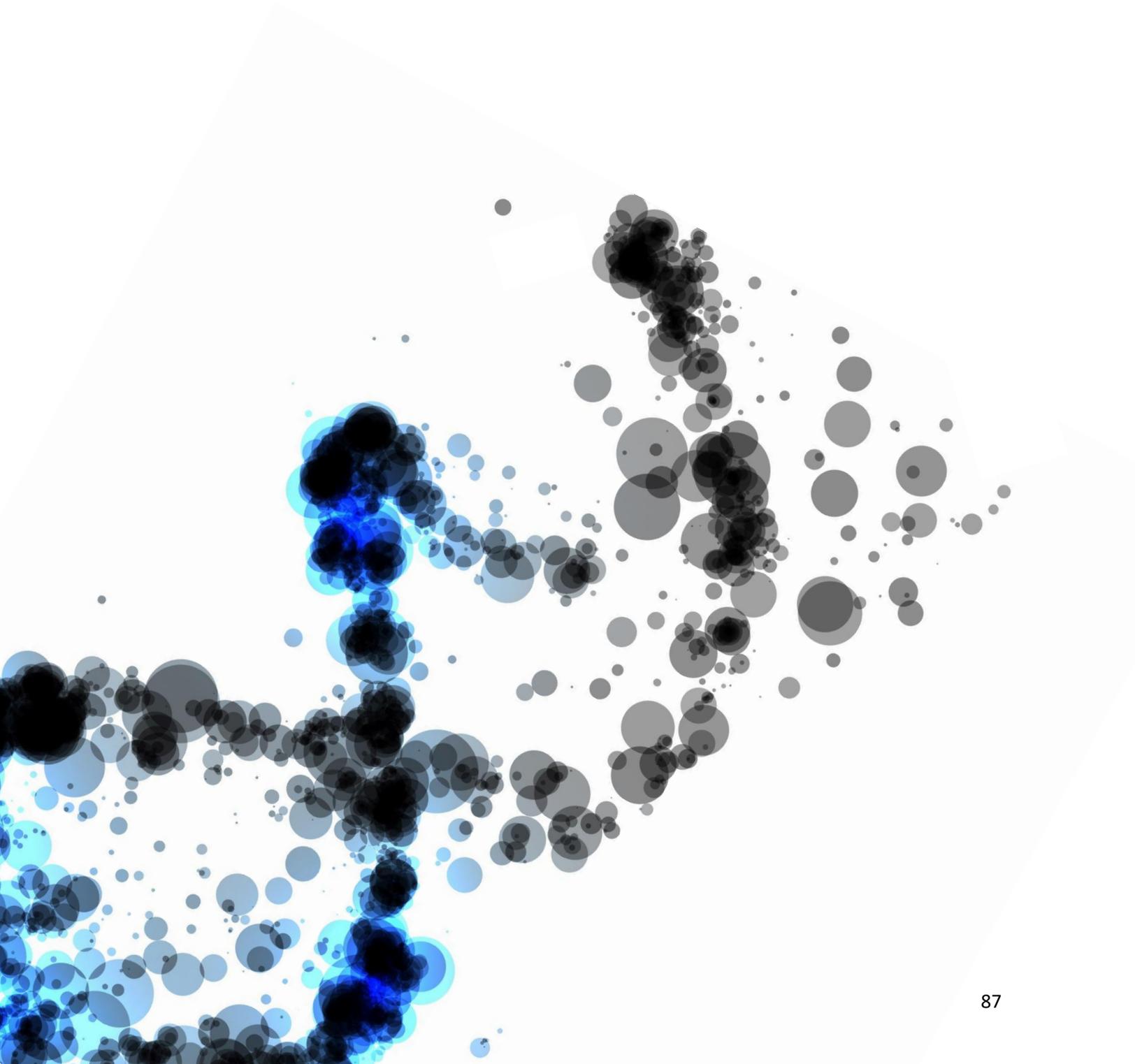
CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

1. Las técnicas moleculares de aCGH y más recientemente la NGS, combinadas con el uso de STRs para identificar el origen del ADN analizado, permiten aumentar la eficacia del análisis de anomalías cromosómicas de los restos abortivos comparado con las técnicas de citogenética convencional, mejorando el porcentaje de muestras con resultados informativos y disminuyendo la tasa de falsos negativos y positivos originados por la contaminación con ADN de origen materno.
2. La incidencia de anomalías cromosómicas totales aumenta a medida que aumenta la edad materna, sobre todo las aneuploidías múltiples y trisomías. Sin embargo, la proporción de anomalías para los cromosomas sexuales y las poliploidías muestran una correlación inversa con la edad materna. La incidencia de las del/dup no se ve afectada por la edad materna.
3. En el análisis de la edad gestacional se observa mayor incidencia de contaminación materna a menor edad gestacional. La incidencia de anomalías cromosómicas disminuyó con el aumento de la edad gestacional, a excepción de las anomalías para los cromosomas sexuales y las del/dup, que aumentaron su prevalencia con la edad gestacional.
4. En cuanto al origen de los ovocitos, el porcentaje de anomalías cromosómicas fue significativamente mayor en gestaciones espontáneas y gestaciones tras TRA con ovocitos propios, frente a gestaciones con donación de ovocitos. En el grupo de donación de ovocitos destaca la mayor incidencia de anomalías cromosómicas para los cromosomas sexuales, posiblemente relacionadas con un factor masculino asociado.
5. La localización geográfica de los laboratorios mostró un impacto significativo en el porcentaje de muestras informativas y con contaminación materna que relacionamos con las condiciones del transporte de las muestras. La mayor incidencia de anomalías cromosómicas se observó en los laboratorios que reciben la mayoría de las muestras procedentes de TRA.

ANEXOS





χ POC (PRODUCTS OF CONCEPTION) FORMULARIO PARA SOLICITUD DEL TEST

INFORMACIÓN DEL PACIENTE

Nº de historia: _____ Fecha: _____

Apellidos Paciente: _____ Nombre: _____

Fecha de Nacimiento: _____

Dirección: _____ Ciudad: _____ Código Postal: _____

Número de Teléfono: _____ Dirección e-mail: _____

INFORMACIÓN DEL CÓNYUGE

Apellidos: _____ Nombre: _____

Número de Teléfono: _____ Dirección e-mail: _____

INFORMACIÓN DE LA CLÍNICA

Clínica: _____ Médico Remitente: _____

E-Mail para la entrega de resultados: _____

Observaciones:

INFORMACIÓN DEL EMBARAZO

Fecha pérdida gestacional: _____ Edad gestacional (semanas): _____ Fecha recogida de la muestra: _____

- Embarazo con tratamiento de donación de óvulos
- Embarazo de feto único
- Embarazo de gestación múltiple (indicar el número de fetos): _____



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ANÁLISIS DE RESTOS FETALES O PRODUCTOS DE LA CONCEPCIÓN (POC) **Cribado de aneuploidías de los 24 cromosomas**

Por favor, revise este documento y póngase en contacto con su médico para cualquier consulta relacionada con este producto.

PROPÓSITO

Las anomalías cromosómicas pueden provocar fetos con malformaciones, abortos espontáneos o muertes neonatales. Las estimaciones de la frecuencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos van desde un 15% hasta un 60%.

En el caso de una interrupción temprana del embarazo o pérdida por aborto espontáneo, el diagnóstico de una anomalía cromosómica puede ser importante para la planificación de futuros embarazos.

Los estudios cromosómicos de productos de la concepción (POC) proporcionan información útil y ayudan a los pacientes y a los médicos en la determinación de las causas de los abortos involuntarios y, por tanto, del riesgo de recurrencia de pérdida de embarazos y el riesgo posterior de tener hijos con anomalías cromosómicas.

Las muestras de restos fetales o de productos de la concepción (POC) se analizarán mediante secuenciación masiva de 24 cromosomas (NGS) para determinar anomalías cromosómicas numéricas.

MÉTODOS

Análisis de la muestra materna

La muestra se recoge y se envía utilizando el kit de recogida de muestras Igenomix. Para descartar o detectar la contaminación con células maternas (CCM), será necesario obtener una muestra biológica de la madre, que se envía, normalmente, junto con la muestra POC.

Proceso de Prueba

Siempre que sea posible se identifica el tejido fetal frente al materno. El espécimen se limpia y se corta en pequeñas piezas y se extrae el ADN. El protocolo STR (del inglés: Short tandem Repeat) es utilizado para detectar o descartar la contaminación con células maternas. Posteriormente, la muestra de ADN de la muestra POC se analizará utilizando secuenciación masiva (NGS), para determinar anomalías cromosómicas numéricas. NGS ha sido previamente validada en muestras de células individuales (Francesco Fiorentino, et al Fert. Steril. 2014).

Conservación y destino de las muestras

Todas las muestras serán destruidas dentro de los 60 días posteriores a la emisión de los resultados. Para ello no será necesaria una solicitud por escrito.

RIESGOS Y LIMITACIONES

1. No todas las condiciones genéticas y/o todas las anomalías cromosómicas pueden ser detectadas. A continuación se detallan las condiciones que no podrían ser detectadas:
 - Existen múltiples anomalías cromosómicas, incluyendo translocaciones equilibradas e inversiones, que este test no puede testar.
 - Bajos niveles de mosaicismo cromosómico.
 - Las pruebas de POC no analizan los genes específicos y no pueden detectar afecciones causadas por mutaciones genéticas individuales, como la anemia de células falciformes, la fibrosis quística o la enfermedad de Tay-Sachs.
 - Las pruebas de POC no pueden detectar algunas tetraploidías, como la 92, XXXX o 92, XXYY, pero detectará las triploidías 69, XXY, 69, XXX, y las tetraploidías 92, XXXY y 92, XYYY.
 - Disomía Uniparental.
 - Las trisomías completas de cromosomas acrocéntricos no se podrán distinguir de las trisomías, debido a una translocación Robertsoniana (implica a los cromosomas 13, 14, 15, 21, o 22) o isocromosomas en uno de los padres.
 - Otras causas de aborto espontáneo todavía no identificadas.
2. Se informará sobre las pérdidas o duplicaciones de material cromosómico mayores de 10 MB.
3. Riesgo de diagnóstico erróneo. Esto se puede producir debido a la falta/error de identificación de las muestras, datos inexactos relacionados con las relaciones familiares, mosaicismo u otras anomalías genéticas no identificadas.
4. Probabilidad de contaminación de células madre (CM). Estos resultados no son procesables.
5. Existe la posibilidad de que ocurran problemas impredecibles e incontrolables con el transporte, tales como aquellos relacionados con el clima y el transporte aéreo, u otras circunstancias fuera del control, las cuales no permitirían la obtención de resultados en el tiempo previsto. También existe la posibilidad de que la muestra recibida en el laboratorio sea inaceptable para su análisis, y por tanto, los resultados no puedan ser obtenidos a partir de la muestra proporcionada.



BENEFICIOS

Las pruebas de POC proporcionan más información y de manera más rápida que el tradicional cariotipo citogenético, con mayor probabilidad de obtención de resultados. La técnica de NGS combinada con el análisis de STR detecta cromosomas adicionales o ausentes, pérdidas o duplicaciones, así como la contaminación de células maternas, al comparar con los resultados obtenidos en la muestra materna. Los resultados de las pruebas se envían a los médicos dentro de los 7 días hábiles siguientes a la recepción de la muestra, y tiene una tasa de fracaso de resultados en ausencia de contaminación materna menor del 1%.

INFORMACIÓN CONFIDENCIAL

Igenomix mantiene sus datos personales y resultados analíticos de manera confidencial, cumpliendo con la legislación vigente. Las Autoridades Sanitarias podrán tener acceso a la revisión de sus datos médicos. Como parte de sus funciones profesionales, el personal con acceso a sus datos personales estará sujeto al secreto profesional permanente.

Con la firma de este documento doy mi consentimiento para que Igenomix, S.L. disponga de información acerca del resultado final de este análisis. Comprendo y acepto que el equipo clínico pueda ponerse en contacto conmigo para solicitarme datos clínicos adicionales.

Al firmar el presente documento Igenomix SL se reserva el derecho de contactar con Ud. a fin de informarle e invitarle a participar en futuros proyectos de investigación que tendrán lugar en algunos de sus centros colaboradores. En tal caso, y en confirmación con la legislación aplicable, el personal investigador de dicho centro le proporcionará toda la información necesaria y le invitará a participar solicitando su autorización escrita mediante la firma del correspondiente consentimiento informado específico aprobado por el Comité Ético de Investigación y/o Autoridades Sanitarias.

Conforme a la Ley 41/2002 Reguladora de la Autonomía del Paciente y a la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, el peticionario debe disponer del consentimiento del paciente para llevar a cabo las pruebas diagnósticas solicitadas y para el tratamiento de sus datos. De este modo, y como información a facilitar al paciente, hemos de comunicarles que los datos recogidos en el presente formulario serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley 15/1999, cuya titularidad corresponde a iGenomix S.L, con la finalidad de gestionar el estudio de diagnóstico en el formulario descrito, pudiendo ejercer el paciente en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, dirigiéndose a la siguiente dirección: iGenomix S.L, Calle Narcís Monturiol Estarrió nº11 Parcela B, Edificio Europark, Parque Tecnológico de Paterna 46980 - Paterna - Valencia, Spain.

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE

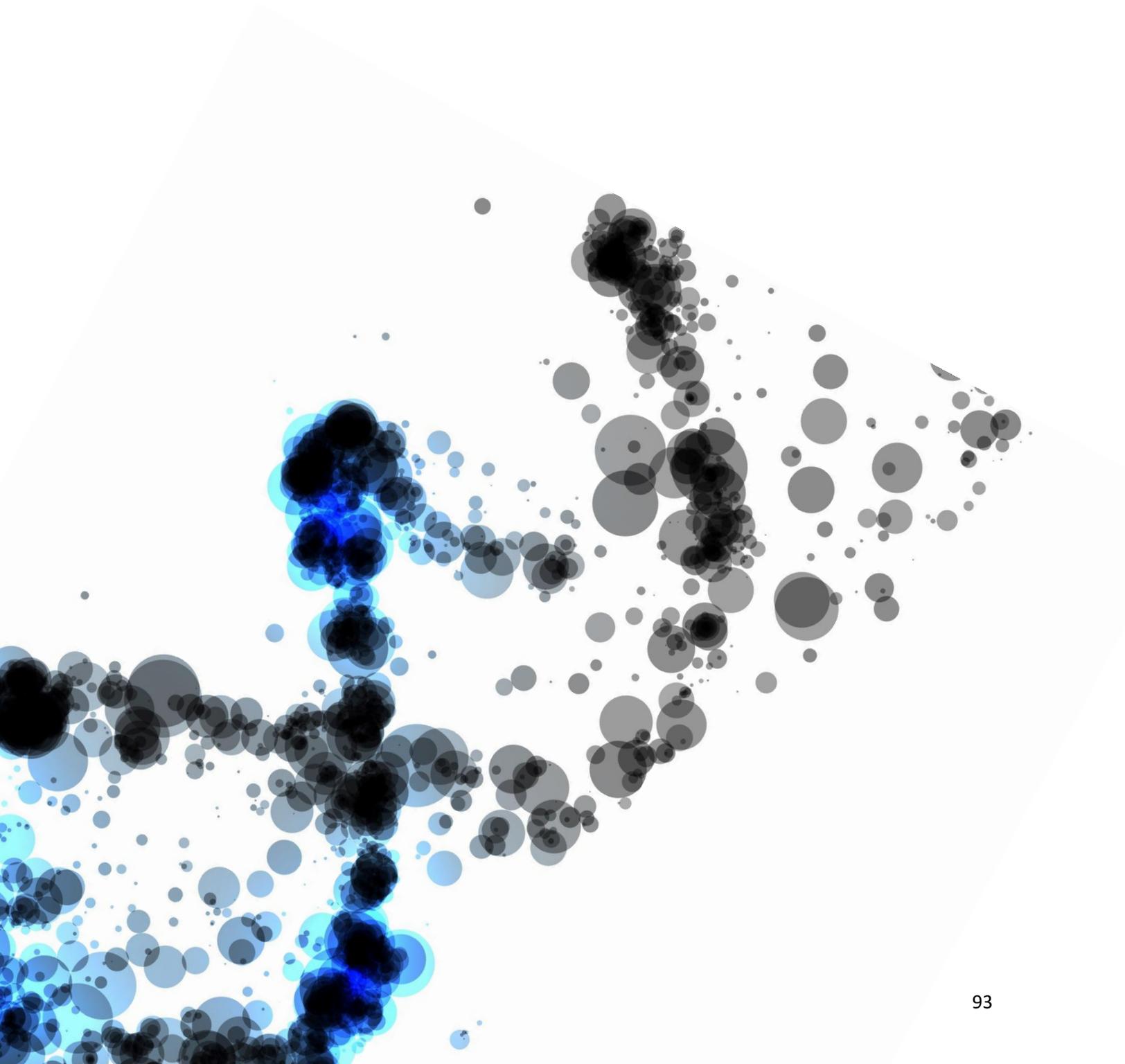
He leído o se me ha leído el formulario de consentimiento completo y he tenido la oportunidad de hacer preguntas a mi doctor acerca de la prueba, los riesgos, los beneficios y las alternativas antes de firmar el consentimiento informado. Solicito y autorizo a Igenomix a realizar pruebas POC en mis muestras de aborto espontáneo, enviadas conforme a lo solicitado en el formulario de remisión. Este consentimiento se aplica a esta y a todas las pruebas de POC que puedan realizarse en un futuro con Igenomix.

Reconozco que de las pruebas POC pueden derivarse beneficios y riesgos, algunos de los cuales pueden aún ser desconocidos. También reconozco que Igenomix utiliza una nueva tecnología con la que puede encontrar datos, nunca vistos, así como otras condiciones no previstas que pueden afectar a la calidad de los resultados. En consecuencia, tanto la prueba como el informe de los resultados, son susceptibles de perfeccionarse en el futuro.

Reconozco que las pruebas POC con Igenomix no pueden detectar todas las anomalías cromosómicas y no detectan trastornos causados por mutaciones en un único gen.

_____	_____	_____
Nombre de la Paciente o cónyuge	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del Doctor	Firma	Fecha

BIBLIOGRAFÍA



-
- ACOG practice Bulletin. Management of recurrent early pregnancy loss. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 78:179-190.
 - Ajayi OO, Charles-Davies MA, Arinola OG. Progesterone, selected heavy metals and micronutrients in pregnant Nigerian women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Afr Health Sci.* 2012 Jun;12(2):153-9.
 - 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 Jul;98(1):145-50.
 - Alecsandru D, García-Velasco JA. *Fertil Steril.* Why natural killer cells are not enough: a further understanding of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen. 2017 Jun;107(6):1273-1278. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.04.018. Epub 2017 May 10.
 - Aneuploidy: Incidence, origin and etiology. *Env Mol Mutagen* 1996; 28: 167-175.
 - Babu R, Van Dyke DL, Bhattacharya S, Dev VG, Liu M, Kwon M, Gu G, Koduru P, Rao N, Williamson C, Fuentes E, Fuentes S, Papa S, Kopuri S, Lal V. A rapid and reliable chromosome analysis method for products of conception using interphase nuclei. *Mol Genet Genomic Med.* 2018 Mar 24. doi: 10.1002/mgg3.381.
 - Bajnóczy K, Gardó S. "Premature anaphase" in a couple with recurrent miscarriages. *Hum Genet* 1993; 92: 388-390.
 - Bauld R, Sutherland GR, Bain AD. 1974. Chromosome studies in investigation of stillbirths and neonatal deaths. *Arch Dis Child* 49: 782-788.
 - Bellver J, Rossal LP, Bosch E, Zúñiga A, Corona JT, Meléndez F, Gómez E, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril.* 2003 May;79(5):1136-40.
 - Bellver J, Cruz F, Martínez MC, Ferro J, Ramírez JF, Pellicer A, Garrido N. Female overweight is not associated with a higher embryo euploidy rate in first trimester miscarriages karyotyped by hysteroembryoscopy. *Fertil Steril.* 2011 Oct;96(4):931-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.07.003. Epub 2011 Jul 30.

-
- Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kitaoka E, Sawada T, Nishiyama Y, Udagawa Y, Kurahashi H. Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet* 2009; 84:14-20.
 - Boué J, Boué A. Genetic counselling and prenatal diagnosis for chromosome anomalies. Use of study of spontaneous abortions. *Int J Gynaecol Obstet*. 1976;14(4):290-5.
 - Brocklehurst P, Hanna M, McDonald H. Interventions for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2: CD000262.
 - Buck Louis GM, Smarr MM, Sundaram R, Steuerwald AJ, Sapra KJ, Lu Z, Parsons PJ. Low-level environmental metals and metalloids and incident pregnancy loss. *Reprod Toxicol*. 2017 Feb; 2(69):68-74.
 - Bugge M, Collins A, Petersen M, Fisher J, Brandt C, Hertz J, Tranebjaerg L, de Lozier-Blanchet C, Nicolaides P, Brondum-Nielsen K, Morton N, Mikkelsen M. Non-disjunction of chromosome 18.1998. *Hum Mol Genet* 7:661-669.
 - Campana M, Serra A, Neri G. Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: a study of 269 balanced translocations. *Am J Med Genet*. 1986;24:341-56.
 - 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 May;32(5):839-48.
 - Campos-Galindo I, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Ayala-Álvarez G, Rubio Lluesa C. Tecnología BACs-on-Beads™ aplicada al diagnóstico prenatal y al estudio citogenético de restos abortivos. *Diag Pren*. 2012 Volume 23, Issue 2, April-June 2012: 76-82.
 - Chan YY, Jayaprakasan K, Zamora J, et al. The prevalence of congenital uterine anomalies in unselected and high-risk populations: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011; 17:761-771.
 - Chandley AC. The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human populations. *Ann Genet* 1981; 24: 5-11.

-
- Clifford K, Rai R, Watson H, et al. Does suppressing luteinizing hormone secretion reduce the miscarriage rate? Results of randomized controlled trial. *BMJ*. 1996; 312:1508-1511.
 - Coulam, C. (1986) Unexplained recurrent pregnancy loss. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 29, 999-1004.
 - Del Carmen Nogales M, Bronet F, Basile N, Martínez EM, Liñán A, Rodrigo L, Meseguer M. Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. *Fertil Steril*. 2017 Jan;107(1):229-235.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.019. Epub 2016 Nov 2.
 - Egozcue S, Blanco J, Vidal F, Egozcue J. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod* 2002; 17: 5-7.
 - Eichenlaub-Ritter U, Cucurkam S, Betzendahl I. Studies on the aneugenic properties of trichlorfon, a pesticide, vermicide and drug used in the treatment of Alzheimer patients. *Hum Reprod* 1999; 14 (Abstract Book 1): 240-241.
 - Ferro J, Martinez MC, Lara C, Pellicer A, Remohí J, Serra V. Improved accuracy of hysteroembryoscopic biopsies for karyotyping early missed abortions. *Fertil Steril*. 2003;80(5):1260-1264.
 - Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Spizzichino L, Cotroneo E, Cottone G, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014; 101:1375-82.
 - Fischer J, Colls P, Escudero T et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. *Fertil Steril* 2010 Jun;94(1):283-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.060. Epub 2009 Dec 24.
 - Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. 2013. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 132: 1001-1013.
 - Franasiak JM, Olcha M, Shastri S, Molinaro TA, Congdon H, Treff NR, Scott RT Jr. Embryonic aneuploidy does not differ among genetic ancestry according to continental origin as determined by ancestry informative markers. *Hum Reprod*. 2016 Oct;31(10):2391-5. doi: 10.1093/humrep/dew195. Epub 2016 Sep 2.

-
- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT. 2014. Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophoctoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure. *J Assist Reprod Genet* 31: 1501-1509.
 - Frannssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005; 331:137-141.
 - Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Brims M, Asian M, et al. Fertility and Sterility 971 Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH)—re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 2001;9:539 - 47.
 - Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999; 72: 837- 844.
 - Grossmann M, Calafell JM, Brandy N, Vanrell JA, Rubio C, Pellicer A, Egozcue J, Vidal F, Santaló J. Origin of trippronucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 2762-2765.
 - Guideline of the ESHRE, ESHRE Early Pregnancy Guideline Development Group; Nov 2017.
 - Hardy K, Hardy PJ. 1(st) trimester miscarriage: four decades of study. *Transl Pediatr.* 2015 Apr;4(2):189-200. doi: 10.3978/j.issn.2224-4336.2015.03.05.
 - Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC, Jacobs PA. 1991. XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49: 253-260.
 - Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. Human aneuploidy: Incidence, origin and etiology. *Env Mol Mutagen* 1996; 28: 167-175. Soler A, Morales C, Mademont-Soler I, Margarit E, Borrell A, Borobio V, Muñoz M, Sánchez A.
 - Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S. 1995. Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet* 57: 867-874.

-
- Hassold TJ. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *Am J Med Genet* 1980; 32:723-30.
 - Heffner LJ. Advanced maternal age--how old is too old? *N Engl J Med.* 2004 Nov 4;351(19):1927-9.
 - Hook EB, Hamerton JL. 1977. The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies - differences between studies - results by sex and by severity of phenotypic involvement. In *Population Cytogenetics*. Ernest B. Hook, Ian H. Porter Eds. Academic Press, NY: 63-79.
 - Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207-14.
 - Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF, Hassold TJ. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol.* 2003 Apr 1;13(7):546-53.
 - Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 1995; 33: 101-133.
 - Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2006;21(9):2216.
 - Joergensen MW, Niemann I, Rasmussen AA, Hindkjaer J, Agerholm I, Bolund L, Sunde L. 2014. Triploid pregnancies: genetic and clinical features of 158 cases. *Am J Obstet Gynecol* 211:370.e1-19.
 - Jonathan Kort; David Smotrich; Michelle Gaona; XiaWang; BarryBehr. Aneuploidy does not explain the difference in outcomes observed between Asian and Caucasian patients undergoing in vitro fertilization. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2015.07.008>.
 - Kajii T, Niikawa N. 1977. Origin of triploidy and tetraploidy in man: 11 cases with chromosomes markers. *Cytogenet Cell Genet* 18: 109-125.
 - Karamardian LM, Grimes DA. Luteal phase deficiency: effect of treatment on pregnancy rates. *Am J Obstet Gynecol*, 1992; 167:1391-1398.

-
- Lamb N, Sherman S, Hassold T. 2005. Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 111:250-255.
 - Lathi RB, Liebert CA, Brookfield KF, Taylor JA, vom Saal FS, Fujimoto VY, Baker VL. Conjugated bisphenol A in maternal serum in relation to miscarriage risk. *Fertil Steril*. 2014 Jul;102(1):123-8.
 - Lathi RB, Gustin SL, Keller J, Maisenbacher MK, Sigurjonsson S, Tao R, Demko Z. Reliability of 46,XX results on miscarriage specimens: a review of 1,222 first-trimester miscarriage specimens. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):178-82.
 - Lathi RB, Milki AA. Tissue sampling technique affects accuracy of karyotype from missed abortions. *J. Assist Reprod Genet* 2002;19:536-8.
 - Levy B, Sigurjonsson S, Pettersen B, Maisenbacher MK, Hall MP, Demko Z, Lathi RB, Tao R, Aggarwal V, Rabinowitz. 2014. Genomic imbalance in products of conception. Single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *Obstet Gynecol*. 124: 202-209.
 - Li TC, Makris M, Tomsu M, et al. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 2002; 8:463-481.
 - Li Q, Davila J, Bagchi MK, Bagchi IC. Chronic exposure to bisphenol a impairs progesterone receptor-mediated signaling in the uterus during early pregnancy. *Receptors Clin Investig*. 2016;3(3).
 - Lin PC. Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Women Reprod Health* 2004; 13:33-39.
 - Machin GA. Chromosome abnormality and perinatal death. *Lancet*. 1974 Mar 30;1(7857):549-51.
 - McFadden DE, Langlois S. Parental and meiotic origin of triploidy in the embryonic and fetal periods. *Clin Genet*. 2000 Sep;58(3):192-200.
 - Martínez MC, Méndez C, Ferro J, Nicolás M, Serra V, Landeras J. Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. *Fertil Steril*. 2010 Jan;93(1):289-92.

-
- Middlebrooks CD, Mukhopadhyay N, Tinker SW, Allen EG, Bean LJH, Begum F, Chowdhury R, Cheung V, Doheny K, Adams M, Feingold E, Sherman SL. 2014. Evidence for dysregulation of genome-wide recombination in oocytes with nondisjoined chromosomes 21. *Hum Mol Genet* 23: 408-417.
 - Mikołajewska K, Stragierowicz J, Gromadzińska J. Bisphenol A - Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *Int J Occup Med Environ Health*. 2015;28(2):209-41.
 - Moreno I, Cicinelli E, Garcia-Grau I, Gonzalez M, Bau D, Vilella F, De Ziegler D, Resta L, Valbuena D, Simon C. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *Am J Obstet Gynecol*. 2018, DOI: 10.1016/j.ajog.2018.02.012.
 - Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazan J, Alonso R, Alama P, Remohi J, Pellicer A, Ramon D, Simon C. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 215:684-703.
 - Moreno I, Franasiak JM. *Fertil Steril*. Endometrial microbiota-new player in town. 2017 Jul;108(1):32-39. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.034. Epub 2017 Jun 14.
 - Murugappan, G., Gustinl, S., & Lathi, R. B. (2014). Separation of miscarriage tissue from maternal decidua for chromosome analysis. *Fertility and Sterility*, 102(4), e9-e10. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.006>
 - Neuber M, Rehder H, Zuther C, Lettau R, Schwinger E. Polyploidies in abortion material decrease with maternal age. *Hum Genet*. 1993 Jul;91(6):563-6.
 - Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998; 13: 313-319.
 - Nielsen J, Sillesen I. Incidence of chromosome aberrations among 11148 newborn children. *Humangenetik*. 1975 Oct 20;30(1):1-12.
 - Nikitina TV, Lebedev IN, Sukhanova NN, Sazhenova EA, Nazarenko SA. A mathematical model for evaluation of maternal cell contamination in cultured cells from spontaneous abortions: significance for cytogenetic analysis of prenatal selection factors. *Fertil Steril* 2005;83:964-72.

-
- Oliver TR, Middlebrooks CD, Tinker SW, Allen EG, Bean LJH, Begum F, Feingold E, Chowdhury R, Cheung V, Sherman SL. 2014. An examination of the relationship between hotspots and recombination associated with chromosome 21 nondisjunction. *PLOS ONE* 9: e99560.
 - Overview of Chromosome Abnormalities in First Trimester Miscarriages: A Series of 1,011 Consecutive Chorionic Villi Sample Karyotypes. *Cytogenet Genome Res.* 2017;152(2):81-89. doi: 10.1159/000477707. Epub 2017 Jun 30.
 - Ozcan T, Copel JA. Deciphering the role of thrombophilias in recurrent miscarriage: impact on screening and treatment. *Contemporary OB/GYN Archive* 2002; June 1.
 - Pflueger SMV. 1999. Cytogenetics of spontaneous abortion. In *Principles of Clinical Cytogenetics*. Gersen SL & Keagle MB Eds. Humana Press, NJ: 317-343.
 - Porter TF. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005; 19:85-101.
 - Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Pfeifer S, Goldberg J, Lobo R, Thomas M, Widra E, Licht M, Collins J, Cedars M, Vernon M, Davis O, Gracia C, Catherino W, Thornton K, Rebar R, La Barbera A. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril Fertil Steril.* 2013 Jan;99(1):63. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.023. Epub 2012 Oct 22.
 - Qi H, Cai LR, Zhu JJ, Yang K, Wen XH, Zeng W, Chen JL. Application of copy number variation analysis based on next-generation sequencing in the genetic analysis of missed abortion chorionic villi. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2016 Feb;51(2):92-7.
 - Rahman A, Kumarathasan P, Gomes J. Infant and mother related outcomes from exposure to metals with endocrine disrupting properties during pregnancy. *Sci Total Environ.* 2016 Nov; (1):569-570.
 - Rai R. Recurrent miscarriage- A critical appraisal. *Reprod Med Rev* 2002; 10:165-176.
 - Rezaei A, Dabbagh A. T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Med Sci Monit* 2002; 8:607-610.

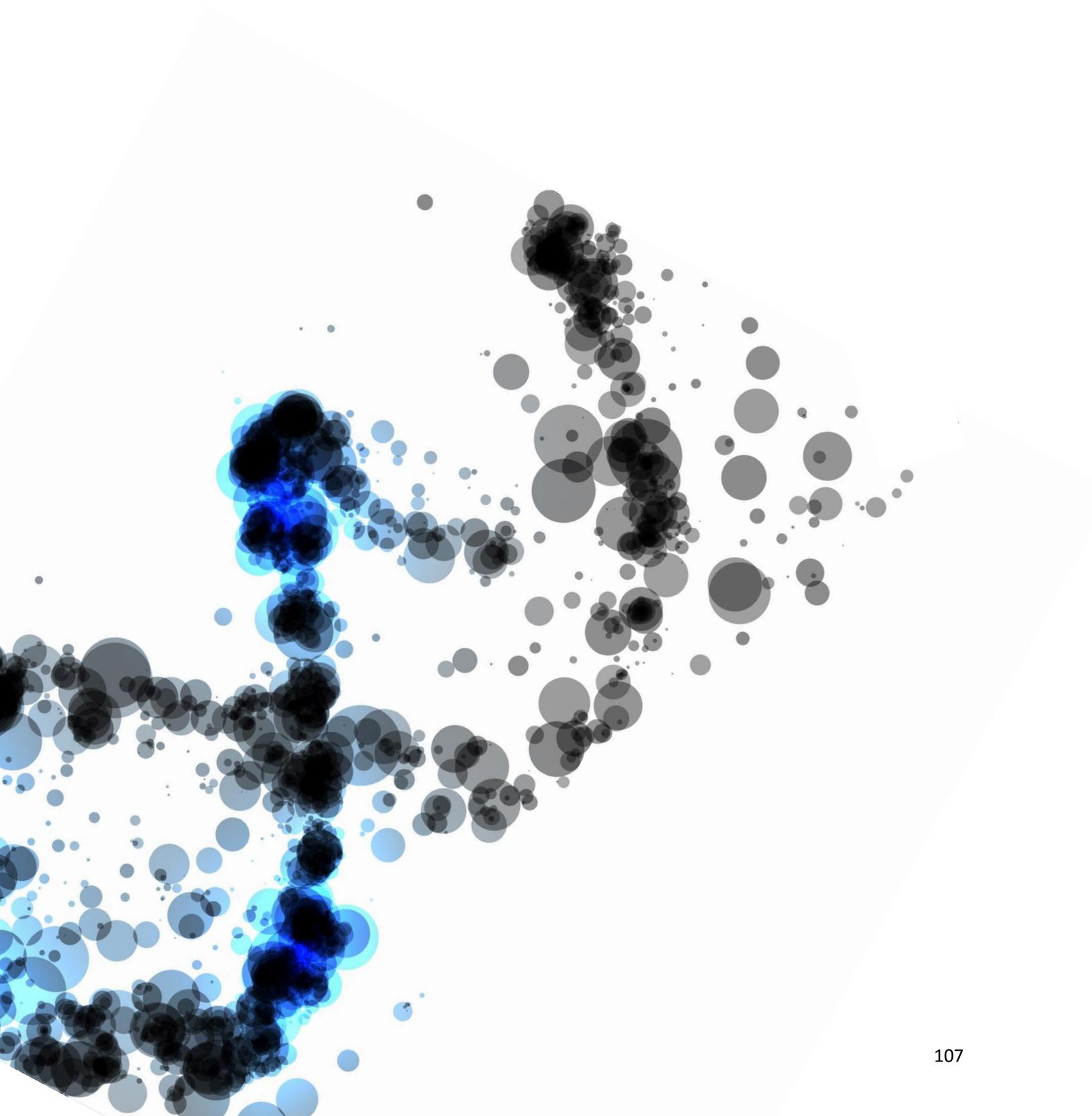
-
- Robberecht C, Pexsters A, Deprest J, Fryns JP, D'Hooghe T, Vermeesch JR. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss. *Prenat Diagn.* 2012;32(10): 933-42.
 - Robberecht C, Schuddinck V, Fryns JP, Vermeesch JR. Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls. *Genet Med* 2009;11:646-54.
 - Roberts CG, O'Neill C. Increase in the rate of diploidy with maternal age in unfertilized in-vitro fertilization oocytes. *Hum Reprod.* 1995 Aug;10(8):2139-41.
 - Rodrigo L, Rubio C, Peinado V, Villamon R, Al-Asmar N, Remohi J, Pellicer A, Simon C, and Gil-Salom M. Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples. *Fert and Ster.* Vol. 95, No. 3, March 1, 2011. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.10.022.
 - Rodrigo L, Rubio C, Mateu E, Simon C, Remohi 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* Vol.19, No.1 pp. 118±123, 2004 DOI: 10.1093/humrep/deh012.
 - 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.* Volume 2014 (2014), Article ID 517125.
 - Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí, J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2084-2092.
 - Rubio C, Buendía P, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Peinado V, Delgado A, Milán M, Mir P, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reprod Biomed Online.* 2009 May;18(5):687-93.
 - Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Remohí J, Simón C, Pellicer A. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online.* 2005 Oct;11(4):497-506.

-
- Rubio C, Rodrigo L, Mir P, Mateu E, Peinado V, Milán M, Al-Asmar N, Campos-Galindo I, Garcia S, Simón C. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril*. 2013 Mar 15;99(4):1044-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.094. Epub 2013 Feb 5. Review. PMID: 23394777.
 - Sandalinas M, Márquez C, Munné S. Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod*. 2002 Jun;8(6):580-5.
 - Saravelos SH, Cocksedge KA, Li TC. Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure. *Hum Reprod Update* 2008; 14:415-29.
 - Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet* 2006; 51:533-540.
 - Shah MS, Cinnioglu C, Maisenbacher M, Comstock I, Kort J4, Lathi RB. Comparison of cytogenetics and molecular karyotyping for chromosome testing of miscarriage specimens. *Fertil Steril*. 2017 Apr;107(4):1028-1033. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.022. Epub 2017 Mar 7.
 - Shearer, B. M., Thorland, E. C., Carlson, A. W., Jalal, S. M., & Ketterling, R. P. (2011). Reflex fluorescent in situ hybridization testing for unsuccessful product of conception cultures: A retrospective analysis of 5555 samples attempted by conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization. *Genetics in Medicine*, 13(6), 545-552.
<https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31820c685b>.
 - Sherman SL, Lamb NE, Feingold E. 2006. Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. *Biochem Soc Trans* 34: 578-580.
 - Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006; 24:17-24.
 - Simpson JL, Elias S, Martin AO. Parental chromosome rearrangements associated with repetitive spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1981; 36:584-590.

-
- Skuse DH, James RS, Bishop DVM, Coppin B, Dalton P, Aamodt-Leeper G, Bacarese-Hamilton M, Creswell C, McGurk R, Jacobs PA. 1997. Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature* 387: 705-708.
 - So I, Nagaoka, Terry J, Hassold, and Patricia A. Hunt. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* ; 13(7): 493-504. doi:10.1038/nrg3245.
 - Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002; 17: 446-451. Tabla 2.
 - Szulman AE, Surti U. The syndromes of hydatidiform mole. I. Cytogenetic and morphologic correlations. *Am J Obstet Gynecol.* 1978 Jul 15;131(6):665-71.
 - Tang AW, Alfirovic Z, Quenby S. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. *Hum Reprod* 2011; 26:1971-1980.
 - Vera-Rodríguez M, Michel CE, Mercader A, Bladon AJ, Rodrigo L, Kokocinski F, Mateu E, Al-Asmar N, Blesa D, Simón C, Rubio C. Distribution patterns of segmental aneuploidies in human blastocysts identified by next-generation sequencing. *Fertil Steril.* 2016 Apr;105(4):1047-1055.e2.
 - Vrooman LA, Oatley JM, Griswold JE, Hassold TJ, Hunt PA. Estrogenic exposure alters the spermatogonial stem cells in the developing testis, permanently reducing crossover levels in the adult. *PLoS Genet.* 2015 Jan 23;11(1):e1004949. doi: 10.1371/journal.pgen.1004949. eCollection 2015 Jan.
 - Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am J Hum Genet* 2004; 75:376-85.
 - Werner M, Reh A, Grifo J, Perle MA. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population. *J Assist Reprod Genet.* 2012 Aug;29(8):817-20.
 - Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1807-1820.

- Zhou Q, Wu SY, Amato K, DiAdamo A, Li P. Spectrum of Cytogenomic Abnormalities Revealed by Array Comparative Genomic Hybridization on Products of Conception Culture Failure and Normal Karyotype Samples. *J Genet Genomics*. 2016 Mar 20;43(3):121-31. doi: 10.1016/j.jgg.2016.02.002. Epub 2016 Feb 13

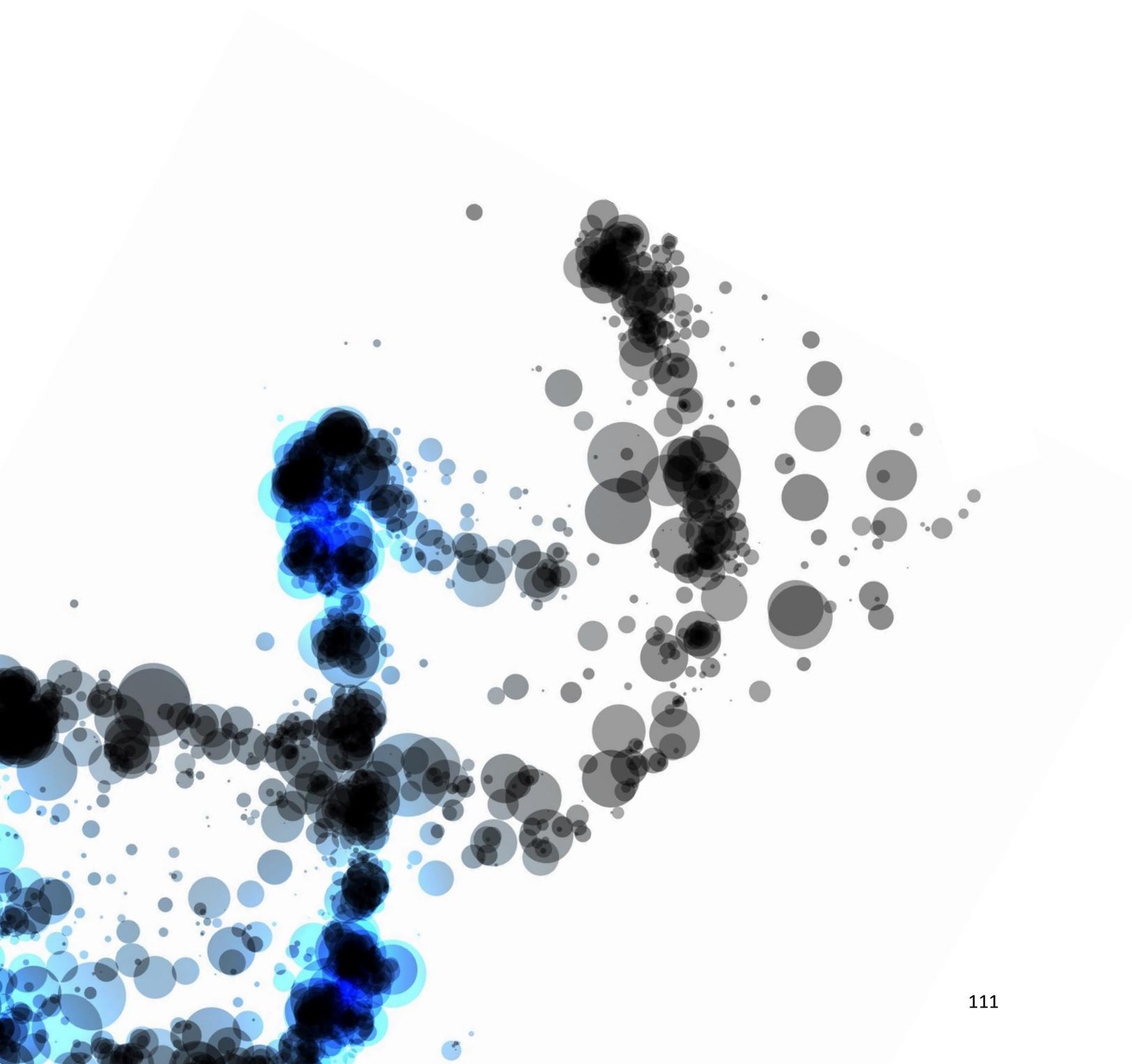
ÍNDICE DE ABREVIATURAS



- **AE:** Abortos Espontáneos.
- **ESHRE:** Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología, del inglés, European Society of Human Reproduction and Embryology.
- **ASRM:** Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, del inglés, American Society for Reproductive Medicine.
- **SAF:** Síndrome antifosfolípido.
- **KIR:** Receptores de inmunoglobulina “maternal killer”, del inglés, maternal killer immunoglobulin-like receptors.
- **NKu:** Células “natural killer” uterinas, del inglés, uterine natural killer cells.
- **HLA:** antígeno leucocitario humano, del inglés, human leukocyte antigen.
- **TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida.
- **APCR:** Resistencia a la proteína C activada, del inglés, Activated protein C resistance.
- **IMC:** Índice de masa corporal.
- **FIV:** fecundación “in vitro”.
- **AR:** Aborto recurrente.
- **POC:** Productos de la Concepción, del inglés, Products of Conception.
- **IUI:** Inseminación Intrauterina, del inglés, Intrauterine insemination.
- **FSH:** Hormona folículo estimulante, del inglés, Follicle Stimulating Hormone.
- **EDC:** disruptores endocrinos químicos, del inglés, Endocrine Disruptor Chemical.
- **BPA:** bisfenol A.
- **D&C:** dilatación y curetaje.
- **MCC:** Contaminación con células maternas, del inglés, Maternal Cell Contamination.
- **CGH:** Hibridación Genómica Comparada, del inglés, Comparative Genomic Hybridization.
- **NGS:** Secuenciación masiva, del inglés, Next Generation Sequencing.
- **BOB:** Bacs on beads.
- **FISH:** Hibridación in situ fluorescente, del inglés, Fluorescent in situ hybridization.

- **MLPA:** Amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple, del inglés, Multiplex ligation-dependent probe amplification.
- **QF-PCR:** Reacción de cadena de polimerasa cuantitativa y fluorescente, del inglés, Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction.
- **BAC:** Cromosoma Artificial Bacteriano, del inglés, Bacterial Artificial Chromosome.
- **STR:** Short Tandem Repeats.
- **SNP:** Conjunto de polimorfismos de un solo nucleótido, del inglés, Single-nucleotide polymorphisms.
- **PBS:** Solución salina tamponada con fosfato, del inglés, phosphate-buffered saline.
- **del/dup:** deleciones/duplicaciones.
- **PGT-A:** Técnica de screening genético para aneuploidías, del inglés, Preimplantation Genetic Testing for aneuploidies.
- **PGT-SR:** Técnica de screening genético para reordenamientos estructurales, del inglés, Preimplantation Genetic Testing for Structural Rearrangements.
- **WGA:** Amplificación genómica completa, del inglés, Whole Genome Amplification.
- **CNV:** cambios en el número de copias, del inglés, Copy Number Variation.
- **ICSI:** Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, del inglés, intracytoplasmic sperm injection.
- **KS:** Kolmogorov y Smirnov.
- **Latam:** Latinoamérica.
- **EAU:** Emiratos Árabes Unidos.

AGRADECIMIENTOS



Qué complicado es este apartado cuando uno tiene tanto que agradecer. Pues bien, como dijo Jack el destripador, vayamos por partes:

- ✓ A Carmen Rubio, mi mentora, mi amiga, mi hermana. Porque como siempre digo, fue, es y será siempre mi jefa. Persona imprescindible en mi vida, no sólo en el tema profesional, sino también en el personal. Más que simplemente una jefa, también una hermana mayor. Gracias blondie. Te quiero mucho.
- ✓ A Carlos Simón, junto con Carmen, mi gran mentor y apoyo fundamental en los momentos buenos y no tan buenos. Gracias Carlos por todo el apoyo recibido, por esa confianza ciega a la hora de enviarme a liderar un proyecto ni más ni menos que en Miami, (Florida, USA), por esas carreras interminables durante los Congresos en las que nos hacíamos confesiones y nos contábamos nuestras cosas. En fin, por todo. Gracias Carlos.
- ✓ A José Remohí, otro gran apoyo en este camino que es la tesis. A pesar de su cargo y de sus escasos momentos libres, siempre (y digo siempre) tiene un rato para pasarme a su despacho o llevarme de paseo durante los Congresos preguntándome cómo me va la vida, si estoy o no feliz y recordándome que o me aplico en la tesis o me dejará eunuco (enormemente motivador, jeje). Siempre recordaré con cariño cómo confiaste en mi al mostrarme con ilusión el proyecto que tenías para una nueva facultad de Medicina y cómo contabas conmigo para dicho proyecto. Gracias Pepe.
- ✓ A Nicolás Garrido, Marcos Meseguer y MJ Escrivá. Con ellos empezó la andadura en la reproducción asistida. Brillantes coordinadores del Máster fueron además consejeros una vez finalizado el mismo, y terminaron siendo colegas y buenos amigos. Gracias Nico. Gracias Marcos. Gracias Escrí.
- ✓ A mis compañeros “históricos” de departamento, A Lore (mi otra hermana), Emi (mi primera guardia juntos), Vane (mi compi de meiosis, cuantos findes en IVI...), Miguel (el café de la mañana), Pere (gran colega de conciertos), Eva (sólo buenas palabras) y Raquel. Y a Asun, aquella loca del pelo rojo que empezó a enseñarme lo que era contar miles, qué digo miles, millones de espermatozoides en una habitación oscura (no penséis mal). Gracias chicos.
- ✓ A los que luego se unieron para quedarse, como Sandra, Chiti Mari, María Vera (mi prima pequeña), MC Martínez y los compis de DGP: Julius, Ana, Josean, Mila, Mariaje (la peque) y Vicente. Gracias por estar tan locos.
- ✓ A todos mis compañeros en Igenomix España, sin excepción, por enseñarme y ayudarme en el día a día. No hay mejor trabajo que ese en el que aprendes, creces y te diviertes todos los días. Gracias Zmura, Gómez, Cris, Raquel, Tere, Evita, Mery, Sebas, Paula, Dani², Mónica, Javi, Fran², Paco V., Borch, Vicente, Gonzalo, Carmen, Marisún, Laura, ... y hasta 150 más! Gracias compañeros.

- ✓ A mis colegas de Igenomix por el mundo, más que compañeros, amigos. ¡No hay Congreso que disfrute más que con vosotros! Gracias Marcinha, NGT, Poo, Don Luis A., Bruno, Cris y Paco.
- ✓ A la familia que dejé en Miami, a los Uruguashocubanos Luis y Nane (¡y Nana, of course!), junto a mis colegas y también ya familia del Lab: Víctor, del que he sido padrino en su boda con Kim; Doyin, unclé Doyin; y Adys, siempre lista para el jaleo. Y a los que estuvieron en Miami, pero también volvieron: Bele Bele, Alejandro, Ana, Pilar y Carlos. Gracias familia.
- ✓ A David Jiménez, persona clave también en mi desarrollo profesional, confiando como Carlos en mí para la aventura americana. Con él, junto con mi colega Gus, pusimos el primer clavo (literal, en sillas de IKEA) para el desembarco y posterior conquista de América. Gracias David. Gracias Gus.
- ✓ A aquellos que ya no están, pero que siguen estando, y que seguro que hubieran estado orgullosos de esta tesis. Gracias Jorge. Gracias Carol.
- ✓ A mis amigos de Andilla, a los cuales no veo tanto como me gustaría, pero de los que me acuerdo siempre, sobre todo cuando llega el verano. Gracias Marcos, Churry, Fernando, Javi, Jose Manuel, Francisco, Jordi, Charly, Jose, Ismael y Pedro. Y por supuesto, gracias Carol y Elena.
- ✓ A la familia que no se elige, a los de siempre, a los de Terra. Por compartir alegrías y penas, y por celebrarlo todo. ¡Todo! Gracias Jorge, Loco (Miguel), Berutin (Alberto), Vicente S., Grau (Vicente), Chuti (Jordán), Luisillo, Abolla (David), Sr. Fon (Pablo), Manu, Luisro, Alfredo, Nachito, Pepe, Iván, Pollo (Miguel), Alex, Juanig, Charly, Pablete, Munitis (Pedro), Pauleta (Pablo), Bayo, Xavo, Pablitas, Makael (Miguel Ángel), Claramonte, Perilla (Carlos), Olmos (José), Jean Paul, Beckham (Miguel), Maki (Vicente), Miguel L., Russu y a todas las mujeres que los aguantan. Gracias por todos estos años. Y por los que quedan....
- ✓ A los Truskis Siberianos. Grupo de Rock que dará noches de gloria. Gracias Truskis.
- ✓ A la tribu. Al “Gran Jefe” Alfredo y al “Chamán” Nacho. ¡Gracias chicos!
- ✓ A Robe, Marea, Reincidentes, Boikot, Desakato, Alienfood, Caótica, EUKZ, Divididos, Poncho K, Los suaves, Extremoduro, Evaristo, Kutxi Romero, Sinkope, Gritando en Silencio, Los delincuentes, Platero y tú, Fito, Barricada, Don Rosendo Mercado, Mago de Oz, El Canijo de Jerez, Termofrigidus, S.A., La Polla Records, Albertucho, el Drogas, Calamaro, Carlos Tarque, Yosi, Fito y los fitipaldis, La fuga, Los Makis, Los Rodríguez, Boni, Txarrena, Kortatu, Celtas Cortos, Banda Bassotti, Malos vicios, Los Benito, KaotiKo, Estopa, Muchachito, Konsumo respeto, Manolillo Chinato, MCD, Non Servium, Maniatica, Skaparapid, Ostiaputa, Agua Bendita, Los de Marras, Loquillo... . Por enseñarme a amar la música. Gracias, mis más sinceras gracias.
- ✓ Al Atleti. Por enseñarme a sufrir, a caer, levantarme y crecer más fuerte. Gracias por ese sentimiento.

- ✓ A todos mis primos, tíos y a los abuelos que ya no están. En especial a mi tía Antonia, Paco, Antonia y Toñi. Y a Miguel, M^a Teresa, Isma y María. Gracias familia por estar ahí (yaya, donde quiera que estés).
- ✓ A Don Antonio, por empezar a forjarme de bien pequeño. Eso cala, muy hondo. Gracias Don Antonio.
- ✓ A mis compañeros de IVI, a todos y cada uno de ellos allá donde estén en el mundo. En especial, como no podría ser de otra manera, a los de IVI Valencia e IVIs Latam. Gracias Amparo Ruiz, Isabel Cortés, Pepe Bellver (que me enseñó que siempre se puede entrar a trabajar con una sonrisa en la boca), Merca, Santi, Marcela, Ana P., Abel, Michelle, Roberto E., Fernando N., Carlos T. y todos los departamentos, desde el FIV, pasando por Internacional, Andrología, Quirófano....
- ✓ A la familia FarmaFIR, liderada por mi buen amigo Crisanto, junto con Elvi, Yoyo, Tete, Colo y Eduardo. Gracias Cris, ¡amigo!
- ✓ A Diana, por su gran ayuda con la estadística (la estadística, esa gran mentirosa que, si tú te comes dos pollos y yo ninguno, nos dice que tú te has comido uno y yo otro). Siempre amable y dispuesta a ayudar con una sonrisa. ¡Así da gusto! Gracias Diana.
- ✓ A mis colegas del máster. Menuda añada, la mejor sin duda de la historia (y no lo digo yo). Gente que se convirtió en colegas de profesión, pero, además, en algo mucho más que eso. Algunos son compañeros de vida. Gracias a todos ellos, en especial a Nacho, al camarada Arturo, Javi, Irene, Lala, Belén (mis peques no pueden ir la una sin la otra), Alberto, Dana, Nata, Cris, Edurne, Maider, M^a José, Luis y Antonio, con los que me sigue uniendo una estrecha relación. Gracias familia.
- ✓ A mi familia de Siria. Gente que siempre tiene palabras buenas, actos de bondad, y con la que si todo va como tiene que ir, estaré celebrando en un futuro cercano la defensa de este Doctorado allí mismo, en Damasco.
إلى عائلتي في سوريا. الناس الذين لديهم دائماً كلمات جيدة ، وأفعال من اللطف ، والتي إذا سارت الأمور على ما يرام ، سأحتفل في المستقبل القريب بالدفاع عن هذه الدكتوراه هناك في دمشق.
- ✓ A mis compañeros del Jaime I. No hay día que no nos comuniquemos. Es un placer que, más de 30 años después, sigamos teniendo esta relación tan cercana y fluida. Gracias chicos.
- ✓ A mis amigos de la Universidad. Esos fantásticos Farmacéuticos de los que tanto disfruté y de los que, por fortuna, sigo disfrutando. En especial para Sonia (tuve el honor de hablar el día de su boda), Pili, Pepa, Antonio (bro, you're the one!), Abdel, Javi², Nacho, Gabi, Silvia, Eva, Pedro y Kike.
- ✓ To my fellas from Washington State University (Go Cougs!), specially to the Hunt&Hassold Lab, at School of Molecular Biosciences. It was a pleasure to learn and share knowledge with Profesor Terry Hassold, Pat Hunt, Brian, Martha, So, Sze Ming, Lincy, Jenny, Lisa, Crystal, Ross,

Sofia, Katie, Helen, Libby, Brenda, Rachael, and CQ. And the Rico's soccer team (Kick some grass!): Carlos, Robson, Ricardo, Oliver.... Thank you all!

- ✓ A la gente de Colinas, grupo excepcional donde uno siempre se lo pasa bien. Gracias Ana, Italo, María, Álvaro, Ruth, Salva, Mapi, Pichu (Jose R.), Elisa y Nacho.
- ✓ A mis compañeros y profesores del IB Campanar. Fueron cuatro años especiales, camino de la madurez. Y uno de los mejores barrios de Valencia, que siempre quedará en mi memoria: Campanar. Gracias.
- ✓ A los amigos que hicimos en Murcia. ¡Qué año más fantástico! Gracias a Pepa (de nuevo), a Kuko, Paco L., Tomás y Araceli. Y a Paco, José y Susana, entre otros, por las vivencias en la Farmacia.
- ✓ A ese chat de chistes que todos los días dan alegrías y con el que tenemos oportunidad de echarnos unas risas no solo virtuales sino de vez en cuando también en los Congresos. Gracias Pablo, Pepe, Agustín, Carlos², David, Fernando, Elkin, Ernesto, Javier, Jose, Juancho, Manolo, Marcos, Nico, Pepe, Santi, Satur, Vicente y Fran. ¡Gracias gente!
- ✓ A los F4. Amigos que son como caricias al alma. Gracias Laura, Juancho, Edgardo y César. Y a Cristian y Nancy. ¡Gracias a todos!
- ✓ A los colegas de Guate, A Fredy, Ana I, Luis P, Heidy, Fernando y Lili. ¡Gracias muchachos!
- ✓ Ya, por último, pero no menos importante sino todo lo contrario, a mis padres y hermanos. A mi padre, Ahmad, el que más ha insistido en que hiciera mi Doctorado. Seguro que va a ser la persona más orgullosa de la sala el día de la defensa. A mi madre Dory, la persona más trabajadora que conozco y la que me incitó a entrar en el mundo de la reproducción. Ambos, modelos a seguir. A mis hermanos Imad y Nabila. Con los que siempre puedo contar, para lo que haga falta, y con los que SIEMPRE estaré unido, pase lo que pase, estén donde estén. ¡Estoy muy orgulloso de los cuatro! Gracias papá, gracias mamá, gracias Imad, gracias Nabi. ¡Os quiero!

