



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Genética y Biología Molecular

**“NUEVAS ALTERNATIVAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO
PREIMPLANTACIONAL BASADO EN LA IDENTIFICACIÓN Y
GENOTIPIFICACIÓN DE DNA EMBRIONARIO”**

TESIS

Que presenta

M. en C. ELIZABETH SCHAEFFER

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

En la Especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dra. Esther López-Bayghen Patiño

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

ASESORES

Dr. Jaime García Mena

Departamento de Genética y Biología Molecular,

Cinvestav - IPN

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Departamento de Genética y Biología Molecular,

Cinvestav - IPN

Dra. María del Rocío Gómez Ortega

Departamento de Toxicología,

Cinvestav - IPN

Dra. Martha Moreno Lafont

Laboratorio de Inmunología Celular

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN

El presente trabajo estuvo bajo la dirección de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño y el Dr. José Efraín Garrido Guerrero y se llevó a cabo en el en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDMOL) del Instituto de Infertilidad y Genética INGENES México, S.C., y en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.

El presente trabajo contó con el apoyo económico de CONACyT, proyectos PEI-Conacyt 231793 y 241040 otorgados a la Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño.

“Equipado con sus cinco sentidos, el Hombre explora el Universo que lo rodea y a sus aventuras las llama Ciencia.”

EDWIN POWELL HUBBLE

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de este trabajo, fui becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, expediente no.409499), sin este apoyo, no hubiera sido posible realizar mis estudios.

Quiero agradecer especialmente a:

A mi tutora, la Dra. Esther López-Bayghen Patiño por su paciencia y asesoría, por compartirme sus experiencias y conocimientos, y sobre todo por permitirme trabajar con ella y su equipo de investigación durante la maestría y el doctorado.

A mi tutor, el Dr. Efraín Garrido Guerrero, por siempre estar al pendiente de mis avances, por brindarme siempre su apoyo y por guiarme durante mi formación como investigadora.

A mis asesores, por sus comentarios y sus aportaciones semestrales.

A Gabriela Mora Macías, secretaria administrativa, por facilitarme la existencia dentro del CINVESTAV-IPN

A todos los integrantes de los laboratorios 19 del Departamento de Toxicología y del laboratorio 5 del Dr. Garrido en el departamento de Genética, por su ayuda constante y su apoyo técnico.

Al Instituto Ingenes, por ser una empresa innovadora que reconoce la importancia de hacer investigación científica de calidad creando el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDMOL), que permite no sólo el avance científico y la formación de recursos humanos, sino también su aplicación directa para las pacientes que desean lograr el embarazo con un bebé sano.

A médicos, biólogos, técnicos y a todo el personal en general del Instituto Ingenes, por su enorme ayuda con las pacientes, las muestras biológicas y los recursos necesarios para poder realizar mi trabajo experimental.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, por haberme dado la vida, por todo el tiempo y esfuerzo que invirtieron y dedicaron para mí, para que tuviera la mejor educación, por apoyarme y creer en mí siempre. Lo lograron, son los mejores padres y me siento la más dichosa de ser su hija

Al amor de mi vida, mi esposo Enrique, que desde que lo conocí se convirtió en mi ángel y a quien le agradezco todo el amor y el apoyo incondicional que desde el primer día me ha dado

A mis hermanas, cuñados y sobrinos, de quienes espero siempre pueda ser un buen ejemplo a seguir

A Azucena Ocampo Bárcenas, Valeria García Flores y María Ramírez, grandes mujeres y amigas que me han acompañado a lo largo de este camino

A todos ustedes quiero decirles que son personas muy importantes en mi vida, sin ustedes, difícilmente hubiera podido lograr llegar a ser lo que soy hoy, espero que se sientan orgullosos de mí, como yo lo estoy de cada uno de ustedes y de que sean parte de mi vida

¡MUCHAS GRACIAS!

FOROS CIENTIFICOS EN LOS QUE SE EXPUSO EL PRESENTE TRABAJO

- SRI (Society for Reproductive Investigation) 64th Annual Scientific Meeting)
Florida, USA, Marzo 15-18 de 2017:
WHOLE GENOME AMPLIFICATION (WGA) OF DAY 3 OR DAY 5 HUMAN EMBRYOS BIOPSIES PROVIDES A SUITABLE DNA TEMPLATE FOR PCR-BASED GENOTYPING. Elizabeth Schaeffer, Bruno López-Bayghen, Efraín Garrido, Leonardo M. Porchia, Esther López-Bayghen.
- AMMR (Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción) 54° Congreso Mexicano de Medicina de la Reproducción
Riviera Maya, Quintana Roo, México, Julio 17-20, 2017:
INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍAS EN EMBRIONES FERTILIZADOS *IN VITRO* Y SU RELACIÓN CON LA EDAD MATERNA. Schaeffer Elizabeth, Ocampo Bárcenas Azucena, Neumann Adina, Camargo Díaz Felipe, López-Bayghen Patiño Esther.
- Curso Nacional “Manejo actual en Reproducción Asistida: Aspectos clínicos, metodológicos y moleculares”
Merck-Ingene, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, México, septiembre 5-7, 2017:
DGB-ELIGENDER, EVALUACIÓN Y SELECCIÓN EMBRIONARIA. Elizabeth Schaeffer
- ASRM (American Society for Reproductive Medicine) 73rd Scientific Congress
San Antonio, TX, USA, octubre 28-noviembre 1, 2017
VERSICAN AND PROSTAGLANDIN- ENDOPEROXIDE SYNTHASE 2 (PTGS2) GENE EXPRESSION IN CUMULUS CELLS AS A COMPLEMENT OF PREIMPLANTATION GENETIC TESTING: BETTER OUTCOMES FOR IN VITRO FERTILIZATION PREGNANCY. E. López-Bayghen, E. Schaeffer, G. M. Ortiz, J. Pedraza, A. Ocampo.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS..... | 4 |
| AGRADECIMIENTOS PERSONALES | 5 |
| FOROS CIENTIFICOS EN LOS QUE SE EXPUSO EL PRESENTE TRABAJO..... | 6 |
| CONTENIDO | 7 |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS..... | 13 |
| ABREVIATURAS | 15 |
| RESUMEN..... | 17 |
| ABSTRACT | 19 |
| INTRODUCCIÓN..... | 21 |
| INFERTILIDAD Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA | 21 |
| ANEUPLOIDÍA | 24 |
| INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍA | 25 |
| LA FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i> GENERA MAYORES TASAS DE ANEUPLOIDÍA | 27 |
| ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA | 27 |
| INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI) | 28 |
| CULTIVO EMBRIONARIO..... | 29 |
| DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (PGT) | 30 |
| BIOPSIA EMBRIONARIA | 32 |
| BIOPSIA DE CUERPO POLAR..... | 32 |
| BIOPSIA DE BLASTÓMERA..... | 33 |
| BIOPSIA DE BLASTOCISTO | 33 |
| TÉCNICAS PARA PGT..... | 34 |
| FISH (HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE)..... | 34 |

| | |
|---|----|
| QF-PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA MÚLTIPLE)..... | 35 |
| A-CGH (HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA CON MICROARREGLOS) | 35 |
| NGS (SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO) | 35 |
| AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (WGA) | 36 |
| ERRORES EN LA GENOTIPIFICACIÓN CUANTITATIVA CON WGA Y PCR . | 37 |
| GENOTIPIFICACIÓN BASADA EN TÉCNICAS DE PCR..... | 38 |
| GENES UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SEXO | 39 |
| SRY (REGIÓN DETERMINANTE DEL SEXO-Y): | 39 |
| DYS14 (PROTEÍNA ESPECÍFICA DE TESTÍCULO LIGADA A Y): | 39 |
| AMELOGENINA: | 39 |
| DOSIS GÉNICA PARA DETECCIÓN DE NÚMERO DE COPIAS..... | 40 |
| DIAGNÓSTICO PRENATAL | 41 |
| MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRA FETAL NO INVASIVOS | 42 |
| DNA FETAL LIBRE EN SANGRE MATERNA..... | 42 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 44 |
| HIPÓTESIS | 44 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 45 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 45 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 46 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA OBJETIVO PARTICULAR 1..... | 46 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA OBJETIVO PARTICULAR 2..... | 47 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA OBJETIVO PARTICULAR 3..... | 48 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 49 |
| PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO Y APROBACIÓN ÉTICA..... | 49 |

| | |
|---|----|
| ESTIMULACIÓN, FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i> Y BIOPSIA EMBRIONARIA | 49 |
| BIOPSIA EMBRIONARIA | 50 |
| BIOPSIA DÍA 3 (BLASTÓMERA) | 50 |
| PROCEDIMIENTO | 50 |
| BIOPSIA DÍA 5 (TROFOECTODERMO) | 51 |
| PROCEDIMIENTO | 51 |
| AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO POR LA TÉCNICA DE WGA (<i>WHOLE GENOME AMPLIFICATION</i>)..... | 52 |
| PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE EXTRACCIÓN | 52 |
| PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE PRE-AMPLIFICACIÓN | 53 |
| PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE AMPLIFICACIÓN | 53 |
| VERIFICACIÓN DE WGA POR MEDIO DE ELECTROFORESIS..... | 54 |
| PURIFICACIÓN DE WGA..... | 54 |
| EXTRACCIÓN DE DNA DE PLASMA CON LA TÉCNICA DE FENO:CLOROFORMO: ISOAMÍLICO | 55 |
| OBTENCIÓN DE LA MUESTRA..... | 55 |
| EXTRACCIÓN DE DNA DE PLASMA | 55 |
| LIMPIEZA DEL DNA..... | 56 |
| DISEÑO DE INICIADORES | 57 |
| SECUENCIAS DE INICIADORES UTILIZADOS..... | 58 |
| QPCR CON KAPA SYBR® (UN SOLO PASO) PARA LA GENOTIPIFICACIÓN (DETERMINACIÓN DE SEXO Y DETECCIÓN DE TRISOMÍAS 18 Y 21) | 59 |
| IDENTIDAD DE LOS AMPLICONES | 59 |
| CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR | 60 |
| SECUENCIACIÓN | 60 |
| HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA CON MICROARREGLOS | 60 |

| | |
|---|----|
| ANÁLISIS ESTADÍSTICOS..... | 61 |
| RESULTADOS | 61 |
| 1. ANÁLISIS DE LAS ANEUPLOIDÍAS MÁS FRECUENTES Y SU RELACIÓN CON LA EDAD MATERNA PARA EMBRIONES DIAGNOSTICADOS POR PGS62 | |
| 1.1 EL PORCENTAJE DE ANEUPLOIDÍA AUMENTA CONFORME AUMENTA LA EDAD MATERNA | 62 |
| 1.2 ANEUPLOIDIAS MÁS FRECUENTES Y SU ASOCIACIÓN CON LA EDAD MATERNA | 63 |
| 1.3 LA EDAD MATERNA ESTA RELACIONADA CON LAS TASAS DE FIV | 67 |
| 1.4 EL NIVEL DE ANEUPLOIDÍA ESTA INVERSAMENTE ASOCIADO A LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN | 67 |
| 1.5 EL POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN COMO PREDICTOR DE EMBARAZO..... | 68 |
| DEFINICIÓN DE COHORTE EMBRIONARIA ANEUPLOIDE | 69 |
| 2. USO DE LA WGA COMO MOLDE PARA GENOTIPIFICACIÓN EMBRIONARIA EN DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRE-IMPLANTACIONAL..... | 69 |
| 2.1 ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE GENOTIPIFICACIÓN EMBRIONARIA PARA DETERMINACION DE SEXO | 70 |
| 2.1.1 IDENTIDAD DE LOS AMPLICONES..... | 70 |
| 2.1.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE GENOTIPIFICACIÓN DE SEXO | 71 |
| VALIDACIÓN CON SEXO FENOTÍPICO | 71 |
| VALIDACIÓN DEL SISTEMA AL COMPARAR CON LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS PGS/ACGH | 73 |
| VALIDACIÓN DE SEXO CUANDO LA SELECCIÓN EMPIEZA CON ESPERMATOZOIDES PRE-SORTEADOS (POST-SORTING)..... | 74 |
| VALIDACIÓN CON MUESTRAS SIN ANÁLISIS PREVIO Y CONFIRMADAS CON PGS/ACGH..... | 75 |

| | |
|---|-----|
| 2.1.3 VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA..... | 76 |
| 2.2 ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE GENOTIPIFICACIÓN CUANTITATIVA EMBRIONARIA PARA DETECCION DE TRISOMÍA 18 Y 21. | 77 |
| 2.2.1 IDENTIDAD DE LOS AMPLICONES..... | 77 |
| 2.2.2 EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN..... | 79 |
| 2.2.3 DOSIS GÉNICA..... | 80 |
| 2.2.4 DETECCIÓN DE TRISOMÍAS..... | 81 |
| DETECCIÓN DE TRISOMÍA 21 | 81 |
| DETECCIÓN DE TRISOMÍA 18..... | 82 |
| 3. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL UTILIZANDO DNA FETAL LIBRE EN PLASMA MATERNO PARA GENOTIPIFICACION POR PCR | 83 |
| 3.1 ESTANDARIZACIÓN DE UN NUEVO PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SRY PARA AMPLIFICAR DNA FETAL..... | 83 |
| 3.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA DE PLASMA MATERNO..... | 84 |
| 3.3 LA AMPLIFICACIÓN DE SRY Y DYS14 EN MUESTRAS DE PLASMA MATERNO INDICAN LA PRESENCIA DE DNA FETAL A PARTIR DE UNA EDAD GESTACIONAL TEMPRANA | 85 |
| 3.4 Estandarización de la amplificación de TTC3, RPL17 y HSD3B2 en DNA libre en plasma materno | 86 |
| DISCUSIÓN..... | 88 |
| CONCLUSIONES..... | 96 |
| PERSPECTIVAS | 97 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 98 |
| ANEXOS..... | 105 |
| ANEXO 1. TRABAJOS PUBLICADOS..... | 105 |
| ANEXO 2. TABLA DE COMPARACION DE T°M TEORICAS Y T°M REALES DE TODOS LOS AMPLICONES UTILIZADOS PARA LA GENOTIPIFICACIÓN | 106 |

ANEXO 3. SECUENCIAS TEORICAS DE LOS AMPLICONES GENERADOS POR
PCR DE TODOS LOS MARCADORES 107

ANEXO 4. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN Y
BLAST PARA DETERMINAR IDENTIDAD DE CADA AMPLICON..... 108

ANEXO 5. CONSENTIMIENTO INFORMADO 114

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Técnicas de reproducción asistida..... | 22 |
| Figura 2. Procedimiento de reproducción asistida con fertilización <i>in vitro</i> convencional..... | 24 |
| Tabla 1. Incidencia de aneuploidías de acuerdo al estado de desarrollo del embrión en el cual está siendo examinado..... | 26 |
| Figura 3. Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT)..... | 31 |
| Figura 4. Biopsia embrionaria..... | 34 |
| Figura 5. Procedimiento de WGA..... | 37 |
| Tabla 2: Ventajas y desventajas de los principales marcadores genéticos empleados en genotipificación de sexo por qPCR..... | 40 |
| Figura 6. Esquema que representa la proporción de DNA fetal libre que se encuentra en circulación materna..... | 43 |
| Tabla 3. Características de las pacientes de este estudio y porcentajes de aneuploidía por rango de edad materna..... | 63 |
| Tabla 4. Prevalencia de aneuploidías y riesgo (OR) por rangos de edad materna .. | 64 |
| Tabla 5. Frecuencia de aneuploidías..... | 67 |
| Tabla 6. Resultados en los ciclos de FIV por edad materna y probabilidad de implantación..... | 68 |
| Tabla 7. Uso de la fórmula de Potencial de Implantación y su comparación con los resultados finales de embarazo..... | 69 |
| Figura 7. Análisis de curvas de fusión de GAPDH, SRY y DYS14..... | 70 |
| | 71 |
| Figura 8. Productos de PCR observados mediante electroforesis capilar..... | 71 |
| Tabla 8. Validación de la prueba con sexo fenotípico..... | 72 |
| Figura 9. Análisis de correlación mediante Curva ROC..... | 74 |
| Tabla 9. Validación con embriones procedentes de espermatozoides sorteados..... | 75 |
| Figura 10. Análisis de correlación mediante una Curva ROC..... | 76 |
| Figura 11. Amplificación de TTC3, RPL17 y HSD3B2 utilizando WGA como molde..... | 78 |
| Figura 12. Productos de PCR observados mediante electroforesis capilar..... | 79 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Eficiencias de amplificación | 80 |
| Figura 14. Método de dosis génica para detección de trisomía 21 y trisomía 18 | 81 |
| Tabla 10. Detección de trisomías 18 y 21 con WGA de muestras embrionarias | 82 |
| Figura 15. Amplificación de SRY y SRY02 en DNA fetal | 83 |
| Tabla 11. Comparación de métodos de extracción y purificación de DNA en plasma materno | 84 |
| Tabla 12. Determinación de sexo en muestras de DNA de plasma materno a partir de la semana siete de gestación | 85 |
| Figura 16. Amplificación de TTC3, RPL17 y HSD3B2 en DNA libre en plasma materno | 87 |
| Tabla 13. Aneuploidías más frecuentes en embriones de día 3 y día 5 reportadas en otros países: comparación con nuestro estudio | 88 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| μl | microlitros |
| ADO | Allelic dropout (pérdida de un alelo) |
| ART | Técnicas de reproducción asistida |
| ASRM | Sociedad Americana de Medicina Reproductiva |
| BMI | Body Mass Index (Índice de Masa Corporal) |
| CGH | Comparative Genomic Hybridization (Hibridación Genómica Comparativa) |
| C _T | Ciclo umbral en el cual la muestra llega al umbral de detección de fluorescencia |
| DNA | Acido Desoxirribonucleico |
| DYS14 | Testis specific protein Y-linked (Proteína específica de testículo ligada al cromosoma Y) |
| FA | False Allele (Alelo Falso) |
| FISH | Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>) |
| FIV | Fertilización <i>In Vitro</i> |
| g | Gravedades |
| GAPDH | Gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa |
| HSD3B2 | Hidroxy-delta-5-esteroide deshidrogenasa, 3 beta-y esteroide delta-isomerasa 2 |
| ICSI | Intra-cytoplasmic Sperm Injection (Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide) |
| ICM | Inner Cell Mass (Masa celular interna) |
| min | minutos |
| ml | mililitros |
| MW | Molecular Weight (Peso molecular) |
| ng | nanogramos |
| pb | pares de bases |
| PB | Polar body (Cuerpo polar) |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa) |
| PGD | Preimplantational Genetic Diagnosis (Diagnóstico Genético Preimplantacional), de enfermedades puntuales conocidas |
| PGS | Prenatal Genetic Screening (Cribado Genético Preimplantacional), análisis genómico completo |
| PGT | Preimplantational Genetic Testing (Diagnóstico genético preimplantacional) PGS y PGD |
| Pmol | picomoles |

| | |
|-------|--|
| RPL17 | Ribosomal protein L17 (Proteína ribosomal L17) |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| SNPs | Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleótido simple) |
| SRY | Sex-determining region Y (Región determinante del sexo localizada en el cromosoma Y) |
| T° | Temperatura |
| T°m | Temperatura de fusión |
| TA | Temperatura ambiente |
| TBE | Tris/Borato/EDTA |
| TE | Trofoectodermo |
| TTC3 | Tetratricopeptide repeat domain 3 (Dominio Tetratricopeptido Repetido 3) |
| WGA | Whole Genome Amplification (Amplificación del genoma completo) |

RESUMEN

En todo el mundo, alrededor del 15% de las parejas que se encuentran en edad reproductiva tienen problemas de infertilidad. Las técnicas de reproducción asistida surgen como una solución a este problema, sin embargo el procedimiento de fertilización *in vitro* genera un mayor porcentaje de embriones aneuploides en comparación con aquellos que son concebidos de manera natural. Tomando en consideración que se puede obtener DNA genómico a partir de una biopsia embrionaria y analizarlo, se han desarrollado diferentes sistemas para detectar a los embriones aneuploides y evitar su transferencia.

El primer objetivo de este trabajo fue determinar si la tasa de aneuploidía de una cohorte embrionaria tiene impacto sobre la implantación, iniciando con un análisis de las aneuploidías más frecuentes en nuestra población y su relación con la edad materna, considerando que el análisis genómico preimplantacional es una herramienta importante en el éxito de los tratamientos de reproducción asistida. La siguiente prioridad de este trabajo fue proponer nuevas alternativas de diagnóstico genético preimplantacional basadas en técnicas de biología molecular para pacientes que no pueden costear un análisis cromosómico completo.

Para el análisis estadístico de la presencia y frecuencia de las aneuploidías en una muestra de población mexicana, se incluyeron 1629 embriones provenientes de 474 ciclos que fueron analizados en la etapa pre-implantación (PGT/HGC) durante un periodo de tres años. Se encontró que la tasa de aneuploidía general es del 48.1%, y por rango de edad, la tasa aumenta conforme aumenta la edad materna (88.2% en pacientes mayores de 43 años). Las monosomías 22, 21 y -Y, y las trisomías 16, 19 y 21 fueron las más frecuentes, similares a lo encontrado en otros países, a excepción de la trisomía 19 la cual parece ser frecuente sólo en nuestra población. También se encontró una asociación directa entre la normalidad genómica y el resultado de implantación con la que se diseñó un modelo de probabilidad de implantación tomando en cuenta la tasa de aneuploidía de la cohorte embrionaria y el número de embriones transferidos; este modelo determinó que mientras mayor es la tasa de

aneuploidía de la cohorte embrionaria, menor es la probabilidad de implantación, por lo que se propone la utilización del modelo de probabilidad de implantación como una herramienta para determinar el número de embriones a transferir y tomar decisiones oportunas acerca de los tratamientos futuros de las pacientes.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el análisis estadístico de las anomalías cromosómicas en nuestra población, se desarrolló un nuevo método de genotipificación cualitativa y cuantitativa, por medio de técnicas de PCR en tiempo real, para determinar el sexo de los embriones y detectar las trisomías 21 y 18, utilizando el genoma embrionario amplificado a partir de unas cuantas células biopsiadas (WGA) como molde. Con este método se logró determinar que la WGA provee suficiente cantidad de DNA para medir características y anomalías cromosómicas en un embrión, con un alto porcentaje de especificidad y sensibilidad, permitiendo la utilización de este método como una alternativa al análisis genómico mediante microarreglos o secuenciación masiva, que puede reducir tiempos y costos. Extendiendo esta tecnología al área pre-natal, también describimos su aplicación para la determinación del sexo fetal, abriendo la puerta para un diagnóstico prenatal de trisomías en un futuro cercano.

En este trabajo se logró demostrar la importancia que tiene el análisis genómico embrionario en los tratamientos de reproducción asistida y se propuso una nueva alternativa de diagnóstico genético preimplantacional que puede contribuir a aumentar las tasas de implantación y de embarazo y al mismo tiempo reducir costos.

ABSTRACT

Around 15% of couples who are in reproductive age worldwide have infertility problems. Assisted reproduction techniques emerge as a solution to this problem; however the *in vitro* fertilization procedure generates a higher percentage of aneuploid embryos compared to those that are conceived naturally. Taking into account that genomic DNA can be obtained from an embryo biopsy (PGT), different systems have been developed to detect aneuploid embryos and prevent their transfer.

The aim of this work was to determine if the aneuploidy rate of an embryo cohort has an impact on the implantation outcome, in addition, to determine the most frequent aneuploidies in our population and its relationship with maternal age, this in order to analyze the importance that the preimplantation genomic analysis has in the success of assisted reproduction treatments. Also, to propose new alternatives for preimplantation genetic diagnosis based on molecular biology techniques for patients who cannot afford a complete chromosomal analysis.

For the statistical analysis, 1629 embryos from 474 cycles with PGT / CGH over a period of three years were included. It was found that the general aneuploidy rate is 48.1%, and separated by age range, the rate increases as maternal age increases (88.2% in patients over 43 years old). Monosomies 22, 21 and -Y, and trisomies 16, 19 and 21 were the most frequent, these results being similar to those found in other countries, with the exception of trisomy 19, which seems to be frequent only in our population. A direct association with the implantation outcome was also found. An implantation probability model was designed taking into account the aneuploidy rate of the embryo cohort and the number of transferred embryos; This model determined that the higher the rate of aneuploidy of the embryo cohort, the lower the probability of implantation, so is proposed to use the implantation probability model as a tool to determine the number of embryos to be transferred and make decisions timely about future treatments of the patients.

Taking into account the results obtained in the statistical analysis, a new qualitative

and quantitative genotyping method was developed by real-time PCR techniques, to determine the sex of the embryos and the detection of trisomies 21 and 18, using WGA as a template. With this method, it was demonstrated that WGA provides enough DNA quality and quantity to measure chromosomal characteristics and abnormalities in an embryo, with high specificity and sensitivity, allowing the use of this method as an alternative to CGH analysis to reduce time and costs.

In this work it was possible to demonstrate the importance that embryonic genomic analysis has in the assisted reproduction treatments, in addition, a new alternative of preimplantation genetic diagnosis was proposed that can contribute to increase the implantation and pregnancy rates and to reduce costs at the same time.

INTRODUCCIÓN

El uso de tecnologías de reproducción asistida como la fertilización *in vitro* se ha extendido esta última década y una de las principales causas que las mujeres esperan más tiempo para embarazarse de su primer hijo; sin embargo, el FIV por sí solo no puede compensar las bajas tasas de fertilización que están asociadas con la edad materna avanzada (Baird et al., 2005). Durante los procedimientos de reproducción asistida (ART), es esencial sugerir a las pacientes complementar su tratamiento FIV con un diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT, *Preimplantational Genetic Testing*) para evaluar a los embriones y descartar posibles aneuploidías, defectos genéticos o enfermedades congénitas.

INFERTILIDAD Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La infertilidad se define como la falla para concebir después de un año de mantener relaciones sexuales sin protección; este problema afecta aproximadamente a un 15% de todas las parejas alrededor del mundo que se encuentran en edad reproductiva (Palermo et al., 2012). Aunque algunos perciben a la infertilidad como un asunto de calidad de vida, la Asociación Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) la considera como una enfermedad (*Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2006*). La infertilidad puede originarse por muchas condiciones, aproximadamente el 40% de los casos se deben a un factor femenino (síndrome de ovario poliquístico, diabetes, endometriosis, problemas de tiroides, obstrucción vaginal o tubárica, agentes infecciosos etc.), otro 40% a un factor masculino (diabetes, neoplasias, criptorquidismo, varicocele, eyaculación retrograda, impotencia, oligospermia, azoospermia, etc.), el 10% es de tipo mixto (causas inmunológicas o genéticas) y el otro 10% por causas inexplicables (Kamel, 2010; Maleki-Saghooni et al., 2017).

Las técnicas de reproducción asistida forman parte de los recursos de tratamiento de los trastornos de la fertilidad. Son un conjunto amplio de procedimientos caracterizados por la actuación directa sobre los gametos (ovocitos y/o

espermatozoides) con el fin de favorecer la fecundación y la transferencia de embriones en la cavidad uterina. Las tecnologías de reproducción asistida se han utilizado desde 1981 para ayudar a las mujeres a lograr el embarazo (Macaluso et al., 2010). La aparición de la fecundación *in vitro* revolucionó el enfoque del tratamiento de la infertilidad y propició el desarrollo de varias técnicas derivadas y complementarias, que han mejorado la eficacia de la fecundación *in vitro* convencional, y que a la vez han permitido ampliar el conocimiento sobre las causas de la infertilidad humana.

Existen varias modalidades para producir la fecundación, entre las más utilizadas están:

- Fertilización *in vitro* (FIV): los espermatozoides se ponen en contacto con los ovocitos en condiciones idóneas para facilitar que la fecundación ocurra espontáneamente.
- Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): es una variedad de la anterior, pero esta consiste en seleccionar al mejor espermatozoide e introducirlo en el interior de cada ovocito. Esta técnica está indicada principalmente cuando la causa de infertilidad es por un factor masculino, cuando se van a fertilizar ovocitos previamente criopreservados o cuando los embriones van a ser analizados por PGT (Palermo et al., 1996) (figura 1).

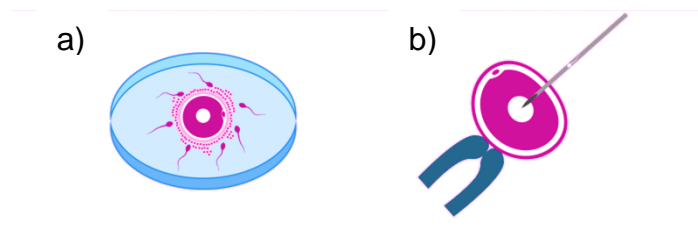


Figura 1. Técnicas de reproducción asistida.

a) Fertilización *in vitro* convencional y b) Inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Tomado de <https://www.reproduccionasistida.org/el-proceso-de-la-fecundacion-in-vitro/el-procedimiento-de-la-fiv/>

La fecundación *in vitro* en cualquiera de sus dos modalidades requiere disponer de un número elevado de ovocitos, y para obtenerlos es necesario un tratamiento de estimulación ovárica controlada con hormonas (superovulación). Este proceso de estimulación persigue tres objetivos: 1) bloquear los mecanismos fisiológicos de control del ciclo ovárico para modificar éste en función de las necesidades del tratamiento; 2) estimular el desarrollo de varios folículos y 3) desencadenar la maduración final de los ovocitos (Ventura-Junca et al., 2015).

Cuando se logra el crecimiento folicular deseado, se programa la punción folicular (36 horas después). Los ovocitos se extraen mediante punción del ovario, realizada a través de la vagina con control ecográfico y generalmente bajo anestesia. Los espermatozoides se obtienen generalmente a partir de una muestra de semen, aunque pueden proceder también de una punción del epidídimo o de una biopsia testicular (Balaban et al., 2014).

Todas las muestras se someten a una preparación en el laboratorio con el fin de seleccionar los espermatozoides que serán empleados en las técnicas de fecundación. Si se logra la fecundación, los embriones resultantes son clasificados según su morfología, después de varios días de cultivo en el laboratorio, para seleccionar a los mejores para su transferencia. Los embriones restantes que no se transfieran al útero se criopreservan, y si no se logró la gestación, pueden ser transferidos a la paciente tras iniciar una nueva preparación uterina (Balaban et al., 2014) (figura 2).

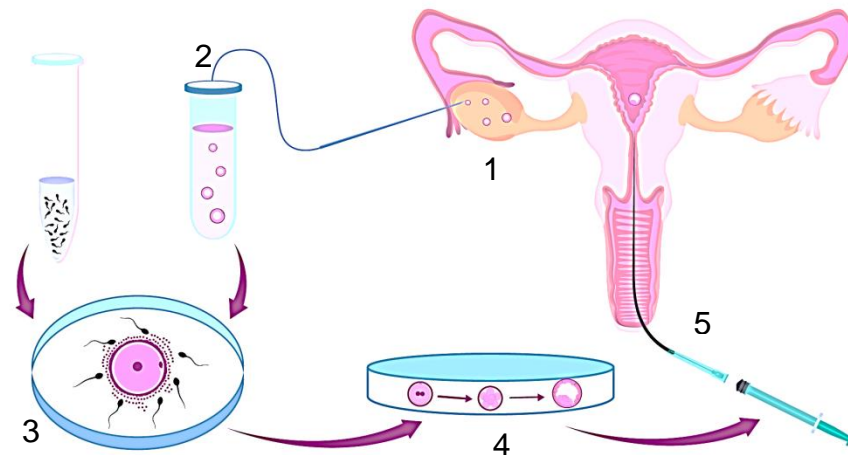


Figura 2. Procedimiento de reproducción asistida con fertilización *in vitro* convencional
 1) Estimulación ovárica y maduración folicular, 2) punción ovárica y captura de ovocitos, 3) Fertilización *in vitro*, 4) cultivo de embriones y desarrollo embrionario y 5) transferencia de embriones e implantación. Esquema tomado de <https://www.reproduccionasistida.org/el-proceso-de-la-fecundacion-in-vitro/el-procedimiento-de-la-fiv/>

ANEUPLOIDÍA

Los términos haploide y diploide que describen conjuntos de cromosomas individuales (n) y dobles ($2n$) en las células se originan de los términos griegos *haplóos* que significa solo y *diplóos* que significa doble. El término ploidía se derivó posteriormente para describir el contenido total de cromosomas de las células. En consecuencia, el término euploide se refiere a un complemento cromosómico que es un múltiplo exacto del número haploide (Orr et al., 2015). Las células del cuerpo humano (células somáticas) son diploides, portan dos conjuntos completos de cromosomas: un conjunto de 23 cromosomas del padre y un conjunto de 23 cromosomas de la madre, los dos conjuntos combinados proporcionan un complemento completo de 46 cromosomas. Los espermatozoides y ovocitos (células sexuales) son haploides y contienen solo un conjunto de 23 cromosomas.

La aneuploidía se define como un número de cromosomas que no es un múltiplo exacto del número generalmente haploide (Torres et al., 2008). Las aneuploidías pueden ocurrir por ganancias (trisomías) y/o pérdidas cromosómicas (monosomías) debido a errores de segregación cromosómica, (aneuploidía denominada "cromosómica completa"), o debido a reordenamientos de partes cromosómicas a menudo acompañadas de deleciones, amplificaciones o translocaciones de grandes

regiones del genoma (aneuploidía denominada "estructural o segmentaria" (Storchova, 2012).

Las aneuploidías cromosómicas enteras pueden surgir debido a eventos de segregación cromosómica aleatoria y esporádica que ocurren con baja frecuencia durante cualquier división celular. Los niveles de mala segregación varían de 1/1000 a 1 / 10,000 en células humanas (Hassold et al., 2007).

La meiosis genera gametos haploides a través de un proceso especializado de división celular que consiste en una ronda de replicación del ADN seguida de dos divisiones celulares. La primera división, o meiosis I (MI), implica la segregación de cromosomas homólogos entre sí, mientras que la meiosis II (MII) implica la segregación de las cromátides hermanas. La mala segregación puede ocurrir también en las células germinales y los errores que surgen en la meiosis resultan en embriones aneuploides (Hassold and Hunt, 2001).

INCIDENCIA DE ANEUPLOIDÍA

El nivel de aneuploidías en humanos varía enormemente dependiendo del estado de desarrollo del embrión que está siendo examinado (tabla 1). Los errores de segregación cromosómica meiótica ocurren con mayor frecuencia durante la oogénesis (~ 20%), especialmente durante la primera división meiótica (MI); la incidencia de errores meióticos en ovocitos es más elevada en mujeres con edad materna avanzada y puede deberse al tiempo prolongado en que los ovocitos pasan detenidos en la MI antes de la ovulación (Battaglia et al., 1996). Sin embargo, algunos patrones de no disyunción parecen ser específicos de ciertos cromosomas, por ejemplo casi todos los casos de trisomía 16 están relacionados con errores en la MI, mientras que los errores en MII son comunes en la trisomía 18. En los espermatozoides, la incidencia de aneuploidía es solo del 2% (Hassold, 1998). Otro porcentaje considerable de errores (~20%) surgen durante las primeras mitosis después de la fertilización. Entre los abortos espontáneos clínicamente reconocidos (muertes fetales que ocurren entre 6-8 semanas y 20 semanas de gestación), la incidencia aumenta hasta el 50% (Kim et al., 2010). Las anomalías específicas

más comunes encontradas son la monosomía sexual cromosómica (45, X) que representan casi el 10% de todos los abortos espontáneos, y las trisomías 16, 21 y 22, que en conjunto constituyen el 50% de todas las trisomías identificadas en los abortos espontáneos. La incidencia entre mortinatos (muertes fetales que ocurren entre la semana 20 de gestación hasta término) es del 4% con los tipos de anomalía similares a los identificados en recién nacidos. Alrededor del 0.3% de los embriones aneuploides que se transfieren resultan en embarazos viables con nacidos vivos, las anomalías más comunes encontradas en estos bebés son trisomías 21, 18, 13 y trisomías en los cromosomas sexuales 47, XXX, 47, XXY, 47, XYY (Hassold et al., 1996; Hassold and Hunt, 2001).

Tabla 1. Incidencia de aneuploidías de acuerdo al estado de desarrollo del embrión en el cual está siendo examinado

| Etapa de desarrollo | Semanas de gestación | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------|----------|----------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|------------------------------|
| | 0 | 0 | 0 | 0-5 | 6-8 | 9-20 | 40 |
| | Esperma | Ovocitos | Embriones pre-implantación | Abortos pre-clínicos | Abortos espontáneos | Nacidos muertos | Nacidos vivos |
| Incidencia de aneuploidías | 1-2% | ~20% | ~20% | ? | 35% | 4% | 0.3% |
| Aneuploidías más comunes | Varias | Varias | Varias | ? | 45,X; +16; +21; +22 | +13; +18; +21 | +13; +18; +21; XXX; XXY; XYY |

Modificado de (Hassold and Hunt, 2001).

LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO* GENERA MAYORES TASAS DE ANEUPLOIDÍA

En los embriones producidos *in vitro* existe una alta tasa de aneuploidía cromosómica (~50%); los embriones aneuploides tienen un potencial reducido para lograr un embarazo viable. Para las parejas infértiles se sabe que el riesgo de aneuploidía aumenta mucho con el avance de la edad materna (hasta el 85%) (Harton et al., 2013). Las aneuploidías son reconocidas como la principal causa de fracaso en los tratamientos de reproducción asistida, debido a que ocasionan fallos de implantación y abortos espontáneos (Lathi et al., 2008); entre las concepciones que sobreviven hasta el término, la aneuploidía es la principal causa genética de discapacidades del desarrollo y retraso mental (Hassold and Hunt, 2001).

La tasa de aneuploidía relativamente alta observada en embriones humanos después de un ciclo de FIV/ICSI se ha atribuido a la técnica en sí, ya que esta prevalencia parece ser menor en las concepciones naturales (Simon et al., 1998). Se han propuesto muchas hipótesis con las que asocian el aumento de la tasa de aneuploidía en embriones FIV: (1) tratamientos de estimulación ovárica controlada, (2) factores relacionados con la técnica de ICSI y (3) condiciones de laboratorio como el cultivo embrionario.

ESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA

Las gonadotropinas se usan comúnmente para la superovulación en animales y humanos, es decir para aumentar el número de ovocitos que se pueden recuperar para la FIV. La administración exógena de gonadotropinas da como resultado concentraciones más altas de estradiol que pueden afectar la calidad de los embriones y/o los ovocitos. Los efectos de la estimulación ovárica se han caracterizado bien en animales, principalmente en el modelo murino, y han demostrado que la estimulación agresiva conduce a un desarrollo embrionario más deficiente y a un aumento en la tasa de anomalías cromosómicas (Elbling and Colot, 1985). Sin embargo, en los humanos, los estudios son escasos y menos concluyentes. Un estudio reciente en una población de mujeres jóvenes

normovulatorias demostró que una respuesta ovárica alta después de una estimulación ovárica controlada con dosis moderadas de gonadotropina, no aumenta la tasa de aneuploidía embrionaria, de hecho, cuanto mayor es la respuesta ovárica, mayor es el número de embriones euploides obtenidos (Labarta et al., 2017); la pregunta pendiente es si esto también se puede extrapolar a pacientes infértiles con buena reserva ovárica.

INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

La ICSI se ha vuelto crítica para el tratamiento de la infertilidad masculina severa. La principal característica de la ICSI es la inyección directa de espermatozoides en un ovocito, lo que facilita la producción de embriones fertilizados independientemente de las características del semen (como la concentración y la motilidad de los espermatozoides). La integridad cromosómica de los embriones fecundados por ICSI puede estar comprometida en comparación con los embriones obtenidos de una fertilización *in vitro* (In't Veld et al., 1997; Macas et al., 2001). Durante el procedimiento de ICSI, el pretratamiento del esperma se realiza para imitar las condiciones de la fertilización natural y apoyar la progresión de los efectos de la fertilización. Los estudios con modelos murinos revelaron que la integridad cromosómica de cigotos derivados de ICSI sin pretratamiento de espermatozoides se vio afectada en comparación con cigotos derivados de FIV convencional (Tateno, 2009) Las condiciones de cultivo de los espermatozoides también pueden afectar la estabilidad cromosómica del embrión (Tateno and Kamiguchi, 2007). El daño cromosómico entonces puede ocurrir debido a la inyección de espermatozoides intactos no capacitados, así que para reducir el riesgo de aberraciones cromosómicas durante el procedimiento de ICSI, es importante que la capacitación de los espermatozoides y la reacción acrosómica sean artificial y apropiadamente inducidos en el medio apropiado antes de su uso (Watanabe, 2018).

CULTIVO EMBRIONARIO

La fertilización y el desarrollo de embriones *in vitro* tienen el potencial de introducir (a menudo por inadvertencia) tensiones que no solo pueden afectar el desarrollo embrionario en el laboratorio, sino que también pueden tener efectos posteriores a la transferencia. *In vivo*, el embrión pre implantación en desarrollo está expuesto a gradientes de nutrientes, hormonas, citosinas y factores de crecimiento a medida que avanza a través de la trompa de Falopio hacia el útero. Dentro del lumen del tracto femenino, el embrión reside en unos pocos cientos de nanolitros de un líquido viscoso complejo caracterizado por niveles elevados de mucinas, albúmina y glicosaminoglicanos y por niveles reducidos de oxígeno (típicamente 2-8%). El embrión está en constante movimiento, movido por una suave acción ciliada y muscular del tracto femenino (Gardner et al., 1996). Este escenario está en marcado contraste con el entorno de laboratorio, donde típicamente los gametos y embriones están expuestos a volúmenes relativamente grandes de medio de cultivo, permanecen estáticos, descansando sobre un sustrato de poliestireno y crean capas no agitadas donde los productos finales del metabolismo se concentran y los nutrientes se vuelven limitantes (Gardner and Lane, 2014a; Gardner and Lane, 2014b). Los embriones son sensibles a las señales químicas y físicas dentro de su microambiente. Factores dentro del laboratorio como: nivel de oxígeno, amonio liberado de aminoácidos en el cultivo, mala calidad del aire de laboratorio, temperatura y pH, recubrimiento de aceite, volumen/densidad del cultivo de embriones, naturaleza estática del cultivo, luz o incluso factores mecánicos como el pipeteo, pueden impactar negativamente en los gametos y embriones y generar estrés. Cuando hay más de un factor de estrés presente en el laboratorio, pueden producirse más sinergias negativas, estos factores juegan un papel importante en el desarrollo y eventos posteriores a la transferencia (Wale and Gardner, 2016). Por ejemplo, estudios recientes han informado que una disminución en la temperatura tiene el potencial de afectar la estabilidad del huso meiótico del ovocito, reduciendo las tasas de fertilización, retrasando el desarrollo embrionario y disminuyendo las tasas de embarazo clínico (Wang et al., 2001). Sin embargo, se necesitan más

estudios para demostrar el impacto del cultivo embrionario sobre la tasa de aneuploidía.

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (PGT)

El diagnóstico genético preimplantacional se introdujo en la práctica clínica como una herramienta para seleccionar embriones cromosómicamente sanos antes de ser transferidos al útero materno, el PGT se ha ofrecido por 25 años a las parejas que se someten a tratamientos de reproducción asistida. Los embriones generados por FIV o ICSI son analizados para encontrar defectos genéticos, permitiendo así que sólo aquellos embriones sanos sean seleccionados para ser transferidos al útero (Zacchini et al., 2017). El PGT está indicado para aquellas parejas portadoras de translocaciones cromosómicas, enfermedades monogénicas, enfermedades genéticas ligadas al sexo, falla recurrente de implantación, abortos recurrentes y edad materna avanzada entre otras (Chen et al., 2017) (figura 3).

Mientras que el PGD es diagnóstico y se encarga de analizar enfermedades monogénicas conocidas, el PGS (*screening*) analiza todo el perfil cromosómico del embrión. El PGS surgió para tratar de remediar el 30% de los fracasos de un tratamiento FIV que se deriva de la transferencia de embriones aneuploides. (Angell et al., 1986). El objetivo del PGS es incrementar las tasas de embarazo en ART, transferir un solo embrión sano y prevenir embarazos con bebés anormales. Aquellos embriones diagnosticados como libres de enfermedades genéticas con una constitución genética balanceada pueden ser transferidos al útero de la mujer en día 5 después de la fertilización. Aproximadamente el 24% de los embriones implantados llegan a término (Vermeesch et al., 2016).

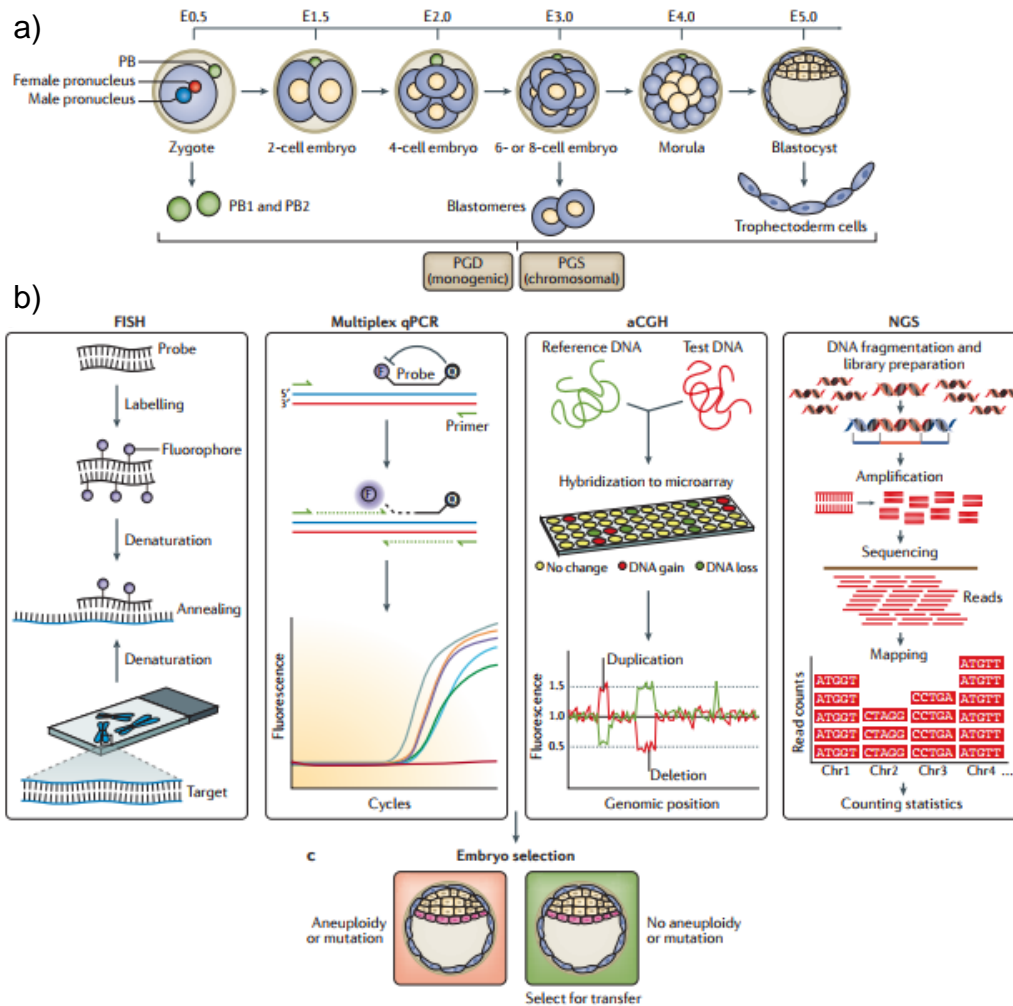


Figura 3. Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT)

a) Los estados de desarrollo embrionario en días (E.05, E 1.5, etc) y el tipo de muestra para analizar para PGT puede ser cuerpos polares en día 0, blastómeras en día 3 o trofoectodermo en día 5. b) Los métodos aplicados para el PGT pueden ser FISH, PCR, aCGH o NGS. Tomado de (Vermeesch et al., 2016).

Un componente del protocolo del PGT es la biopsia embrionaria que permite obtener unas cuantas células para ser analizadas genéticamente. En 1989 se demostró que el cuerpo polar o una o más células embrionarias podían obtenerse mediante una biopsia a partir de un embrión en estado de clivaje o del trofoectodermo sin comprometer la viabilidad del mismo (Handyside et al., 1989).

BIOPSIA EMBRIONARIA

La biopsia es un paso crucial para el PGT, una biopsia exitosa es un pre-requisito para un ciclo con PGT exitoso. La biopsia tiene que obtener material genético en condiciones óptimas para el análisis genético excluyendo al mismo tiempo cualquier impacto negativo en la viabilidad del embrión (Xu and Montag, 2012). La biopsia puede ser efectuada en diferentes estadios después de la fertilización del ovocito, la mejor opción es seleccionar el tipo de biopsia de acuerdo al análisis de PGT requerido. Para todas las opciones de biopsiado el primer paso es desgarrar la zona pelúcida que rodea el embrión (generalmente con ayuda de un láser) (Harper et al., 2012).

BIOPSIA DE CUERPO POLAR

Los cuerpos polares (PB) son células haploides producidas durante la primera maduración completa del ovocito (primer PB) y segunda división meiótica después de la fertilización (segundo PB). Para determinar el genotipo de un ovocito fertilizado se requieren resultados de ambos PBs y sus biopsias deben realizarse simultáneamente. La biopsia del primer PB debe efectuarse a las 4-12 h después de la fertilización con ICSI, y la biopsia del segundo PB debe ser durante las 8-16 horas (Xu and Montag, 2012). Sin embargo, la biopsia de PBs supone ciertas desventajas y limitantes, debido a que los PBs no están destinados a convertirse en parte del embrión en desarrollo, y que el diagnóstico de ambos PBs dobla el número de muestras para el análisis. Además, ya que algunos ovocitos no pueden fertilizar o formar embriones, el análisis de todos los PBs puede ser un desperdicio de recursos. Finalmente, el análisis de PB solo puede excluir mutaciones o aneuploidías de origen materno porque la contribución genética al embrión del padre permanece desconocida (Traeger-Synodinos, 2017).

BIOPSIA DE BLASTÓMERA

En día tres, el embrión alcanza el estado de clivaje que comprende de 6 a 10 células (blastómeras) y sucede aproximadamente 66 a 72 horas después de la FIV. En este estadio las células siguen siendo totipotentes. El análisis de PGT inicia con la biopsia de una o dos blastómeras de cada embrión, aunque el análisis de una sola blastómera alcanza una alta especificidad y sensibilidad. Varios estudios han demostrado que disminuye la probabilidad de éxito de embarazo cuando dos blastómeras son removidas en vez de biopsiar sólo una (Haapaniemi Kouru et al., 2012). La biopsia en día 3 se efectúa para aquellos embriones que se van a transferir en fresco y el resultado es necesario para transferir en día 5. Sus desventajas son la posibilidad de perder la muestra en la biopsia debido a que es una sola célula la que se aísla, y las altas tasas de mosaicismos que presentan los embriones durante este estado de desarrollo, por lo que los resultados de PGT pueden no ser tan precisos (Mertzanidou et al., 2013) (figura 4).

BIOPSIA DE BLASTOCISTO

En los días 5-6 después de la FIV, el embrión se desarrolla a blastocisto que contiene aproximadamente 100 células. En esta etapa el embrión se diferencia en dos tipos celulares: uno que forma la capa externa denominada trofoectodermo (TE) y que posteriormente dará lugar a la placenta, y el otro que forma la masa celular interna (ICM) y que posteriormente dará lugar al embrión.

Durante la biopsia, de 5-10 células del trofoectodermo son removidas para su análisis, lo que en comparación con la biopsia de blastómera, representa una ventaja sobre la cantidad de material genético disponible, además durante el procedimiento de biopsiado, no se alcanza a tocar la ICM, por lo que el embrión no es alterado (Traeger-Synodinos, 2017).

Los primeros ciclos con PGT procedentes de una biopsia de blastocisto fueron reportados en el 2005 con altas tasas de embarazo (Kokkali et al., 2005). La biopsia en día 5 cada vez está siendo más utilizada aunque solo un 40-50% de los embriones se desarrollan hasta esta etapa *in vitro*. La única limitante es que no alcanza el tiempo

para tener los resultados y transferir al día siguiente, por lo que es necesaria la criopreservación de embriones que serán transferidos en ciclos subsecuentes (Xu and Montag, 2012) (figura 4).

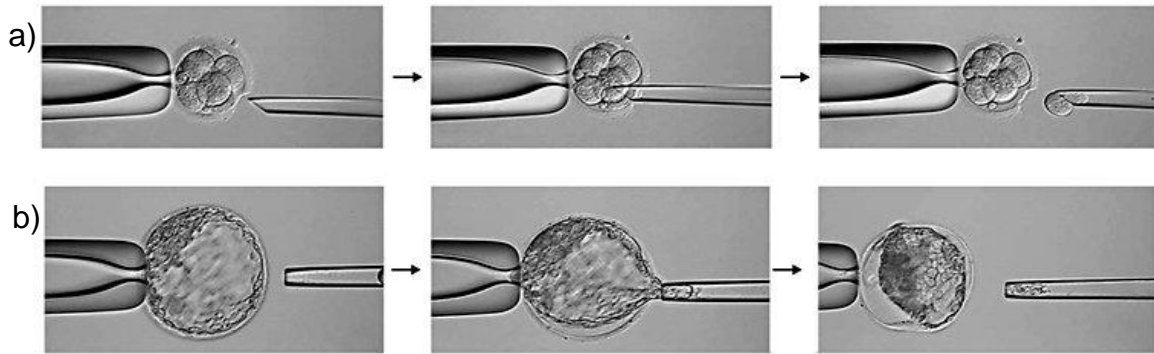


Figura 4. Biopsia embrionaria

a) Biopsia de blastómera y b) Biopsia de blastocisto. Tomado de (Kane et al., 2016).

TÉCNICAS PARA PGT

Los métodos estándar se basan en la implementación de técnicas moleculares y citogenéticas, las principales técnicas para diagnóstico genético preimplantacional son: Hibridación Fluorescente In Situ (FISH), PCR cuantitativa multiplex (multiplex-qPCR), Hibridación Genómica Comparativa con Microarreglos (aCGH) y la más recientemente Secuenciación Masiva en Paralelo (NGS) (Vermeesch et al., 2016).

FISH (HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE)

Permite analizar determinados cromosomas o regiones por medio de sondas fluorescentes específicas; los cromosomas que son usualmente analizados por FISH son el 13, 18, 21, X e Y (Feldman et al., 2000). Era una técnica muy prometedora, sin embargo se logró demostrar que con esta técnica no existía un aumento significativo en la tasa de embarazo, esto ha sido atribuido a factores tanto técnicos como biológicos. En primer lugar, un conjunto limitado de sondas revela información relevante sólo para un conjunto específico y predeterminado de cromosomas, pero no existe información respecto al número de copias del resto del genoma, además, requiere de una labor intensiva y el previo conocimiento de las regiones de interés (Mastenbroek et al., 2007).

QF-PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA MÚLTIPLE)

Combina las propiedades de la PCR cuantitativa con el marcaje fluorescente. La QF-PCR detecta el número de copias de los cromosomas seleccionados amplificando secuencias micorsatélites (STR) en loci polimórficos. Las ventajas sobre el FISH se reflejan en el hecho de que es más económico, consume menos tiempo y menos labor operativa (Plaseski et al., 2008)

A-CGH (HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA CON MICROARREGLOS)

La tecnología de microarreglos se utiliza para detectar variaciones en el número de copias a lo largo de todo el genoma. Los arreglos para la comparación genómica por hibridación (aCGH) se basan en la comparación de la muestra del paciente y un control normal (Breman et al., 2012; Lupski, 1998; Srebniak et al., 2011).

Las ventajas de utilizar aCGH son tener la habilidad de detectar cambios en el número genómico de copias con una mejor resolución que un análisis cromosómico estándar, con una labor menos intensiva y mucho más automatizada. Con el uso de la tecnología WGA (*whole genome amplification*) que consiste en la fragmentación del genoma inicial y su posterior amplificación para hacer múltiples copias a partir de una sola molécula de DNA, disminuye el tiempo total del diagnóstico y permite la detección de desbalances cromosómicos mayores de 100kb (Rickman et al., 2005).

NGS (SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO)

Esta tecnología proporciona un rendimiento 100 veces mayor que la secuenciación por el método de Sanger clásico (Perez-Enciso and Ferretti, 2010). La NGS tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, inversiones, translocaciones y duplicaciones (Rodríguez-Santiago, 2012). El método empleado consiste en alinear los *reads* (secuencias cortas producidas por el instrumento a partir de los extremos de ADN con los adaptadores) al genoma de referencia y realizar conteos de aquellos que se alinean

en cada cromosoma para calcular el número de copias relativo de los cromosomas. Por ejemplo, en las trisomías el número de copias relativo del cromosoma alterado debe estar significativamente sobre-representado en el conjunto de datos. Estudios previos han logrado optimizar los algoritmos y métodos de análisis hasta llegar a un 100% de acierto en el diagnóstico de trisomías de los cromosomas 21 y 18 (Sehnert et al., 2011).

AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (WGA)

Para algunas aplicaciones de PGT, la cantidad de material genómico inicial es extremadamente limitado y en algunos casos restringido a una sola célula (que corresponde aproximadamente a 7pg de DNA (Araki et al., 1987). En estos casos, el análisis directo del DNAg de la muestra es técnicamente difícil, para que este tipo de muestras puedan ser analizadas mediante análisis moleculares modernos, el DNAg debe ser amplificado. El procedimiento de amplificación tiene que asegurar alta cobertura genómica, mantener la composición de la secuencia sin introducir variaciones de secuencia artificiales, permitir la cuantificación de variaciones en el número de copias y que todas las regiones del genoma se amplifiquen homogéneamente (Wells et al., 1999).

La técnica de WGA puede amplificar el genoma completo de una sola célula a nivel de microgramos representando la secuencia original completa. Se estima que aproximadamente el 96% del genoma puede ser amplificado al menos 1000 veces, los fragmentos generados son de hasta 3kb y ricos en fragmentos de 400 y 500pb (Paunio et al., 1996). Este método aborda varias de las limitaciones de analizar una o pocas células, entre ellas: suficiente DNA es amplificado permitiendo el diagnóstico de cualquier defecto genético o cromosómico y la oportunidad de repetir el análisis en caso de ser necesario (Wells et al., 1999).

Se han desarrollado varios métodos de WGA, la mayoría de ellos basados en el principio de la PCR, ésta técnica permite la amplificación exponencial del DNA usando DNA polimerasa y pares de oligonucleótidos universales. Para amplificar genomas completos se deben aplicar tres principios básicos: incrementar la cantidad de

eventos de hibridación de oligonucleótidos, reducir la complejidad del genoma antes de la amplificación (es decir, su fragmentación en secuencias más cortas) y la utilización de enzimas alternativas mucho más eficaces. La WGA basada en la pre-amplificación por extensión de oligonucleótidos utiliza oligonucleótidos aleatorios de 15pb de longitud con ciclos largos de alineamiento y elongación (Czyz et al., 2015) (figura 5).

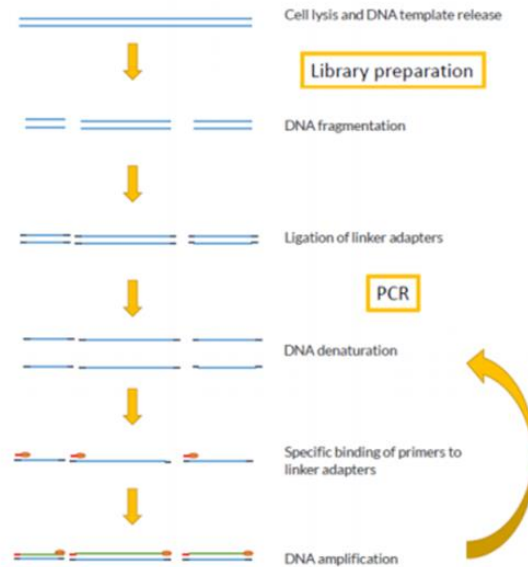


Figura 5. Procedimiento de WGA

La célula es lisada para liberar el DNA que servirá como molde, posteriormente el DNA es fragmentado y en los extremos de cada fragmento se unen ligadores que contienen sitios de unión específica de oligonucleótidos, los oligonucleótidos se hibridan en el sitio de unión y los fragmentos se amplifican por PCR.

ERRORES EN LA GENOTIPIFICACIÓN CUANTITATIVA CON WGA Y PCR

Los métodos actuales de WGA pueden generar algunos problemas en la amplificación, produciendo errores en la genotipificación cuantitativa (variación en el número de copias), resultando en regiones sobre y sub representadas en el genoma. Un error de genotipificación es definido como una diferencia alélica en un genotipo determinado usando una muestra con baja calidad de DNA comparada con un genotipo de referencia (Broquet and Petit, 2004).

Los errores de genotipificación más comunes son: el *allelic dropout* (ADO), cuando uno de los alelos de un individuo heterocigoto no amplifica en la PCR, es decir, implica la posibilidad de no detectar un alelo en un individuo heterocigoto, esto debido a que la región que se desea amplificar no está muy representada en la WGA, y el *false allele* (FA) cuando se genera un alelo extra durante los primeros ciclos de amplificación por PCR, que realmente no es un alelo, sino un artefacto con amplificación inespecífica. Es por eso que cuando se trabaja con WGA y genotipificación es importante medir el porcentaje de ADO y FA en los resultados finales (Taberlet et al., 1996).

Sin embargo, ciertos métodos de WGA, como el que se utiliza en el estuche SurePlex®, hacen posible detectar alteraciones de variaciones en el número de copias con una buena resolución. Este método tiene una cobertura uniforme de amplificación de todo el genoma disminuyendo así, los errores de genotipificación (Deleye et al., 2015).

GENOTIPIFICACIÓN BASADA EN TÉCNICAS DE PCR

Algunas de las técnicas de genotipificación más caracterizadas basadas en PCR son la determinación de sexo, que consiste en la detección de marcadores asociados al cromosoma Y (las ventajas y desventajas de cada marcador se encuentran en la tabla 2), y la variación en el número de copias, que consiste en la aplicación del método de dosis génica.

GENES UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SEXO

SRY (REGIÓN DETERMINANTE DEL SEXO-Y): El origen sexual de los individuos es convencionalmente determinado usando el gen SRY, es un gen de copia única que codifica para un factor de transcripción específico de los testículos que influye en el desarrollo sexual diferencial en los mamíferos y se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma Y (Cui et al., 1994).

DYS14 (PROTEÍNA ESPECÍFICA DE TESTÍCULO LIGADA A Y): Este gen está involucrado en la espermatogénesis. Se localiza en el intrón 1 del gen multicopia TSPY en el brazo corto del cromosoma Y; un solo cromosoma Y contiene en promedio más de 50 copias del gen TSPY, y cada copia contiene al marcador DYS14, por lo que es más preciso para la selección de sexo debido a su gran cantidad de copias (Blagodatskikh et al., 2010).

AMELOGENINA: Es una proteína producida por los ameloblastos, contribuye en la organización de la estructura del esmalte durante el desarrollo dental, regula la iniciación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita durante la mineralización del esmalte dental, y ayuda a dirigir a las células que forman el cemento hacia la superficie del diente. Es un gen de copia única, ubicado en el brazo corto de los cromosomas sexuales X y Y. Si se amplifica el intrón 1, en el cromosoma X el gen (AMELX) da lugar a un producto de amplificación de 106 bp, y en el cromosoma Y el gen (AMELY) da lugar a un amplicón de 112 bp, de tal forma que el gen en el cromosoma Y posee 6 bp más que en el cromosoma X, por lo que puede ser usado en la determinación del sexo (Pascual, 2009).

Tabla 2: Ventajas y desventajas de los principales marcadores genéticos empleados en genotipificación de sexo por qPCR

| Gen | Ventajas | Desventajas |
|--------------------|--|---|
| Amelogenina | -Se utiliza solo un par de iniciadores para la detección de ambos cromosomas | -No se puede observar la diferencia de 6 pb en un gel de agarosa, es necesario un gel de alta resolución -Dificultad para amplificar AMELY a partir de WGA |
| SRY | -Fragmento grande, fácilmente amplificable tomando como molde inicial WGA | -Es un gen de copia única -A veces puede dar falsos negativos |
| DYS14 | -Múltiples copias en el cromosoma (aprox. 40 copias en un solo cromosoma Y) | - A veces puede dar falsos positivos |

DOSIS GÉNICA PARA DETECCIÓN DE NÚMERO DE COPIAS

La qPCR es un sistema que detecta la cantidad inicial de DNA indicada por el número de ciclos de amplificación necesarios para llegar a un nivel de fluorescencia detectable (ciclo umbral o Ct). El Ct se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de copias del templado inicial. Por lo tanto, cuanto más alto es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia y el valor de Ct será más bajo (Oldach, 1999).

En caso de una trisomía, la cantidad de DNA en un cromosoma aneuploide sería mayor que la cantidad de DNA de un cromosoma euploide, y por lo tanto el Ct de la muestra donde se encuentre la trisomía se reflejará en un menor valor (Boulay et al., 1999), por lo que si dos fragmentos de genes localizados en diferentes cromosomas tienen una eficiencia de amplificación similar, la diferencia en sus valores de Ct (ΔCt) servirá como indicador de una anomalía cromosómica (Tsuji et al., 2006).

Dos anomalías genéticas comunes y con alta prevalencia durante los procedimientos de FIV son la trisomía 21 (síndrome de Down) y la trisomía 18 (síndrome de Edwards). Para la trisomía 21, métodos actuales incluyen el análisis de

la región crítica del síndrome de Down, localizada en el brazo “q” del cromosoma 21, la cual contiene varios genes cuya duplicación está directamente involucrada en características fenotípicas del síndrome de Down, como el gen TTC3 (Dominio Tetratricopéptido Repetido 3) el cual se expresa en células neuronales, y se ha visto que su sobreexpresión en síndrome de Down está relacionada con el retraso mental en estos pacientes (Kong et al., 2015; Tsujie et al., 2006). Recientemente la amplificación cuantitativa del gen TTC3 demostró que puede discriminar entre sujetos con síndrome de Down y sujetos sanos, sin embargo este y algunos otros estudios similares se centran en diagnóstico prenatal y neonatal (Tsujie et al., 2006). Para la trisomía 18, se ha examinado el gen RPL17 (proteína ribosomal 17), localizado en el brazo “q” del cromosoma 18, el cual es un inhibidor del crecimiento del músculo liso vascular (Smolock et al., 2012), y su sobreexpresión en síndrome de Edwards podría estar relacionada con los problemas cardiovasculares que presentan los pacientes con esta condición, sin embargo la asociación entre RPL17 y la detección de trisomía 18 aún no ha sido investigada. HSD3B2 es un gen que codifica para una enzima deshidrogenasa que juega un papel crucial en la biosíntesis de las hormonas esteroideas, se localiza en el brazo p del cromosoma 1. Debido a que el brazo p del cromosoma 1 se reporta con un bajo índice de duplicaciones (Warden et al., 2001), este gen podría funcionar como un gen regulador (endógeno) en los análisis cuantitativos en el método de dosis génica. Su funcionalidad para éste fin, aún no ha sido estudiada.

DIAGNÓSTICO PRENATAL

El diagnóstico prenatal contempla todas aquellas acciones que tienen por objeto la detección y/o el diagnóstico de un defecto congénito, entendiendo como tal toda anomalía en el desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacer, externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no, única o múltiple (Stembalska et al., 2007).

Las aneuploidías son la causa del 25% de las muertes perinatales (Bozzette, 2002). La trisomía 21 (Síndrome de Down) es la trisomía autosómica clínicamente más

importante y frecuente cuya incidencia es de 1 en 800 nacimientos en la población general, pero el riesgo aumenta con el incremento de la edad materna, seguida por la trisomía 13 (Síndrome de Patau) con una incidencia de 1 en 10,000 recién nacidos y la trisomía 18 (Síndrome de Edwards) que se presenta en 1 de 6,000 nacimientos. También son frecuentes las aneuploidías en los cromosomas sexuales (Ferrari et al., 2014). El diagnóstico precoz de cualquier defecto congénito en el feto posibilita la adopción de las medidas más adecuadas, tanto durante el embarazo como durante el parto y evita riesgos innecesarios a la madre e hijo.

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRA FETAL NO INVASIVOS

Actualmente existen técnicas no invasivas que no conllevan ningún riesgo de pérdida fetal como: la obtención de DNA fetal libre en plasma materno, de células fetales a partir de sangre periférica materna o a partir de un raspado transcervical.

DNA FETAL LIBRE EN SANGRE MATERNA

En 1997, Lo y colaboradores, demostraron la presencia de DNA fetal libre en sangre materna, los fragmentos de DNA fetal libre son detectables en sangre materna desde la semana cinco de gestación hasta el nacimiento, donde desaparecen rápidamente y llegan a ser indetectables después de dos horas (Lo et al., 1999). El DNA fetal libre en sangre materna se origina por la apoptosis de células placentarias o de eritrocitos fetales que atraviesan la placenta pasando a la sangre materna. La cantidad de DNA fetal libre comprende alrededor del 3-6% y hasta el 10% del DNA total libre en plasma, el resto es de origen materno (figura 6). Distinguir o aislar DNA fetal es un gran desafío debido al alto nivel de similitud molecular.

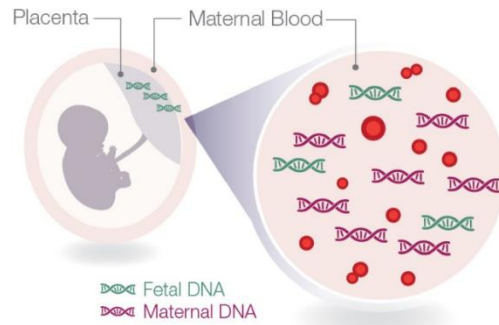


Figura 6. Esquema que representa la proporción de DNA fetal libre que se encuentra en circulación materna
Tomado de (Lo et al., 1997).

Actualmente el DNA fetal libre permite la detección de:

- Enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales y la determinación del grupo sanguíneo RhD fetal
- Anomalías genéticas derivadas del padre que no se encuentran presentes en el genoma materno
- Detección de algunas aneuploidías como trisomía 13, 18 y 21 (Ferrari et al., 2014).

JUSTIFICACIÓN

En la práctica de la Medicina Reproductiva moderna, el Diagnóstico Genético Preimplantacional que se basa en la amplificación extraordinaria del DNA genómico embrionario mediante WGA previo a la transferencia embrionaria, es una necesidad que requiere el uso de técnicas altamente complejas y costosas. La posibilidad de examinar de forma más focalizada y menos costosa, ciertas características y anomalías en los embriones antes de que estos sean transferidos e implantados en el útero materno utilizando como molde WGA, permitirá hacer análisis diagnósticos moleculares más sencillos y accesibles logrando así una mejor selección embrionaria y promoviendo el logro de embarazos con productos genómicamente normales.

HIPÓTESIS

El desarrollo de un nuevo método de PGT basado en las necesidades reales de los pacientes y utilizando técnicas de PCR con WGA como molde proveerá una selección embrionaria eficiente y de bajo costo.

OBJETIVO GENERAL

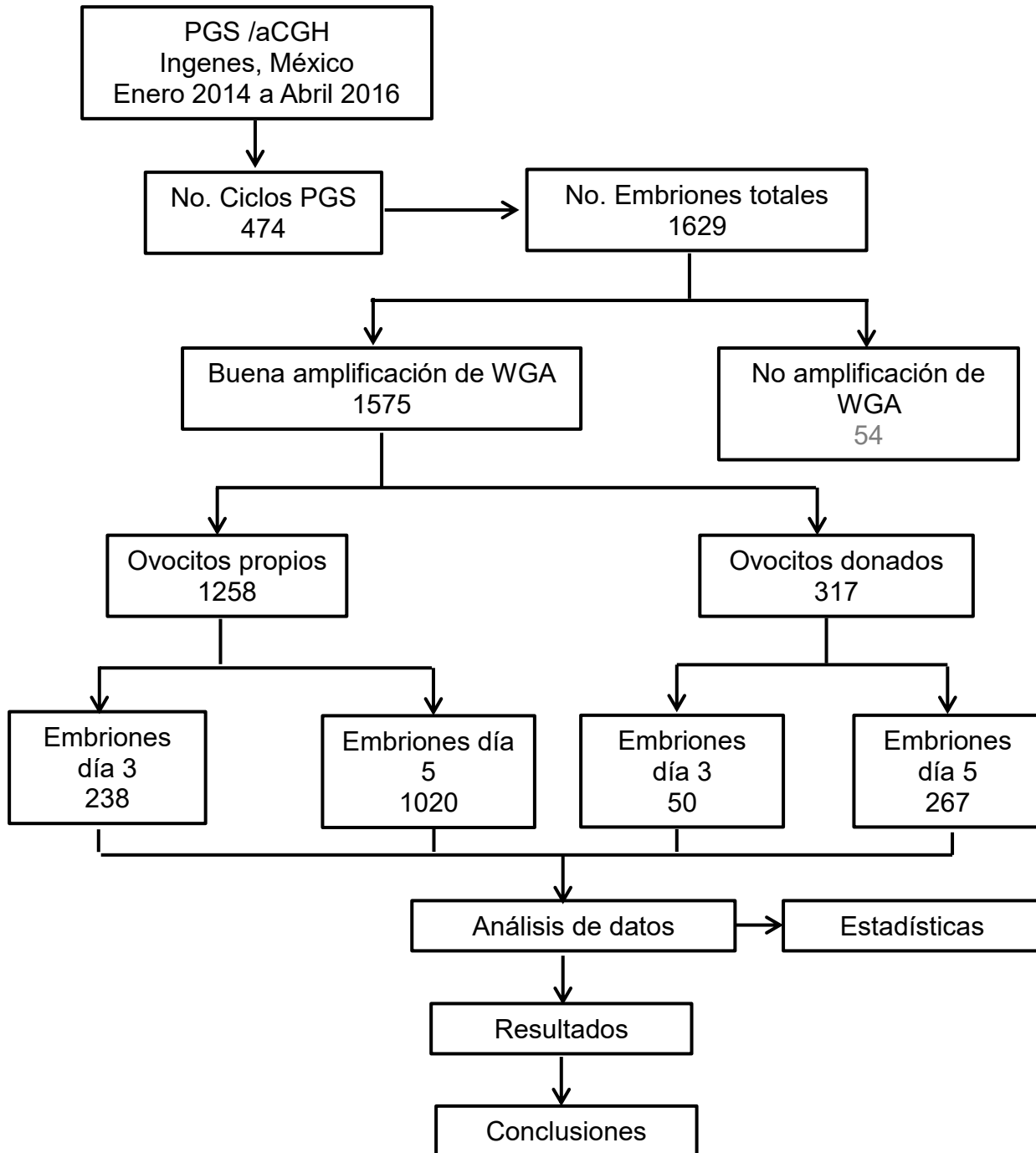
Demostrar el impacto que el análisis genómico preimplantacional tiene en el éxito de los tratamientos de reproducción asistida y estandarizar un nuevo método de genotipificación diagnóstica pre-implantacional basado en la detección del cromosoma Y y de las trisomías 18 y 21 en biopsias embrionarias, mediante técnicas de qPCR, DOSAGE GÉNICO y utilizando como molde un amplificado del genoma completo (WGA).

OBJETIVOS PARTICULARES

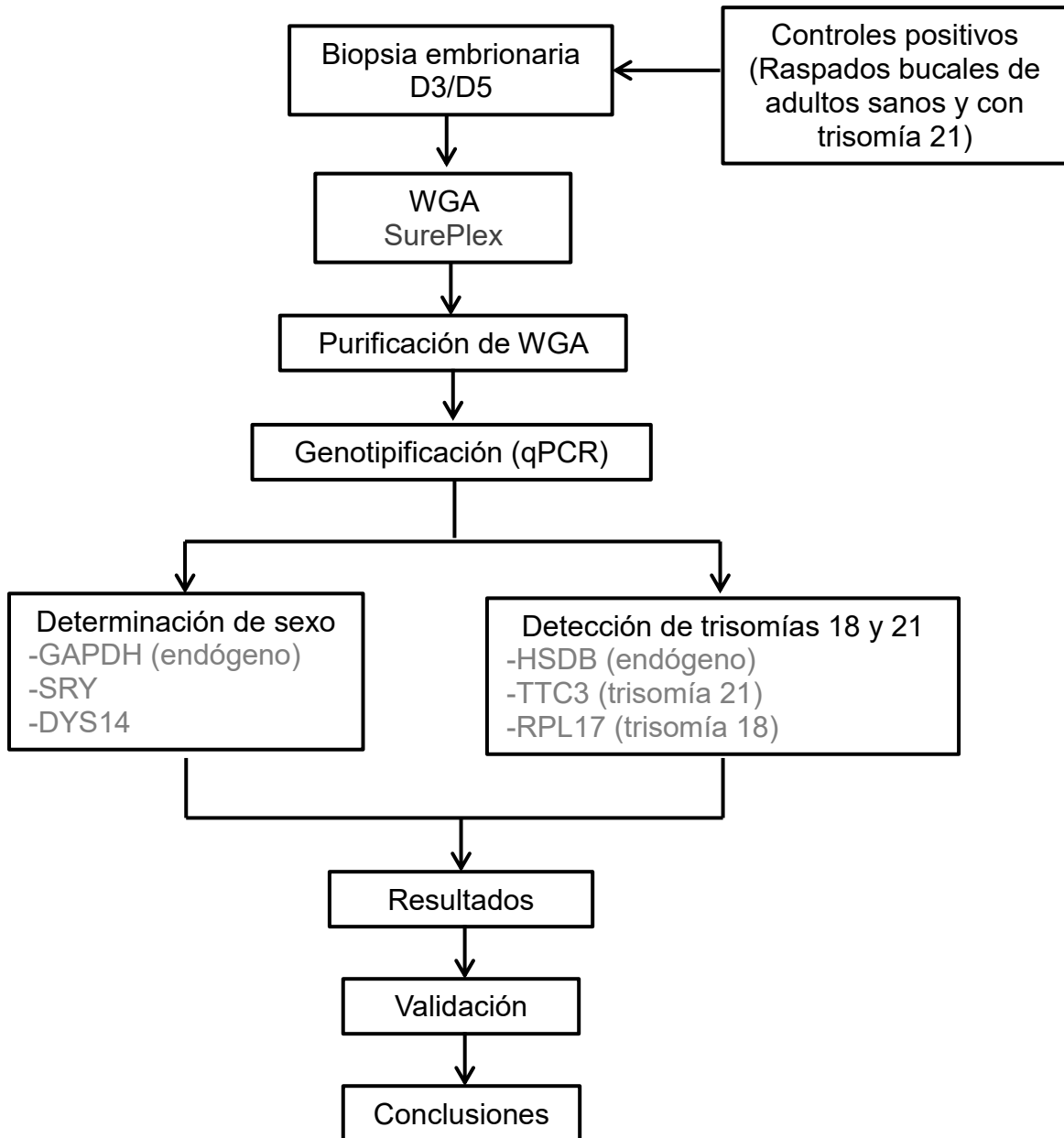
1. Examinar los resultados de todos los ciclos que han sido analizados por PGS mediante análisis genómico comparativo (HGC) en el Instituto Ingenes durante un periodo de 3 años para determinar las aneuploidías más frecuentes, su relación con edad materna y su asociación con el potencial de transferencia y potencial de implantación.
2. Determinar si la amplificación del genoma completo (WGA) de biopsias embrionarias provee material genético apto para la genotipificación basada en qPCR para diagnóstico genético preimplantacional.
 - 2.1 Determinar el sexo de los embriones por técnicas de qPCR utilizando WGA como molde.
 - 2.2 Determinar presencia de trisomía 18 y 21 en embriones mediante dosis génica con qPCR utilizando WGA como molde.
3. Determinar si el DNA fetal libre en plasma materno provee material genético apto para la genotipificación basada en qPCR para diagnóstico genético prenatal.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

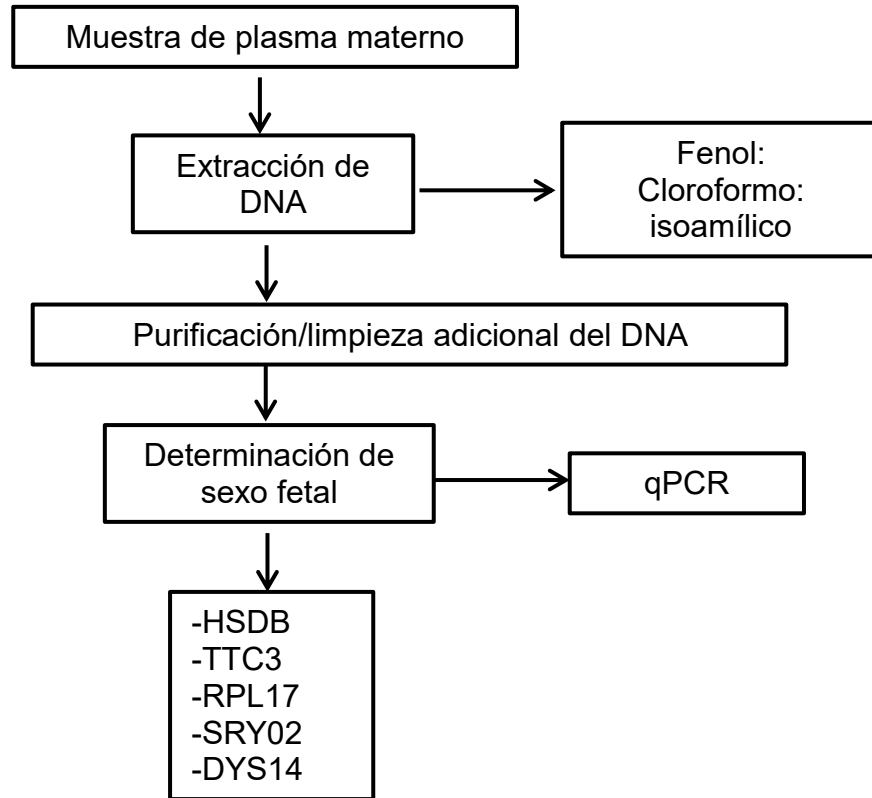
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA OBJETIVO PARTICULAR 1



ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA OBJETIVO PARTICULAR 2



ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA OBJETIVO PARTICULAR 3



MATERIALES Y MÉTODOS

PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO Y APROBACIÓN ÉTICA

Pacientes infértiles que se sometieron a un tratamiento de reproducción asistida en el Instituto Ingenes en la Ciudad de México fueron incluidas en este estudio. Las pacientes fueron evaluadas clínicamente de acuerdo a un protocolo estandarizado que incluye historial clínico familiar y personal. El protocolo fue aprobado por el comité de Ética del Instituto Ingenes. Se obtuvo un consentimiento informado firmado de todas las pacientes.

Para las muestras, se obtuvieron biopsias embrionarias en día 3, 5 o 6 de desarrollo para su análisis, todas las muestras fueron amplificadas por la técnica de WGA; para los controles se utilizaron muestras de raspado bucal de adultos, posteriormente las células fueron resuspendidas en PBS, de 5 a 10 células fueron aisladas (para simular una biopsia embrionaria) y amplificadas por la técnica de WGA. También se obtuvieron muestras de sangre para extracción de DNA genómico.

ESTIMULACIÓN, FERTILIZACIÓN *IN VITRO* Y BIOPSIA EMBRIONARIA

Todas las pacientes fueron sujetas a una estimulación ovárica controlada durante 10 días con agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina. La respuesta ovárica fue evaluada midiendo los niveles de estradiol en suero y el desarrollo folicular fue evaluado mediante examinación ultrasonográfica. La captura de ovocitos se realizó 20 horas después de la administración de la hormona gonadotrópica humana. El número de folículos aspirados variaron en un rango de 2 a 43 (promedio 12.7 ± 7.7) y se obtuvieron de 1 a 10 embriones por cohorte ovocitaria (promedio 3.7 ± 2.3). Para evitar la contaminación con DNA de otros espermatozoides derivados de una fertilización *in vitro* convencional, se utilizó la técnica de fertilización por ICSI en todos los casos analizados. La tasa de fertilización en promedio fue de $72.3\% \pm 20.4\%$. Un embriólogo especialista monitoreó el desarrollo embrionario hasta el día 3 o 5 para su biopsia.

BIOPSIA EMBRIONARIA

La biopsia de embriones requirió de un microscopio invertido y los micromanipuladores empleados habitualmente en un laboratorio de FIV para llevar a cabo la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

BIOPSIA DÍA 3 (BLASTÓMERA)

Los embriones a biopsiar fueron embriones con buen desarrollo embrionario (*“timing”* correcto y buena calidad embrionaria). En día +3 (> 66 horas post inseminación), se valoraron todos los embriones de la paciente en el microscopio invertido (400X) y se decidió cuáles eran los embriones susceptibles de ser biopsiados y analizados. No se biopsiaron aquellos embriones con menos de 6 células ni aquellos con un 20% de fragmentación ya que su viabilidad está comprometida. Los embriones con alguna blastómera multinucleada fueron biopsiados si el resto de parámetros morfológicos eran correctos. En estos embriones fue preferible biopsiar 2 células con la finalidad de detectar posibles mosaicismos.

PROCEDIMIENTO

Se valoraron y seleccionaron los embriones aptos para biopsia y se prepararon los medios, PBS y tubos de PCR en los que se depositaron las blastómeras (una blastómera por embrión por tubo), los tubos se rotularon con cuidado con el número del embrión biopsiado en donde se depositó la blastómera del embrión con el número correspondiente. Posteriormente se preparó el micro manipulador comprobando que la duración del disparo de láser estuviera en 300 microsegundos, se quitó el objetivo de óptica Nomarski y se pasó al objetivo laser, se ubicó al embrión a biopsiar en el microscopio con el objetivo láser y se posicionó el embrión colocando la región de la Zona Pelúcida (ZP) que se quiere diseccionar en el punto de impacto del láser o diana. La decisión del sitio de impacto se realizó tomando en cuenta la cercanía y mismo punto de enfoque de la ZP respecto a una blastómera de tamaño adecuado, nucleada y no compactada, que debe estar pegada a la ZP para su fácil extracción.

Se dieron de 3 a 4 impactos consecutivos desde el exterior al interior de la ZP hasta conseguir el orificio suficiente para poder realizar la biopsia, teniendo extremo cuidado en los últimos disparos ya que se debe perforar completamente la ZP en la zona más cercana a la blastómera a biopsiar sin dañarla. Con mucho cuidado de no dañar la blastómera a biopsiar, se realizaron uno o dos disparos más a los lados del último disparo para formar un “embudo” que facilitó la extrusión de la blastómera elegida. Se realizaron los mismos pasos para todos los embriones a biopsiar.

La placa con los embriones a biopsiar se colocó en la campana de flujo laminar con el resto de material listo para la recuperación de las blastómeras (Stripper con punta de 150µm, tubos de PCR y medio de cultivo especial para biopsia), las blastómeras se lavaron con PBS 1X aspirando y soltando con firmeza mediante un stripper con capilar de 150 µm hasta liberar una o dos blastómeras, la blastómera liberada fue recuperada con cuidado con el stripper y lavada en las gotas de PBS de las placas preparadas con anterioridad, teniendo cuidado de que la blastómera no llegara al fondo de la placa, una vez lavada la blastómera se trasladó al tubo de PCR con PBS. El mismo proceso se repitió para cada embrión.

BIOPSIA DÍA 5 (TROFOECTODERMO)

Los blastocistos se desarrollan a partir de una mórula compacta cuando el fluido comienza a colectarse en una cavidad central llamada blastocele. En esta fase el embrión se compone de 50-150 células, las cuales se organizan en la masa celular interna (MCI) y una línea externa de células del trofoectodermo (TE). La MCI formará el embrión y el trofoectodermo dará lugar a la placenta. Aquellos embriones que no alcanzaron su desarrollo a blastocisto en día 5, fueron llevados a día 6 para su biopsiado.

PROCEDIMIENTO

Con 200 pulsos del láser se realizó un pequeño orificio en la zona pelúcida, del lado opuesto a donde se encuentra la MCI extremando precauciones para evitar daño al

trofoectodermo que queda muy cerca de la zona, el blastocisto debió haber permanecido entre 2 y 3 horas hasta que las células del trofoectodermo se herniaron a través de la apertura artificial.

El blastocisto se posicionó hasta que la zona herniada quede a las 3 horarias, y se inmovilizó con la pipeta holding en esta posición, la pipeta de biopsia se colocó en enfoque y se aspiró un pequeño volumen de PVP, haciendo que su viscosidad ayude en el control del proceso de aspiración del trofoectodermo, se aspiró suavemente la sección herniada del trofoectodermo y se sacó suavemente la pipeta creando tensión en el trofoectodermo. Posteriormente se realizaron disparos continuos con el láser incidiendo directamente en la zona de tensión hasta que el trofoectodermo se desprendiera del embrión, se aspiró el conjunto de células biopsiadas y se dejaron libres en el medio de cultivo, posteriormente el embrión fue devuelto a su placa de cultivo. Se hicieron lavados de la biopsia con PBS 1x y se depositó en un tubo de PCR conteniendo 2.5 µl de tampón de extracción celular (para WGA). Este paso se realizó por cada embrión a biopsiar.

AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO POR LA TÉCNICA DE WGA (*WHOLE GENOME AMPLIFICATION*)

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE EXTRACCIÓN

Se preparó una mezcla con 4.8µl de buffer de dilución para extracción y 0.2 µl de enzima de extracción a cada biopsia embrionaria. Posteriormente se agregaron 5 µl de la mezcla de extracción a cada una de las muestras y se incubaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

| Número de Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------------------|-------------|--------|
| 1 | 75 °C | 10 min |
| 1 | 95 °C | 4 min |
| 1 | 4 °C | Reposo |

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE PRE-AMPLIFICACIÓN

Para la mezcla de amplificación se adicionó en un tubo 4.8 µl de buffer de pre-amplificación y 0.2 µl de enzima de pre-amplificación. Se agregaron 5 µl de la mezcla de Pre-Amplificación a cada una de las muestras, posteriormente se incubaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

| Número de Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------------------|-------------|--------|
| 1 | 95 °C | 2 min |
| | 95 °C | 15 seg |
| | 15 °C | 50 seg |
| 12 | 25 °C | 40 seg |
| | 35 °C | 30 seg |
| | 65 °C | 40 seg |
| | 75 °C | 40 seg |
| | 4°C | Reposo |

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE AMPLIFICACIÓN

En un tubo se mezclaron 25 µl de buffer de amplificación, 0.8 µl de enzima de amplificación y 34.2 µl de agua libre de nucleasas. Se agregaron 60µl de mezcla de Amplificación a cada tubo que contenía los 15µl del producto de Pre-Amplificación y se mezcló por pipeteo, la mezcla final fue incubada bajo las siguientes condiciones de termociclado:

| Número de Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|------------------|-------------|--------|
| 1 | 95 °C | 2 min |
| | 95 °C | 15 seg |
| 14 | 65 °C | 1 min |
| | 75 °C | 1 min |

Posteriormente se procedió a la verificación y purificación de la WGA.

VERIFICACIÓN DE WGA POR MEDIO DE ELECTROFORESIS

El producto de amplificación (WGA) de cada muestra fue visualizado en un gel de agarosa mediante electroforesis, para ello se preparó el gel de agarosa al 1%, pesando 1g de Agarosa en una balanza analítica y posteriormente se disolvió en 100ml de TBE 1x en un Matraz Erlenmeyer de 200ml, se calentó la mezcla para disolución de la agarosa en el horno de microondas durante 2 minutos con una potencia de 80%. La mezcla caliente se vertió en el molde de geles y se colocaron los peines adecuados. Se dejó en reposo para la gelificación durante 20 minutos a TA, una vez completamente formado el gel, se retiró cuidadosamente el peine y el gel se colocó en la cámara de electroforesis con TBE 1x hasta que el gel quedó completamente cubierto.

Se cargaron 10 µl de WGA en cada pozo mezclada con 3µl de Buffer de carga 1x + 1 µl de Bromuro de Etidio (este procedimiento se repitió para cada muestra) en un orden previamente definido. Se encendió la fuente de poder y la corrida se efectuó a 100 volts por 10 minutos, terminado el tiempo se retiró el gel de la cámara y se visualizó en el transiluminador UV para determinar la amplificación de la WGA

PURIFICACIÓN DE WGA

Se utilizaron 20 µl de WGA con 4 µl de isopropanol puro y se agregaron 400 µl de etanol absoluto y se mezcló con vórtex durante 5 segundos, la mezcla se incubó a -

72°C durante 15 min y posteriormente se centrifugó a 13000g durante 15 min a 4°. Se decantó el sobrenadante y al pellet que se formó se le agregó 200 µl de Etanol 70% y se mezcló por vórtex durante 5 seg, la mezcla se centrifugó a 13000g durante 15 min a 4°. Se decantó el sobrenadante y se repitió el lavado una vez más, posteriormente se decantó el sobrenadante y se dio un spin de 3 seg en la picofuga para bajar todo el etanol restante en el tubo y con ayuda de una micropipeta de 10 µl, se extrajo cuidadosamente los restos de sobrenadante hasta quedarse únicamente con el pellet blanco el cual se incubó a 54°C durante 2 min para evaporar los restos de etanol sobrantes.

La pastilla se rehidrató con 100 µl de Agua libre de nucleasas, se mezcló por vórtex durante 5 segundos para homogenizar la muestra y se cuantificó con el espectrofotómetro (NANODROP 2000c Thermo Scientific).

EXTRACCIÓN DE DNA DE PLASMA CON LA TÉCNICA DE FENO:CLOROFORMO: ISOAMÍLICO

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La sangre fue recolectada en 2 tubos Vacutainer con EDTA-K y los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min, posteriormente se recuperó el plasma (aproximadamente 4ml totales de los dos tubos) y se pasó a un tubo Eppendorf de 5ml, se volvió a centrifugar a 3500 rpm por 10 min para evitar residuos de otros componentes sanguíneos, se recuperó el plasma y se almacenó a -70° hasta su uso.

EXTRACCIÓN DE DNA DE PLASMA

Se preparó un buffer de extracción con Trisaminometano (Tris) a una concentración 10Mm pH 8.0, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 20Mm pH 8.0 y SDS 0.5%. En tubos nuevos de 5 mL, se agregaron 2 mL de plasma y 2 mL de buffer de extracción, se mezcló la solución por inmersión y los tubos se etiquetaron con el NCH de la paciente. En 8 tubos de 1.5 mL se repartieron 500 µL de la solución de buffer

de extracción más 500 μL de plasma y 400 μL de fenol, en seguida se mezcló por vórtex de 15 seg aproximadamente y se incubó a 65°C a baño maría durante 5 min, posteriormente los tubos se centrifugaron a 15 000g por 10 min (todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C), se recuperó la fase acuosa en 8 tubos nuevos etiquetados con el NHC. Posteriormente se adicionaron 300 μL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se mezcló por vórtex durante 15 seg, después se centrifugaron a 15 000g por 10 min. Se forman dos fases, una en donde se quedara las proteínas (fase color blanquecina) y la fase acuosa superior en donde se encuentra el DNA, se recuperó fase acuosa superior y se colocó en 8 tubos Eppendorf nuevos de 1.5ml etiquetados y se agregaron 500 μL de cloroformo:isoamílico (24:1) y mezcló por vórtex 15 seg. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se colocó en 8 tubos nuevos, se agregaron 50 μL de acetato de sodio 3M y 800 μL de isopropanol frío, y se mezclaron por inversión, posteriormente se dejaron incubando a -20°C toda la noche.

Al siguiente día, los tubos fueron retirados del congelador y centrifugados a 14,000g por 15 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de etanol frío al 70%, se mezcló por vórtex para que se desprendiera la pastilla, y se repitieron los lavados con etanol al 70% 2 veces más bajo las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y se eliminó el exceso de etanol con la pipeta (teniendo cuidado de no tocar con la pipeta el pellet formado en el fondo del tubo), se secó la pastilla a 55°C en el baño de calor seco durante 5 min aproximadamente y se agregaron 10 μL de H₂O inyectable a cada uno de los tubos con la pastilla, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min para que se hidrate. Finalmente se juntaron todas las muestras en un solo tubo (con 80 μL de DNA) y se cuantificó por absorbancia a 260/280 nm en el Nanodrop (Thermoscientific).

LIMPIEZA DEL DNA

Debido a que la extracción con fenol:cloroformo:isoamílico genera muchos residuos orgánicos, es necesario limpiar la muestra para deshacerse de esos residuos. Para ello, se utilizó el estuche *DNA clean and concentrator* (Zymo research). El Estuche cuenta con un tubo de recolecta, una columna de filtración, un buffer de unión, un

buffer de lavado y una solución de elución. Antes de empezar, se puso a calentar el buffer de elución a 60°C en el baño de calor seco. Al tubo que contiene el DNA, se le agregaron 400 µL de Buffer de unión, se mezcló con vórtex y la mezcla se pasó a la columna de filtración y ésta se colocó sobre el tubo de recolección, la mezcla se centrifugó a 14 000g por 30 seg, se eliminaron los residuos del tubo de recolección y se volvió a colocar la columna, en donde se añadieron 200 µL de buffer de lavado y se centrifugó (14 000g por 30 seg), se repitió el lavado y se volvió a centrifugar (14 000g por 30 seg). Se eliminaron los residuos del tubo de recolección y se volvió a centrifugar (14 000g por 30 seg) para eliminar los residuos de etanol. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se añadieron 43 µL de buffer de elución (previamente calentado) dentro de la columna, se dejó incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó (14 000g por 30 seg), la muestra fue re-eluída y por último cuantificada en Nanodrop.

DISEÑO DE INICIADORES

Todos los pares de iniciadores fueron diseñados siguiendo la metodología descrita a continuación:

En la página de Ensembl genome browser 83 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) se seleccionó el gen del cual se deseaba diseñar los iniciadores y la secuencia fue extraída en formato FASTA, posteriormente en la página de PUBMED se buscó la secuencia que genera el transcrito del mismo gen y se extrajo en formato FASTA. En el software Perlprimer en la parte de Real Time PCR, se pegaron ambas secuencias (la genómica y la que genera el transcrito) y se dejó que el programa busque los iniciadores más adecuados.

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios para seleccionar los mejores iniciadores: tamaño del iniciador, entre 20-24 nucleótidos, contenido de guaninas:citosinas 40-60%, ambos iniciadores deben tener temperaturas de alineamiento similares y que los iniciadores no formen estructuras secundarias ni dímeros. Por último, las

secuencias fueron revisadas con el software Primer Blast, el cual indicó la similitud con la secuencia del gen deseado.

SECUENCIAS DE INICIADORES UTILIZADOS

Todos los oligonucleótidos (Sentido FW y Antisentido RV) de los genes: GAPDH, SRY, DYS14, TTC3, RPL17, HSDB y SRY02 se ajustaron a una concentración de 20 pmol/μl. Las secuencias de los iniciadores seleccionados para la genotipificación utilizando WGA-DNA fueron las siguientes:

| Gen | Oligos secuencia 5'-3' | Tam año (pb) | Referencia |
|---------------|---|--------------------|---|
| GAPDH | FW- 5' TTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTG 3' RV- 5'CTGTTGTCATACTTCTCATGGTT 3' | 363 | Diseño propio (Schaeffer et al., 2017) |
| SRY | FW- 5' GCTGGGATACCACTGGAAAA 3' RV- 5' TCTTGAGTGTGTGGCTTTTCG 3' | 247 | (Chaturvedi et al., 2014) Fw (Zargari et al., 2011) Rv |
| DYS14 | FW- 5' CATCCAGAGCGTCCCTGG 3' RV- 5' TTCCCCTTTGTTCCCCAAA 3' | 147 | (Blagodatskikh et al., 2010) |
| HSD3B2 | FW- 5' CCCACTCCATACCCGTACAG 3' RV- 5' GTAGAGAACTTTCCAACACTTGAC 3' | 206 | Diseño propio (Schaeffer et al., 2017) |
| TTC3 | FW- 5' GAATACTTTGATGATTGCCAACAG 3' RV- 5' TCACTAGAATACTGCTTCGAGAC 3' | 141 | Diseño propio (Schaeffer et al., 2017) |
| RPL17 | FW- 5' CCCCACTTAGATGTACATAGCC 3' RV- 5' TGGAGGACTTCAGCTTATTCTG 3' | 236 | Diseño propio (Schaeffer et al., 2017) |
| SRY02 | SECUENCIA PROTEGIDA EN PROCESO DE PATENTE | 146 | Diseño propio |

QPCR CON KAPA SYBR® (UN SOLO PASO) PARA LA GENOTIPIFICACIÓN (DETERMINACIÓN DE SEXO Y DETECCIÓN DE TRISOMÍAS 18 Y 21)

El material genético (DNA / WGA) fue amplificado por la técnica de qPCR con el estuche KAPA SYBR® FAST qPCR para la detección de todos los genes con las siguientes concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado:

| Reactivos | Concentración |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| KAPA SYBR® FAST qRT-PCR Master Mix | 5X |
| Iniciador sentido | 4pM |
| Iniciador anti sentido | 4pM |
| ROX Dye (high) | 100nM |
| WGA/DNA templado | 150ng* |
| H ₂ O libre de nucleasas | Hasta completar 10 µl de reacción |

*Para la determinación de trisomía 18 y 21 las concentraciones de WGA fueron rangos de 15, 7.5 y 3.75ng

Condiciones de termociclado:

| Etapas | Ciclos | Condición |
|-------------------|--------|---|
| Inicio | 1 | 42°C - 5min 95°C – 5 min |
| Desnaturalización | 30 | 95°C - 15 seg |
| Alineamiento | | Depende del marcador °C – 30 seg* |
| Elongación | | 72°C - 1 min (lectura) |
| Melting (fusion) | 1 | 95° - 15 seg 60°C - 1min 95°C - 15seg |
| <i> Holding</i> | 1 | 4° C ∞ |

*GAPDH, SRY, TTC3 y RPL17 T° alineamiento fue de 58°C; para DYS14 y HSDB fue de 62°C.

IDENTIDAD DE LOS AMPLICONES

La identidad de los amplicones se confirmó visualizando los productos de PCR en el LabChip® GX (PerkinElmer) que determinó la longitud de los fragmentos.

La banda amplificada por PCR fue separada en un gel de agarosa al 1.5% y visualizada por tinción con bromuro de Etidio; la imagen del gel fue registrada con el programa Kodak Digital Science 1D v. 3.0.2. (Eastman Kodak Company, New Haven, CT, E.U.A.). Se purificaron los fragmentos correspondientes a cada amplicón utilizando el estuche GeneJet Gel Extraction (Fermentas).

CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Al fragmento purificado se le despuntaron los extremos con una reacción de blunting, posteriormente se ligó en el vector para clonación de fragmentos de PCR, pJET1.2/blunt (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se construyeron los vectores de clonación para cada uno de los amplicones insertados con ayuda del programa bioinformático SnapGene. El vector con el fragmento ligado fue introducido por transformación bacteriana en bacterias competentes TOP10 mediante un choque térmico (42°C por 2 min y después se colocaron en hielo 1 min), posteriormente se dejaron crecer en medio LB sin ampicilina durante 2 h a 37°C en agitación constante. Se les retiró el medio por centrifugación y se sembraron en una placa de LB con ampicilina durante 16 horas a 37°C. Se hizo una PCR de colonias para corroborar que el inserto estuviera presente y posteriormente se extrajo el DNA plasmídico mediante la técnica de mini preparaciones.

SECUENCIACIÓN

Los plásmidos correspondientes se secuenciaron empleando el reactivo Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.). Las muestras se analizaron en el secuenciador ABI PRISM® 3700 ADN analyzer (AppliedBiosystems, Foster City, CA, E.U.A) y las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia teórica en el software BLAST (NCBI) para confirmar su identidad. El oligonucleótido empleado para realizar la secuenciación fue: pJET1.2 Forward Sequencing Primer, 23-mer 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' que alinea con el vector.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA CON MICROARREGLOS

Ocho μl de WGA de cada muestra y referencias femenina y masculina se mezclaron con los fluorocromos Cy3 o Cy5 (marcaje de la muestra), posteriormente las muestras se hibridaron en el microarreglo 24 Sure V3 microarray (Illumina, San Diego, California, CA, USA) y se incubaron a 47 durante 16 h, posteriormente se realizaron 3 lavados de 20 min cada uno con $\text{SSV}/0.05\text{X}$, $\text{SSC}/1\text{X}$ y $\text{SSC}/0.1\text{X}$ respectivamente. Las lecturas se hicieron en el escáner de microarreglos InnoScan 710, (Innopsys, Carbone, France) y el análisis de datos se realizó con el software BlueFuse Multy-Analysis (BlueGnome) el cual determinó la composición cromosómica de cada embrión.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos utilizados en este trabajo se basaron en las siguientes pruebas estadísticas:

- Shapiro-Wilk, fue utilizado para determinar si los datos tenían una distribución normal.
- Mann-Witney U test, T test y ANOVA con un post hoc de Bonferroni, fueron utilizados para examinar diferencias entre grupos, los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.
- Curvas ROC, fueron realizadas para determinar especificidad y sensibilidad en las pruebas de determinación de sexo y determinación de trisomías 18 y 21, el área bajo la curva (AUC), se utilizó para determinar el grado de predictibilidad de la prueba.
- Regresión logística, se utilizó para determinar las asociaciones entre tasa de aneuploidía y resultado de implantación

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los softwares SigmaPlot, SPSS v. 22.0 y Microsoft Excel.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LAS ANEUPLOIDÍAS MÁS FRECUENTES Y SU RELACIÓN CON LA EDAD MATERNA PARA EMBRIONES DIAGNOSTICADOS POR PGS

Durante el periodo de Enero de 2014 a Abril de 2016 en el Instituto Ingenes se realizaron 474 ciclos con PGS (aCGH) comprendiendo un total de 1629 embriones, de los cuales solo 1575 pudieron ser analizados ya que el 3.3% de los embriones no contaron con una buena amplificación de WGA y fueron excluidos. Se analizaron muestras de día 3 y día 5 de desarrollo embrionario y los embriones provenían de ovocitos propios de las pacientes o de óvulos donados, los cuales fueron estudiados por separado. Las principales razones para que los pacientes solicitaran el PGS fueron: a) por edad materna avanzada (29.1%), b) selección de sexo embrionario (15.4%) y c) fallo recurrente de implantación (12.4%).

1.1 EL PORCENTAJE DE ANEUPLOIDÍA AUMENTA CONFORME AUMENTA LA EDAD MATERNA

Los embriones fueron agrupados por rangos de edad materna. Se observó que el porcentaje de aneuploidía es directamente proporcional a la edad materna (tabla 3); aquellas mujeres cuya edad supera los 43 años tienen una probabilidad menor de contar con un embrión sano para transferir (1 de cada 10). Estos resultados sugieren que la edad materna es frecuentemente el factor más importante que impide tener embriones cromosómicamente normales para ser transferidos. No se observó diferencia significativa en el índice de masa corporal ni en la tasa de fertilización entre los grupos de estudio, lo que indica que los grupos son comparables entre sí.

Tabla 3. Características de las pacientes de este estudio y porcentajes de aneuploidía por rango de edad materna

| Categoría | Todos | Pacientes | | | | | | Donantes |
|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | | ^a ≤29 | ^b 30-34 | ^c 35-37 | ^d 38-40 | ^e 41-43 | ^f ≥44 | ^g 18-25 |
| No. ciclos (n) | 474 | 27 | 66 | 72 | 105 | 90 | 31 | 83 |
| Edad (años) | 38.3 ± 5.1 | 27.0 ± 2.4 b,c,d,e,f,g | 32.5 ± 1.3 a,c,d,e,f,g | 36.1 ± 0.7 a,b,d,e,f,g | 39.0 ± 0.8 a,b,c,e,f,g | 41.8 ± 0.8 a,b,c,d,f,g | 45.0 ± 1.6 a,b,c,d,e,g | 22.8 ± 3.0 a,b,c,d,e,f |
| IMC | 24.5 ± 3.7 | 23.59 ± 3.78 g | 24.60 ± 3.79 g | 24.33 ± 3.87 g | 24.43 ± 3.66 g | 24.83 ± 3.81 g | 24.63 ± 2.77 g | 21.87 ± 2.5 a,b,c,d,e,f |
| Ovocitos recuperados (n) | 13.9 ± 8.1 | 16.8 ± 7.9 e,f | 17.3 ± 9.8 d,e,f | 16.1 ± 9.0 d,e,f | 12.0 ± 6.3 b,c,g | 11.0 ± 5.9 a,b,c,g | 8.9 ± 6.0 a,b,c,g | 15.7 ± 8.13 d,e,f |
| Ovocitos fertilizados (n) | 12.1 ± 6.8 | 14.3 ± 6.9 e,f | 15.2 ± 8.6 d,e,f | 13.6 ± 7.5 d,e,f | 10.3 ± 5.2 b,c,g | 9.8 ± 5.5 a,b,c,g | 7.6 ± 4.8 a,b,c,g | 13.9 ± 6.2 d,e,f |
| Embriones (n) | 9.3 ± 5.7 | 11.2 ± 6.3 e,f | 11.7 ± 7.9 d,e,f | 10.6 ± 6.0 d,e,f | 7.7 ± 4.2 b,c,g | 7.5 ± 4.6 a,b,c,g | 6.2 ± 3.9 a,b,c,g | 10.4 ± 4.6 d,e,f |
| Tasa de fertilización (%) | 77.5 ± 16.4 | 77.9 ± 17.0 | 76.3 ± 15.1 | 79.7 ± 14.2 | 76.6 ± 16.6 | 77.0 ± 18.9 | 83.6 ± 15.2 | 76.1 ± 16.0 |
| Tasa de aneuploidía (%) | 48.1 ± 36.5 | 27.4 ± 33.3 d,e,f | 36.5 ± 28.9 d,e,f | 36.6 ± 31.0 d,e,f | 58.0 ± 34.7 a,b,c,f,g | 68.3 ± 36.4 a,b,c,g | 88.2 ± 19.5 a,b,c,d,g | 24.7 ± 26.1 d,e,f |

1.2 ANEUPLOIDIAS MÁS FRECUENTES Y SU ASOCIACIÓN CON LA EDAD MATERNA

Se encontró que las trisomías fueron más frecuentes que las monosomías, esto fue independiente de la procedencia del embrión, ya sean propios u ovodón (51% y 63.4% respectivamente). La monosomía más frecuente fue la pérdida del cromosoma Y, seguida de los cromosomas 22 y 15; mientras que las trisomías más frecuentes fueron la del cromosoma 16 en primer lugar, seguida de las trisomías 19 y 21. Las frecuencias de las ganancias o pérdidas de cada cromosoma se encuentran en la tabla 5. Usando regresión logística se determinó la razón de momios para calcular el riesgo de aneuploidía asociado con la edad materna, mostrando un incremento significativo en las monosomías 9, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21 y 22, y también en las trisomías 1, 3, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 21 y 22 ($p < 0.05$) (tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia de aneuploidías y riesgo (OR) por rangos de edad materna

| Cromosoma | Tipo | Total | Donantes | <29 | 30-34 | 35-37 | 38-40 | 41-43 | >44 | OR ^a |
|--------------|----------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------------|
| | | 1575 | 317 | 110 | 275 | 272 | 307 | 265 | 66 | Incremento por año de edad materna |
| Chr_1 | Ganancia | 28 (1.7%) | 1 (0.3%) | 1 (0.9%) | 3 (1.1%) | 5 (1.8%) | 7 (2.3%) | 8 (3.0%) | 3 (4.5)% | 1.12 (1.02-1.23)* |
| | Pérdida | 32 (2.0%) | 9 (2.7%) | 2 (1.8%) | 4 (1.5%) | 5 (1.8%) | 7 (2.3%) | 5 (1.4%) | 1 (1.5%) | 1.00 (0.92-1.09) |
| Chr_2 | Ganancia | 29 (1.8%) | 2 (0.6%) | 1 (0.9%) | 7 (2.5%) | 4 (1.4%) | 6 (2.0%) | 4 (1.5%) | 5 (7.6%) | 1.08 (0.98-1.17) |
| | Pérdida | 22 (1.4%) | 3(0.9%) | 1 (1.8%) | 3 (1.1%) | 7 (2.6%) | 2 (0.7%) | 4 (1.5%) | 1 (1.5%) | 0.99 (0.90-1.08) |
| Chr_3 | Ganancia | 20 (1.2%) | 4 (1.2%) | 0 (0.0%) | 1 (0.4%) | 5 (1.8%) | 5 (1.6%) | 3 (1.1%) | 2 (3.0%) | 1.17 (1.03-1.32)* |
| | Pérdida | 10 (0.6%) | 3 (0.9%) | 0 (0.0%) | 1 (0.4%) | 3 (1.1%) | 0 (0.0%) | 1 (0.4%) | 2 (3.0%) | 1.12 (0.94-1.34) |
| Chr_4 | Ganancia | 26 (1.6%) | 2 (0.6%) | 1 (0.9%) | 3 (1.1%) | 8 (2.9%) | 6 (2.0%) | 4 (1.5%) | 2 (2.0%) | 1.03 (0.94-1.12) |
| | Pérdida | 18 (1.1%) | 4 (1.2%) | 2 (1.8%) | 3 (1.1%) | 1 (0.4%) | 2 (0.7%) | 3 (1.1%) | 3 (4.5%) | 1.05 (0.94-1.18) |
| Chr_5 | Ganancia | 23 (1.4%) | 3 (0.9%) | 2 (1.8%) | 2 (0.7%) | 3 (1.1%) | 5 (1.6%) | 7 (2.6%) | 1 (1.5%) | 1.07 (0.97-1.19) |
| | Pérdida | 17 (1.0%) | 1 (0.3%) | 1 (0.9%) | 5 (1.8%) | 4 (1.5%) | 1 (0.3%) | 2 (0.8%) | 3 (4.5%) | 1.01 (0.91-1.12) |
| Chr_6 | Ganancia | 38 (2.3%) | 3 (0.9%) | 2 (1.8%) | 7 (2.5%) | 13 (4.8%) | 6 (2.0%) | 6 (2.3%) | 1 (1.5%) | 0.99 (0.92-1.05) |
| | Pérdida | 13 (0.8%) | 2 (0.6%) | 0 (0.0%) | 2 (0.7%) | 4 (1.5%) | 4 (1.3%) | 0 (0.0%) | 1 (1.5%) | 1.04 (0.94-1.19) |
| Chr_7 | Ganancia | 31 (1.9%) | 0 (0.0%) | 4 (3.6%) | 5 (1.8%) | 5 (1.8%) | 9 (2.9%) | 6 (2.3%) | 2 (3.0%) | 1.02 (0.94-1.10) |
| | Pérdida | 11 (0.7%) | 4 (1.2%) | 0 (0.0%) | 1 (0.4%) | 2 (0.7%) | 1 (0.3%) | 1 (0.4%) | 2 (3.0%) | 1.15 (0.96-1.38) |
| Chr_8 | Ganancia | 22 (1.4%) | 2 (0.6%) | 0 (0.0%) | 1 (0.4%) | 8 (2.9%) | 6 (2.0%) | 4 (1.5%) | 1 (1.5%) | 1.08 (0.98-1.20) |

| | | | | | | | | | | |
|---------------|----------|--------------|---------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|
| | Pérdida | 17 (1.0%) | 1(0.3%) | 0 (0.0%) | 3 (1.1%) | 4 (1.5%) | 2 (0.7%) | 6 (2.3%) | 1 (1.5%) | 1.07 (0.95-1.19) |
| Chr_9 | Ganancia | 41 (2.5%) | 2(0.6%) | 0 (0.0%) | 9 (3.3%) | 6 (2.2%) | 7 (2.3%) | 10 (3.8%) | 7 (10.6%) | 1.15 (1.02-1.29)* |
| | Pérdida | 20 (1.2%) | 2(0.6%) | 0 (0.0%) | 2 (0.7%) | 2 (0.7%) | 8 (2.6%) | 4 (1.5%) | 2 (3.0%) | 1.11 (1.03-1.19)* |
| Chr_10 | Ganancia | 30 (1.8%) | 3(0.9%) | 1 (0.9%) | 7 (2.5%) | 4 (1.5%) | 3 (1.0%) | 7 (2.6%) | 5 (7.6%) | 1.07 (0.98-1.17) |
| | Pérdida | 19 (1.2%) | 3(0.9%) | 1 (0.9%) | 4 (1.5%) | 2 (0.7%) | 3 (1.0%) | 3 (1.1%) | 3 (4.5%) | 1.04 (0.94-1.16) |
| Chr_11 | Ganancia | 28 (1.7%) | 1(0.3%) | 0 (0.0%) | 4 (1.5%) | 7 (2.6%) | 5 (1.6%) | 8 (3.0%) | 3 (4.5%) | 1.13 (1.03-1.24)* |
| | Pérdida | 16 (1.0%) | 2(0.6%) | 0 (0.0%) | 1 (0.4%) | 1 (0.4%) | 3 (1.0%) | 5 (1.9%) | 4 (6.1%) | 1.27 (1.10-1.47)* |
| Chr_12 | Ganancia | 33 (2.0%) | 4(1.2%) | 1 (0.9%) | 3 (1.1%) | 5 (1.8%) | 9 (2.9%) | 9 (3.4%) | 2 (3.0%) | 1.12 (1.02-1.22)* |
| | Pérdida | 17 (1.0%) | 3(0.9%) | 0 (0.0%) | 1 (0.4%) | 2 (0.7%) | 5 (1.6%) | 4 (1.5%) | 2 (3.0%) | 1.18 (1.03-1.36)* |
| Chr_13 | Ganancia | 46 (2.8%) | 3(0.9%) | 3 (2.7%) | 10 (3.6%) | 9 (3.3%) | 8 (2.6%) | 11 (4.2%) | 2 (3.0%) | 1.01 (0.94-1.07) |
| | Pérdida | 20 (1.2%) | 3(0.9%) | 1 (0.9%) | 3 (1.1%) | 2 (0.7%) | 2 (0.7%) | 7 (2.6%) | 2 (3.0%) | 1.09 (0.97-1.21) |
| Chr_14 | Ganancia | 27 (1.7%) | 2(0.6%) | 1 (0.9%) | 3 (1.1%) | 7 (2.6%) | 8 (2.6%) | 3 (1.1%) | 3 (4.5%) | 1.07 (0.98-1.17) |
| | Pérdida | 27 (1.7%) | 5(1.5%) | 0 (0.0%) | 3 (1.1%) | 3 (1.1%) | 6 (2.0%) | 8 (3.0%) | 2 (3.0%) | 1.14 (1.02-1.26) * |
| Chr_15 | Ganancia | 53 (3.3%) | 5(1.5%) | 1 (0.9%) | 4 (1.5%) | 10 (3.7%) | 5 (1.6%) | 23 (8.7%) | 5 (7.6%) | 1.16 (1.08-1.25) * |
| | Pérdida | 46 (2.8%) | 1(0.3%) | 1 (0.9%) | 3 (1.1%) | 8 (2.9%) | 18 (5.9%) | 8 (3.0%) | 7 (10.6%) | 1.15 (1.06-1.24)* |
| Chr_16 | Ganancia | 98 (6.0%) | 7(2.1%) | 6 (5.5%) | 13 (4.7%) | 15 (5.5%) | 26 (8.5%) | 23 (8.7%) | 8 (12.1%) | 1.07 (1.02-1.12)* |
| | Pérdida | 41 (2.5%) | 4(1.2%) | 0(0.0%) | 10 (3.6%) | 6 (2.2%) | 8 (2.6%) | 11 (4.2%) | 2 (3.0%) | 1.06 (0.99-1.14) |
| Chr_17 | Ganancia | 31 (1.9%) | 5(1.5%) | 1 (0.9%) | 3 (1.1%) | 2 (0.7%) | 5 (1.6%) | 11 (4.2%) | 4 (6.1%) | 1.19 (1.07-1.31) * |

| | | | | | | | | | | |
|---------------|----------|--------------|----------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|
| | Pérdida | 15 (0.9%) | 2(0.6%) | 0 (0.0%) | 2 (0.7%) | 0 (0.0%) | 4 (1.3%) | 4 (1.5%) | 3 (4.5%) | 1.19 (1.04- 1.38)* |
| Chr_18 | Ganancia | 44 (2.7%) | 5(1.5%) | 2 (1.8%) | 5 (1.8%) | 11 (4.0%) | 9 (2.9%) | 11 (4.2%) | 1 (1.5%) | 1.05 (0.98- 1.19) |
| | Pérdida | 26 (1.6%) | 2(0.6%) | 2 (1.8%) | 4 (1.5%) | 1 (0.4%) | 7 (2.3%) | 7 (2.6%) | 3 (4.5%) | 1.08 (0.99- 1.13) |
| Chr_19 | Ganancia | 78 (4.8%) | 7(2.1%) | 3 (2.7%) | 19 (6.9%) | 10 (3.7%) | 21 (6.8%) | 16 (6.0%) | 2 (3.0%) | 1.01 (0.96- 1.07) |
| | Pérdida | 28 (1.7%) | 0(0.0%) | 0 (0.0%) | 4 (1.5%) | 3 (1.1%) | 5 (1.6%) | 12 (4.5%) | 4 (6.1%) | 1.18 (1.07- 1.30) * |
| Chr_20 | Ganancia | 54 (3.3%) | 7(2.1%) | 1 (0.9%) | 7 (2.5%) | 7 (2.6%) | 10 (3.0%) | 14 (5.3%) | 8 (12.1%) | 1.15 (1.07- 1.23)* |
| | Pérdida | 33 (2.0%) | 2(0.6%) | 0 (0.0%) | 8 (2.9%) | 2 (0.7%) | 7 (2.3%) | 9 (3.4%) | 5 (7.6%) | 1.12 (1.03- 1.22)* |
| Chr_21 | Ganancia | 73 (4.5%) | 2(0.6%) | 2 (1.8%) | 19 (6.9%) | 12 (4.4%) | 11 (3.6%) | 20 (7.5%) | 7 (10.6%) | 1.06 (1.00- 1.12)* |
| | Pérdida | 35 (2.1%) | 4(1.2%) | 1 (0.9%) | 2 (0.7%) | 3 (1.1%) | 10 (3.3%) | 12 (4.5%) | 4 (1.2%) | 1.15 (1.05- 1.25)* |
| Chr_22 | Ganancia | 64 (3.9%) | 2(0.6%) | 2 (1.8%) | 8 (2.9%) | 13 (4.8%) | 24 (7.8%) | 10 (3.8%) | 5 (7.6%) | 1.06 (1.00- 1.13)* |
| | Pérdida | 58 (3.6%) | 2(0.6%) | 3 (2.7%) | 2 (0.7%) | 11 (4.0%) | 13 (4.2%) | 21 (7.9%) | 6 (9.1%) | 1.16 (1.08- 1.24) * |
| Chr_X | Ganancia | 52 (3.2%) | 5(1.5%) | 2 (1.8%) | 8 (2.9%) | 9 (3.3%) | 13 (4.2%) | 12 (4.5%) | 3 (4.5%) | 1.06 (0.99- 1.13) |
| | Pérdida | 32 (2.0%) | 5(1.5%) | 2 (1.8%) | 5 (1.8%) | 9 (3.3%) | 7 (2.3%) | 2 (0.8%) | 2 (3.0%) | 1.00 (0.93- 1.09) |
| Chr_Y | Ganancia | 13 (0.8%) | 4(1.2%) | 3 (2.7%) | 0 (0.0%) | 3 (1.1%) | 2 (0.7%) | 1 (0.4%) | 0 (0.0%) | 0.90 (0.80- 1.01) |
| | Pérdida | 62 (3.8%) | 17(5.1%) | 2 (1.8%) | 9 (3.3%) | 13 (4.8%) | 9 (2.9%) | 6 (2.3%) | 6 (9.1%) | 1.04 (0.98- 1.11) |

Razón de momios (OR ^a) y los intervalos del 95% de confianza fueron calculados usando regresión logística multinomial. *Indica que es un resultado estadísticamente significativo (p<0.05).

Tabla 5. Frecuencia de aneuploidías

| | Totales | Pacientes | Donantes |
|-------------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------|
| Total aneuploidías | 734 | 641 | 93 |
| Monosomías | 191 (26.0%) | 155 (24.3%) | 36 (38.7%) |
| -Cromosoma 15 | 13 | 13 | 0 |
| -Cromosoma 16 | 21 | 18 | 3 |
| -Cromosoma 22 | 22 | 22 | 0 |
| -Cromosoma X | 10 | 8 | 2 |
| -Cromosoma Y | 40 | 26 | 14 |
| Trisomías | 194 (26.4%) | 171 (26.7%) | 23 (24.7%) |
| +Cromosoma 16 | 26 | 24 | 2 |
| +Cromosoma 18 | 9 | 7 | 2 |
| +Cromosoma 19 | 23 | 21 | 2 |
| +Cromosoma 20 | 17 | 13 | 4 |
| +Cromosoma 21 | 20 | 20 | 0 |
| +Cromosoma 22 | 19 | 19 | 0 |
| +Cromosoma X | 10 | 8 | 2 |
| +Cromosoma Y | 1 | 1 | 0 |
| Aneuploidía dobles | 165 (22.5%) | 150 (23.4%) | 15 (16.1%) |
| Aneuploidías múltiples | 184 (25.1%) | 165 (25.7%) ^a | 19 (20.4%) ^b |

1.3 LA EDAD MATERNA ESTA RELACIONADA CON LAS TASAS DE FIV

Se determinó el número de ovocitos recuperados, ovocitos fertilizados y porcentaje de fertilización en cada ciclo, y se observó que todos estos parámetros se ven afectados cuando aumenta la edad materna, excepto la tasa de fertilización en la cual no se observó diferencia en las tasas entre grupos de edad (tabla 3).

1.4 EL NIVEL DE ANEUPLOIDÍA ESTA INVERSAMENTE ASOCIADO A LAS TASAS DE IMPLANTACIÓN

Ya que las tasas de aneuploidía están asociadas con la edad y falla de implantación, y ya que las mujeres de edad avanzada tienen dificultades para embarazarse, se

investigó si el nivel de aneuploidía afectaba la tasa de implantación. Se desarrolló una fórmula de probabilidad a la que se le denominó “Potencial de Implantación”, para la cual se consideraron factores como la tasa de aneuploidía de la cohorte embrionaria y el número de embriones a transferir. Se encontró que la probabilidad de implantación fue inversamente relacionada con la edad materna, disminuyendo hasta un 35% en el grupo de mayor edad (>44 años). La probabilidad correlaciona significativamente con la edad ($p < 0.001$, tabla 6, último renglón).

Tabla 6. Resultados en los ciclos de FIV por edad materna y probabilidad de implantación

| Categoría | Pacientes | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | ≤29 ^a | 30-34 ^b | 35-37 ^c | 38-40 ^d | 41-43 ^e | ≥44 ^f |
| Tamaño de muestra (n) | 23 | 51 | 55 | 50 | 29 | 7 |
| Embriones por ciclo (n) | 11.7 ± 6.6 | 12.6 ± 8.4 | 11.4 ± 6.3 | 8.8 ± 4.3 | 9.0 ± 5.0 | 7.7 ± 4.4 |
| Tasa de fertilización (%) | 78.1 ± 16.7 | 77.7 ± 15.8 | 79.9 ± 13.9 | 77.6 ± 15.5 | 73.6 ± 19.3 | 79.2 ± 12.0 |
| Tasa de aneuploidia por ciclo (%) | 18.1 ± 22.3 ^{d,f} | 33.1 ± 25.9 ^f | 28.9 ± 25.7 ^f | 42.5 ± 26.7 ^a | 37.2 ± 29.9 | 63.1 ± 16.0 ^{a,b,c} |
| Probabilidad de implantación (%) | 0.89 ± 0.20 ^{d,e,f} | 0.77 ± 0.26 ^f | 0.83 ± 0.5 ^{d,f} | 0.67 ± 0.28 ^{a,c} | 0.68 ± 0.29 ^a | 0.40 ± 0.23 ^{a,b,c} |

$$\text{Probabilidad de implantación} = 1 - \left(\frac{\text{no. de embriones aneuploides}}{\text{no. total de embriones}} \right)^{\text{no. embriones transferidos}}$$

1.5 EL POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN COMO PREDICTOR DE EMBARAZO

Mediante un modelo de regresión logística se encontró que aquellas pacientes con un potencial de implantación alto tenían 8.9 veces mayor probabilidad de quedar embarazadas que aquellas con un potencial bajo ($p < 0.001$); ejemplos del uso de la fórmula de potencial de implantación con pacientes reales se encuentran en la tabla 7. A partir de estos resultados se definió el término **cohorte embrionaria aneuploide**.

Tabla 7. Uso de la fórmula de Potencial de Implantación y su comparación con los resultados finales de embarazo

| No. Caso | Edad de la paciente (años) | No. Embriones totales | Tasa de aneuploidía (%) | Embriones euploides disponibles | No. Embriones transferidos | Potencial de implantación | Resultado de embarazo |
|----------|----------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | 34 | 3 | 33.3 | 2 | 2 | 0.88 | POSITIVO |
| 2 | 33 | 6 | 33.3 | 4 | 3 | 0.96 | POSITIVO |
| 3 | 34 | 3 | 33.3 | 2 | 1 | 0.66 | NEGATIVO |
| 4 | 32 | 6 | 50 | 3 | 2 | 0.75 | POSITIVO |
| 5 | 34 | 4 | 50 | 2 | 1 | 0.50 | NEGATIVO |

Embarazo positivo = bhCG en plasma ≥ 10 U a partir del día 10 después de la transferencia

DEFINICIÓN DE COHORTE EMBRIONARIA ANEUPLOIDE

Cohorte proveniente de un ciclo de estimulación cuyos embriones son analizados por PGD y tiene una alta tasa de aneuploidía que indica una baja probabilidad de implantación y un resultado de embarazo negativo (aunque se cuente con embriones euploides disponibles).

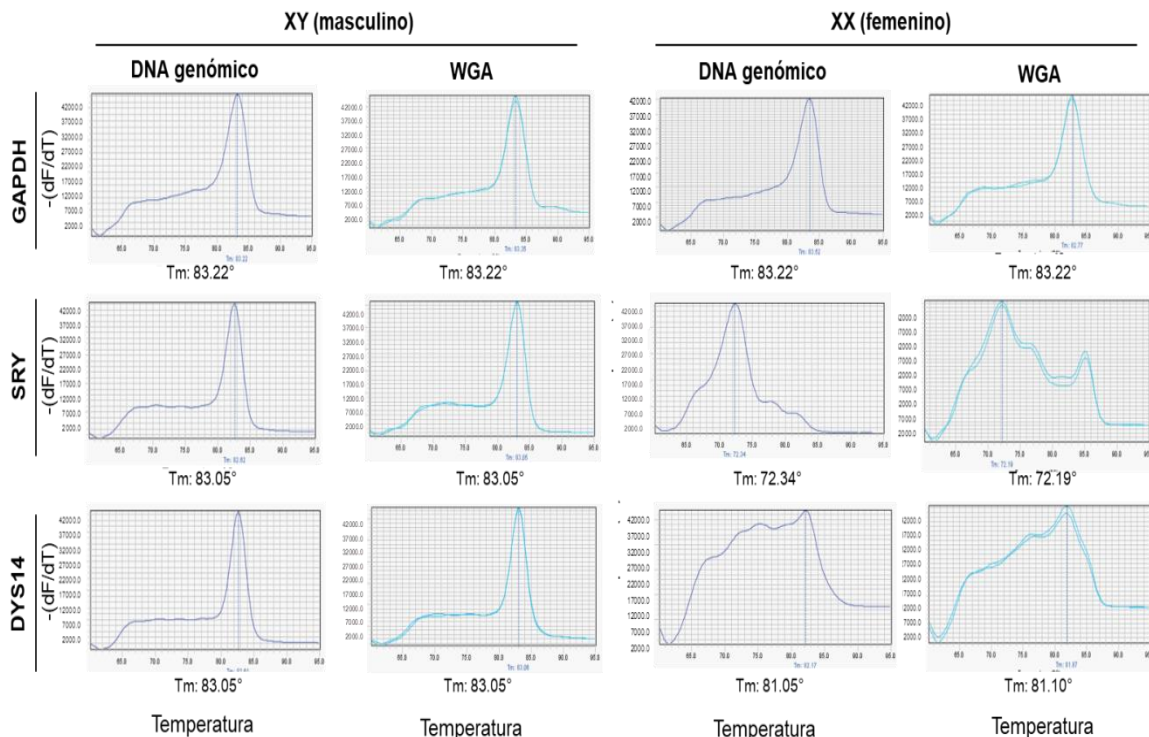
2. USO DE LA WGA COMO MOLDE PARA GENOTIPIFICACIÓN EMBRIONARIA EN DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRE-IMPLANTACIONAL

Después de la amplificación del genoma completo del DNA genómico proveniente de las biopsias embrionarias, la WGA pasó por un proceso de purificación para limpiar la muestra de residuos de oligonucleótidos no hibridados y fragmentos pequeños, posteriormente se hicieron diluciones para determinar la concentración a la cual la WGA era amplificable en un rango lineal.

2.1 ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE GENOTIPIFICACIÓN EMBRIONARIA PARA DETERMINACION DE SEXO

Se estandarizó la amplificación de los genes SRY, DYS14 y GAPDH para determinación de sexo embrionaria con el sistema KAPA SYBR® FAST qPCR utilizando WGA y DNA genómico como molde. Todos los genes fueron amplificables, y se detectó cada amplicón específico identificándolo gracias a su temperatura de fusión. Ya que se utilizó SYBR Green (intercalante inespecífico) para la amplificación, también se generó una curva de fusión la cual permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos, esto quiere decir que aunque la curva de amplificación muestre amplificación, no necesariamente se trata del amplicón deseado. Un amplicón específico se caracteriza por un solo pico de fusión (*melting*) (figura 7). bien definido y una temperatura de fusión equivalente a la $T^{\circ}m$ teórica calculada con el software OligoCalc (anexo 1).

Figura 7. Análisis de curvas de fusión de GAPDH, SRY y DYS14
DNA genómico de adultos y WGA de biopsias embrionarias fueron usados como templado para



amplificar por qPCR los tres genes. Solo en las muestras masculinas se observa amplificación de SRY y DYS14.

2.1.1 IDENTIDAD DE LOS AMPLICONES

En una PCR cuantitativa es muy importante que los amplicones sean identificados mediante sus características de pureza y tamaño, por ello los productos de PCR se analizaron en el sistema de electroforesis capilar LABCHIP GX®, que permite determinar que el amplicón generado (en caso de que exista) corresponde al tamaño de pares de bases deseado. En el caso del sexo femenino, los amplicones de SRY y DYS14 están ausentes (figura 8). Además cada uno de los amplicones fueron insertados en un plásmido, clonados en un vector de tránsito (pJet) y secuenciados; las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias teóricas en el software BLAST y de esa forma se confirmó la identidad de cada amplicón (anexo 2).

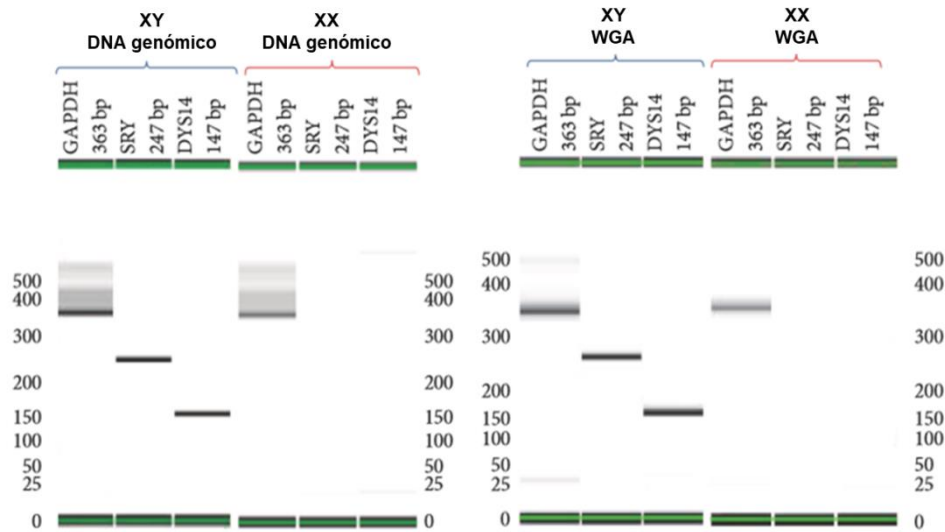


Figura 8. Productos de PCR observados mediante electroforesis capilar

Con DNA genómico (izquierda) y WGA (derecha). Las bandas de cada gen amplificado corresponden al tamaño esperado, se observa la ausencia de las bandas de SRY y DYS14 en las muestras de sexo femenino.

2.1.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE GENOTIPIFICACIÓN DE SEXO

Para validar el sistema de genotipificación de sexo se analizaron 204 embriones (en día 3 y 5 de desarrollo) pertenecientes a 48 pacientes y 33 muestras de células epiteliales procedentes de raspados bucales de personas adultas. La validación del sistema de genotipificación con marcadores de sexo se llevó a cabo en 4 etapas.

VALIDACIÓN CON SEXO FENOTÍPICO

La primera etapa consistió en el análisis de 33 muestras (20 mujeres y 13 hombres), de células epiteliales descamadas por un raspado bucal; se hicieron diluciones hasta alcanzar la cantidad total de 10-15 células (observadas al microscopio) para simular una biopsia embrionaria y fueron amplificadas por la técnica de WGA. El resultado obtenido con el sistema de genotipificación fue comparado con el sexo fenotípico de cada individuo y los resultados se muestran en la siguiente tabla (tabla que muestra el 100% de correlación con el sexo fenotípico). Las 33 muestras (100%) tuvieron una WGA de buena calidad para poder ser analizadas.

Tabla 8. Validación de la prueba con sexo fenotípico

| Muestra | WGA | GAPDH | SRY | DYS 14 | SEXO | Sexo Fenotípico |
|---------|-------|-------|-----|--------|------|-----------------|
| 1 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 2 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 3 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 4 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 5 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 6 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 7 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 8 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 9 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 10 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 11 | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 12 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 13 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 14 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 15 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 16 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 17 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 18 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 19 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 20 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 21 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 22 | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 1A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |

| | | | | | | |
|-----|-------|----|----|----|---|---|
| 2A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 3A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 4A | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 5A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 6A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 7A | BUENA | SI | SI | SI | M | M |
| 8A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 9A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 10A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |
| 11A | BUENA | SI | NO | NO | F | F |

VALIDACIÓN DEL SISTEMA AL COMPARAR CON LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS PGS/ACGH

Se analizaron comparativamente los resultados obtenidos de biopsias embrionarias de día 3 y 5 previamente diagnosticadas por PGS/aCGH. Para esta etapa se determinó el sexo embrionario por PCR para un total 138 embriones, pertenecientes a 27 pacientes, de los cuales 128 (92.75%) contaron con los criterios de buena calidad de WGA para poder ser incluidos en el estudio. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de correlación con una curva ROC comparando los resultados obtenidos con el sistema de genotipificación y los resultados obtenidos del análisis de PGS, encontrando un 95% de correlación con una sensibilidad y especificidad del 92 y 90% respectivamente (figura 9).

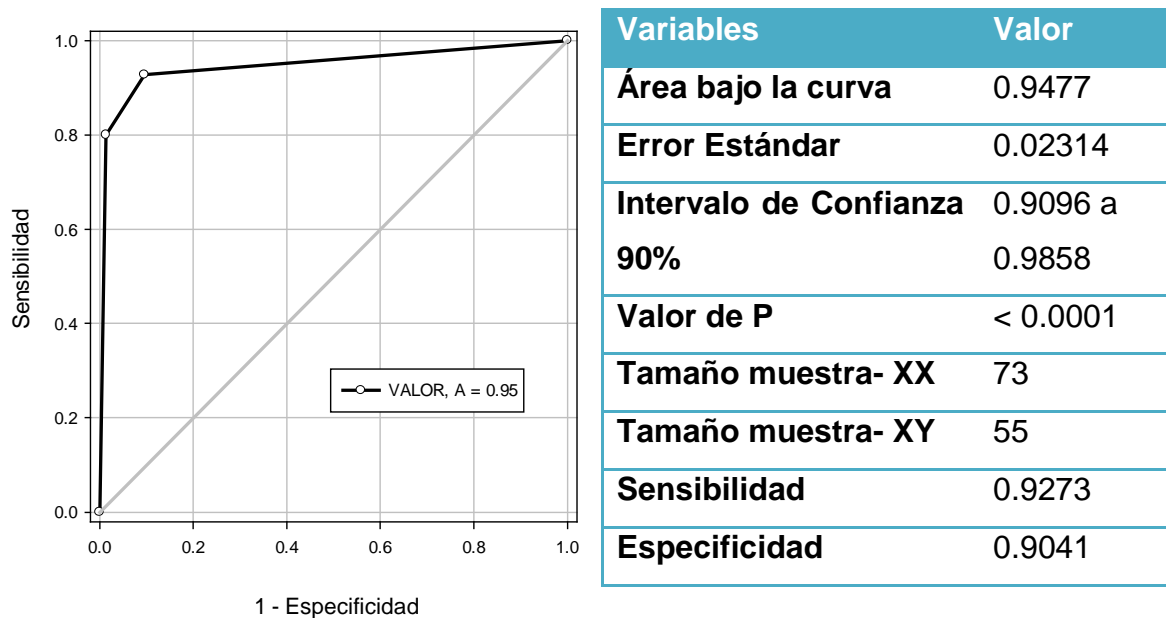


Figura 9. Análisis de correlación mediante Curva ROC

Se muestra la correlación entre los valores obtenidos con el sistema de genotipificación con los resultados de sexo analizados por PGS/aCGH (izquierda), y tabla con datos del análisis de correlación de la curva ROC (derecha).

VALIDACIÓN DE SEXO CUANDO LA SELECCIÓN EMPIEZA CON ESPERMATOZOIDES PRE-SORTEADOS (POST-SORTING)

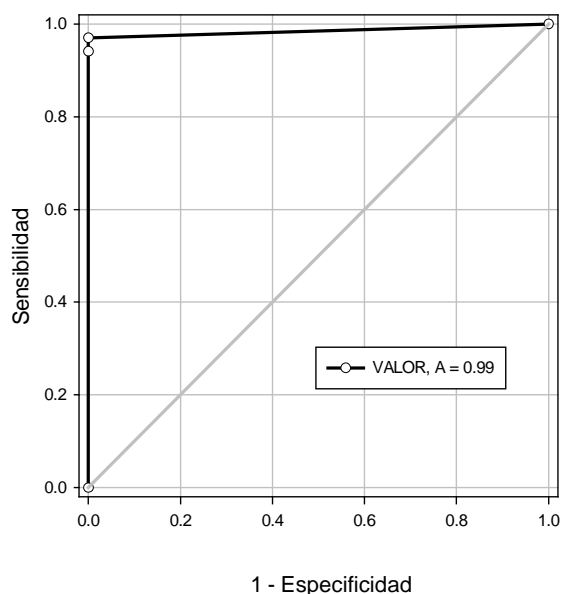
La tercera etapa consistió en el análisis de embriones biopsiados en día 3 y 5 que fueron fecundados con espermatozoides previamente seleccionados mediante “*sorting*” para separar aquellos que contienen dos cromosomas X o aquellos que son XY y luego fueron analizados por PGS/aCGH. Para esta etapa se analizaron en total 13 embriones, pertenecientes a 3 pacientes, de los cuales 13 (100%) contaron con los criterios de buena calidad de WGA para poder ser incluidos en el estudio. Se encontró una correlación del 100% entre los resultados obtenidos al comparar, PGS/aCGH y el sistema de genotipificación de sexo, el resumen de resultados se encuentra en la tabla 9.

Tabla 9. Validación con embriones procedentes de espermatozoides sorteados

| No. de Caso | No. de embriones analizados | Selección por <i>Sorting</i> | Resultado PGS/ACGH (no. embriones) | Resultado Sistema de genotipificación de sexo (no. embriones) |
|-------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|---|
| 1 | 4 | XY | 4 XY | 4 XY |
| 2 | 6 | XX | 6 XX | 6 XX |
| 3 | 3 | XY | 3 XY | 3 XY |

VALIDACIÓN CON MUESTRAS SIN ANÁLISIS PREVIO Y CONFIRMADAS CON PGS/ACGH

La última etapa consistió en el análisis de embriones biopsiados en día 3 y 5 con el sistema de genotipificación diseñado en este trabajo y la posterior validación con PGS/aCGH. Para esta etapa se analizaron en total 63 embriones, pertenecientes a 18 pacientes, de los cuales 63 (100%) contaron con una WGA con los criterios de buena calidad para poder ser incluidos en el estudio. Mediante un análisis de correlación, comparando los resultados obtenidos con nuestro sistema y los resultados obtenidos del análisis de PGS, se encontró una correlación del 98% con una sensibilidad y especificidad del 97% y 100% respectivamente (figura 10).



| Variables | Valor |
|----------------------|----------|
| Área bajo la curva | 0.9853 |
| Error Estándar | 0.01701 |
| Intervalo de | 0.9573 a |
| Confidencialidad 90% | 1.013 |
| Valor de P | <0.0001 |
| Tamaño muestra- XX | 29 |
| Tamaño muestra- XY | 34 |
| Sensibilidad | 0.9706 |
| Especificidad | 1.0000 |

Figura 10. Análisis de correlación mediante una Curva ROC

Se muestra la correlación entre los valores obtenidos con el sistema de genotipificación con los resultados de sexo analizados por PGS/aCGH (izquierda), y tabla de resumen de análisis de correlación (derecha).

2.1.3 VALOR PREDICTIVO DE LA PRUEBA

A partir de un modelo de regresión logística se determinó que la probabilidad para predecir acertadamente el sexo masculino cuando SRY y DYS14 están presentes (son amplificados) es del 98.8% ($P < 0.001$), mientras que la probabilidad para predecir acertadamente el sexo femenino cuando SRY y DYS14 están ausentes es de 95.6% ($P < 0.001$).

Para SRY no se observaron tasas de ADO ni de FA en las muestras que provenían de DNA genómico de adultos, sin embargo, en las muestras de WGA de embriones las tasas de ADO y FA fueron de 13.5% y 0.5% respectivamente. Para DYS14 tampoco se observaron tasas de ADO ni de FA en las muestras control pero sí en las en las muestras de WGA de embriones, las tasas de ADO y FA fueron de 5.2% y 3.4% respectivamente.

2.2 ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE GENOTIPIFICACIÓN CUANTITATIVA EMBRIONARIA PARA DETECCIÓN DE TRISOMÍA 18 Y 21

Se diseñaron en total 17 pares de oligonucleótidos de diferentes genes localizados en los cromosomas 18 y 21. Se hizo una estandarización cuidadosa de la amplificación de cada uno de ellos, con el sistema KAPA SYBR® FAST qPCR utilizando WGA purificada como molde, sin embargo sólo 3 pares generaron amplicones eficientes y cuantitativos al 100%: RPL17 para el cromosoma 18, TTC3 para el cromosoma 21 y HSD3B2 para el cromosoma 1 como control de amplificación endógena. Estos genes fueron amplificables y la temperatura de fusión correspondió con la $T^{\circ}m$ teórica calculada con el software OligoCalc (anexo 1). Las curvas de amplificación y de fusión se muestran en figura 11.

2.2.1 IDENTIDAD DE LOS AMPLICONES

Los productos de PCR se analizaron en el sistema de electroforesis capilar LABCHIP GX®, para determinar que el amplicón generado correspondiera al tamaño de pares de bases deseado (figura 12), además por cuestiones cuantitativas, era necesario que las bandas tuvieran una pureza mayor al 95% (de esta forma se puede inferir que no hay amplificaciones inespecíficas), la cual también se determinó con el sistema de electroforesis capilar. Posteriormente los amplicones fueron insertados en un plásmido, clonados y secuenciados, las secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias teóricas en el software BLAST y de esa forma se confirmó la identidad de cada amplicón.

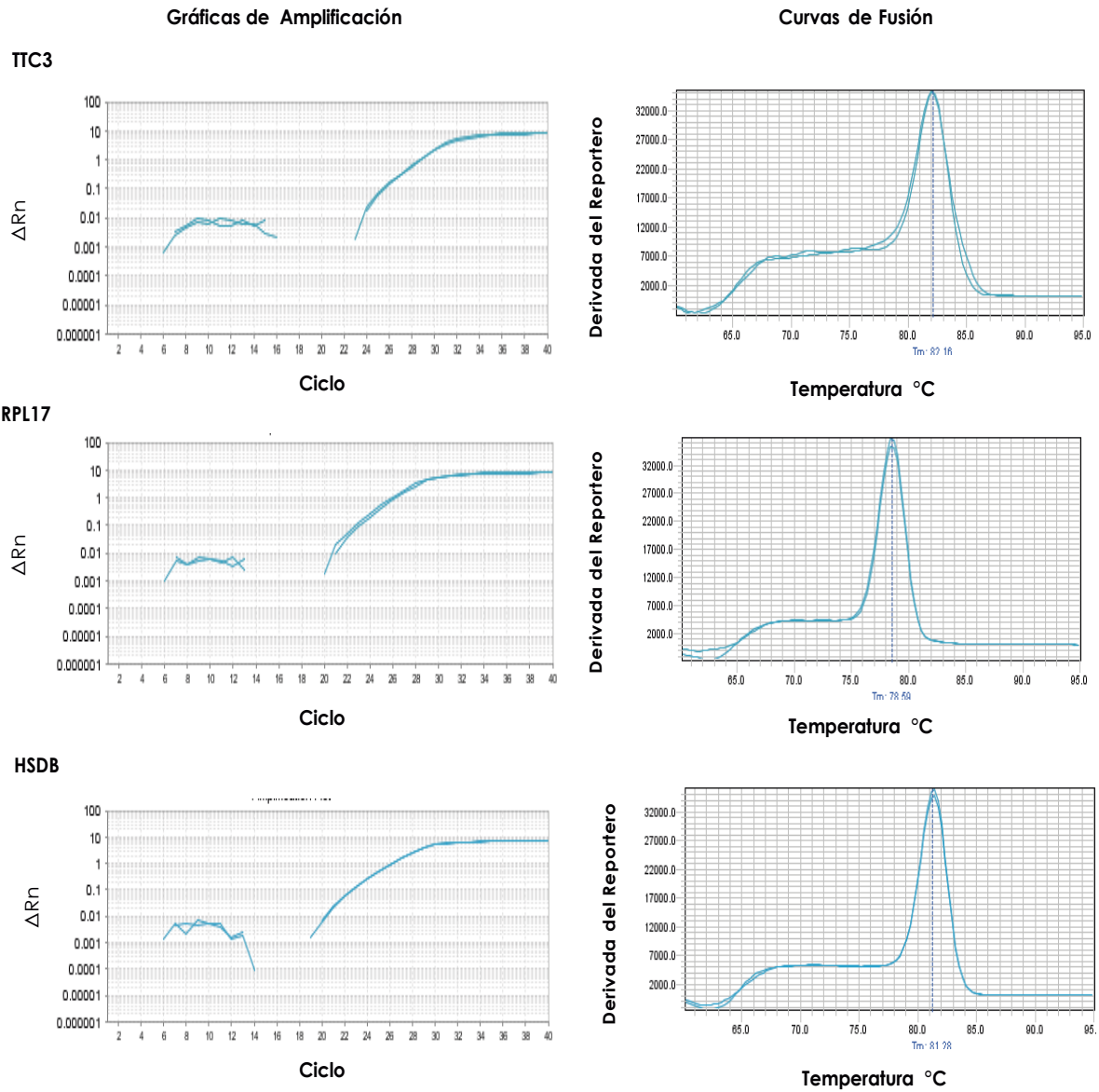
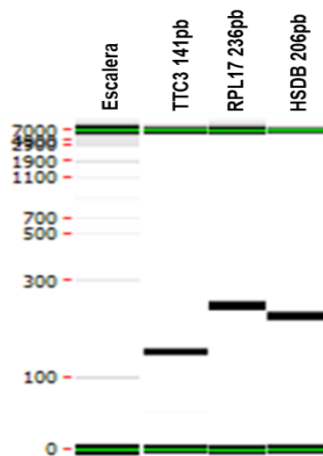


Figura 11. Amplificación de TTC3, RPL17 y HSD3B2 utilizando WGA como molde
 Curvas de amplificación (lado izquierdo) y curvas de fusión de cada amplicón en donde se observan las temperaturas de melting (lado derecho).



| Gen | Concentración (ng/μl) | Pureza (%) |
|---------------|-----------------------|------------|
| HSD3B2 | 17.90 | 98.96 |
| TTC3 | 5.86 | 97.97 |
| RPL17 | 5.86 | 95.72 |

Figura 12. Productos de PCR observados mediante electroforesis capilar
 Las bandas de cada amplicón corresponden al tamaño esperado. La tabla indica las características de cada amplicón.

2.2.2 EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN

Para determinar que los tres pares de oligonucleótidos seleccionados amplifican con una eficiencia cercana al 100% y para determinar las concentraciones óptimas para una amplificación cuantitativa, se hicieron rangos dinámicos de 5 puntos con diluciones seriadas 1:2 con 15, 7.5, 3.75, 1.87 y 0.937 ng de WGA (figura 13). Para determinar la eficiencia de amplificación se grafica el logaritmo base 10 de la concentración de WGA sobre el Ct, y se obtiene la pendiente. La eficiencia se obtiene con la fórmula $P=10^{(-1/pendiente)}-1$. Si la pendiente es igual o cercana a -3.32 entonces la eficiencia será del 100%. Finalmente se determinó que las concentraciones de 15, 7.5 y 3.75 ng eran las óptimas para trabajos con análisis cuantitativos.

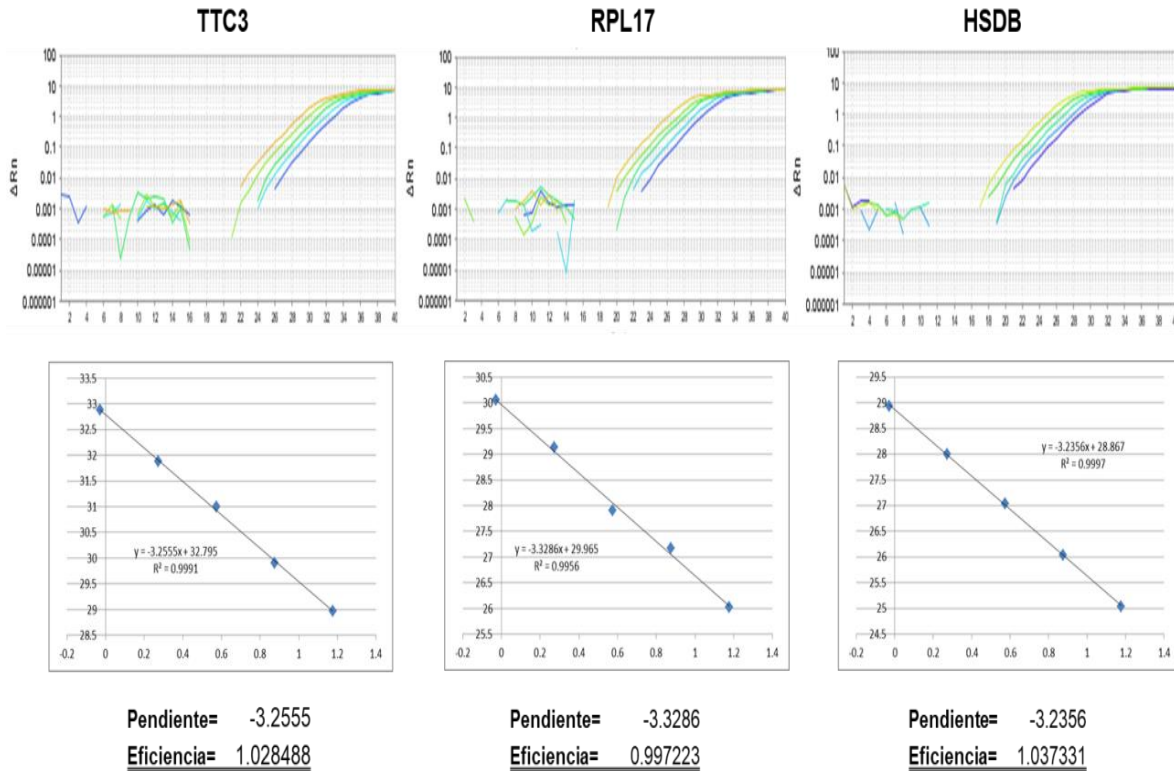


Figura 13. Eficiencias de amplificación

Cada marcador fue amplificado en un rango dinámico de 5 puntos con diluciones seriadas 1:2 (arriba), el logaritmo de la concentración fue graficado con el Ct de cada muestra (en medio). La eficiencia de amplificación se obtuvo con el valor de la pendiente (abajo).

2.2.3 DOSIS GÉNICA

Para la determinación de trisomías 18 y 21, se utilizó el método de dosis génica, el cual consiste en restar los Cts de dos genes (gen problema – gen de referencia) y la diferencia (ΔCt) genera un valor que permite discriminar entre las muestras con alteraciones y las muestras normales (figura 14). Para el cromosoma 21 se seleccionó al gen TTC3, para el cromosoma 18 el gen RPL17 y como control endógeno el gen HSDB. Se restaron los Cts de ambos genes problema menos el Ct del gen endógeno y se obtuvo un valor el cual posteriormente se analizó y comparó con muestras de referencia.

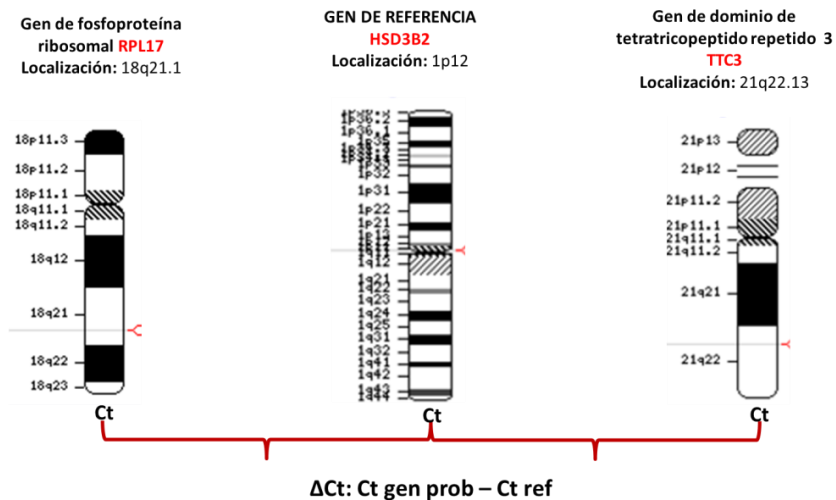


Figura 14. Método de dosis génica para detección de trisomía 21 y trisomía 18

2.2.4 DETECCIÓN DE TRISOMÍAS

Para la genotipificación cuantitativa, un total de 43 embriones biopsiados en día 5 de 31 pacientes fue analizado, Los embriones fueron separados en tres grupos basados en los resultados del PGS/aCGH previo (embrión normal, embrión con trisomía 21 y embrión con trisomía 18). Para control de calidad, cada muestra fue amplificada como una curva estándar con los marcadores RPL17, TTC3 y HSDB (control endógeno) con 3.75, 7.5 y 15ng de WGA purificada, la pendiente del log de la concentración de WGA contra el Ct fue de -3.33 ± 0.4 , es decir que los tres fragmentos amplificados tenían una eficiencia de amplificación comparable.

DETECCIÓN DE TRISOMÍA 21

Para el gen TTC3, el grupo de embriones normales y el grupo de embriones con trisomía 18 tuvieron un ΔCt similar, sin embargo, el grupo de embriones con trisomía 21 tuvo un ΔCt alrededor de 1.4 ciclos menos que los grupos control ($p < 0.001$), sugiriendo la presencia de una ganancia en el cromosoma 21. El ΔCt (diferencia entre el Ct de TTC3 y HSDB) específicamente determinó trisomía 21 (AUC=.089, 95% IC: 0.74-1.00 y $p < 0.001$). Se determinó un valor de corte de 3.85 para determinar trisomía 21, con este la prueba fue altamente precisa (95%, kappa=0.84 y $p < 0.001$, tabla 10).

DETECCIÓN DE TRISOMÍA 18

Para el gen RPL17, el grupo de embriones con trisomía 18 tuvo un ΔCt alrededor de 1.7 ciclos menos que los grupos normales ($p < 0.05$). Esta diferencia de Ct para RPL17 específicamente determinó trisomía 18 (AUC= 0.94, 95% CI: 0.86-1.00 y $p < 0.001$) y no trisomía 21 (AUC= 0.55, 95% CI: 0.35-0.74 y $p = 0.644$). El valor de corte para detectar trisomía 18 fue de 0.985 (sensibilidad= 88.9%, especificidad= 91.2%) sugiriendo de igual forma una alta precisión para esta prueba (precisión= 90.7%, kappa=0.74 y $p < 0.001$, tabla 10).

Tabla 10. Detección de trisomías 18 y 21 con WGA de muestras embrionarias

| | Valor de corte | AUC | Sensibilidad | Especificidad |
|--------------------|----------------|------|--------------|---------------|
| Trisomía 21 | 3.85 | 0.89 | 92.3 | 96.3 |
| Trisomía 18 | 0.98 | 0.94 | 88.9 | 91.2 |

| Gen | Grupo | N ^a | Ct ^b | P ^c | P ^d | AUC ^e |
|--------------|-------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| TTC3 | Normal | 21 | 4.77 ± 0.56 | - | - | - |
| | Trisomía 18 | 6 | 4.81 ± 1.49 | 0.536 | - | 0.66 (0.36-0.96) p=0.211 |
| | Trisomía 21 | 13 | 3.39 ± 0.99 | <0.001 | 0.008 | 0.89 (0.74-1.00) p<0.001 |
| RPL17 | Normal | 21 | 2.19 ± 0.80 | - | - | - |
| | Trisomía 18 | 9 | 0.53 ± 0.53 | <0.001 | - | 0.94 (0.86-1.00) p<0.001 |
| | Trisomía 21 | 13 | 1.77 ± 0.87 | 0.400 | 0.002 | 0.50 (0.32-0.69) p=0.968 |

*Valores de corte, especificidad y sensibilidad determinados por una curva ROC (arriba), y valoración de la prueba usando ANOVA con test de Bonferroni (abajo). ^aN se refiere al número de embriones por grupo. Para TTC3, 3 embriones con trisomía 18 tenían valores de Ct mayores a 30 y fueron excluidos del análisis. ^bValores de Ct ± desviación estándar. ^cValor de P de la comparación entre embriones con trisomía y embriones normales usando ANOVA con un post hoc de Bonferroni. ^dValor P de la comparación entre embriones con trisomía 18 y embriones con trisomía 18 usando ANOVA con un post hoc de Bonferroni. ^eEl área bajo la curva ROC entre los grupos con trisomía y el grupo normal. Intervalo de confianza 95%

3. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL UTILIZANDO DNA FETAL LIBRE EN PLASMA MATERNO PARA GENOTIPIFICACION POR PCR

Ya que el DNA fetal en plasma materno se encuentra libre en fragmentos de tamaños entre 100 a 300 pb aproximadamente, nos propusimos generar un sistema de genotipificación por PCR que pudiera detectar a las trisomías 21 y 18, a fin de proveer esta clase de diagnóstico a cualquier mujer embarazada, a una edad gestacional temprana. La mejor forma de estandarizar este sistema fue utilizar la determinación de sexo fetal.

3.1 ESTANDARIZACIÓN DE UN NUEVO PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE SRY PARA AMPLIFICAR DNA FETAL

El diseño de amplicones para SRY (que amplifica un fragmento de 247pb), no resultó apto para la amplificación de esta clase de DNA fetal por lo que se diseñó un nuevo juego que amplificara un fragmento más pequeño de 146pb al cual se le nombró SRY02 (la secuencia se encuentra en la sección de métodos). Se realizaron todas las pruebas de amplificación y estandarización y finalmente se obtuvo un SRY que amplificara en muestras de DNA fetal (figura 15).

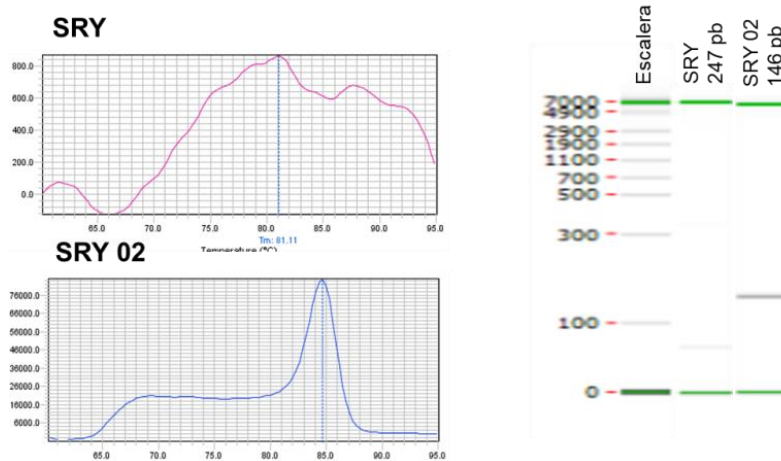


Figura 15. Amplificación de SRY y SRY02 en DNA fetal

Se hicieron ambas amplificaciones con la misma muestra de DNA fetal proveniente de una mujer embarazada de un niño. No se observó amplificación del fragmento de SRY de 247pb, pero sí del de 146pb.

3.2 OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA DE PLASMA MATERNO

Para poder hacer análisis de genotipificación con alta precisión se requiere de un DNA molde lo más limpio posible, el plasma posee muchas proteínas las cuales son difíciles de eliminar cuando se extrae DNA.

Para determinar cuál era el mejor método de extracción de DNA con el que se obtuviera mejor calidad y mejor cantidad de templado y los mejores Cts al amplificar, se probaron varios métodos de extracción y se amplificaron por qPCR los marcadores: SRY02, TTC3, RPL17, HSDB y DYS14 (tabla 11). Para obtener la muestra se puncionaron mujeres embarazadas (de edad gestacional mayor a 30 semanas) de bebés con sexo masculino (comprobado por ultrasonido).

Finalmente se decidió hacer la extracción de DNA con fenol:cloroformo:isoamílico y limpiarlo con el estuche *DNA clean and concentrator-5*.

Tabla 11. Comparación de métodos de extracción y purificación de DNA en plasma materno

| Estuche /Método de extracción | Conc. inicial plasma | Conc. DNA final (ng/μl) | Vol. (μl) | Relación 260/280 | Relación 260/230 | Amplificación (4ul templado) SRY | Amplificación (4ul templado) TTC3 | Amplificación (4ul templado) RPL17 | Amplificación (4ul templado) HSDB | Amplificación (4ul templado) DYS14 |
|--|----------------------|-------------------------|-----------|------------------|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| NORGEN (plasma/serum circulating DNA purification system) | 400ul | 37ng | 34μl | 0.81 | 0.09 | CT:29.48 TM:83° | CT:28.75 TM:80.61° | CT:29.61 TM:76.73° | CT:29.26 TM:80.02 | CT:29.34 TM:81.51° |
| ZYMO Quick-DNA Miniprep Plus | 400ul | 12.4ng | 50 μl | 0.72 | 0.25 | CT:25.89 TM:84.5° | CT:28.7 TM:81.95° | CT:29.46 TM:78.07° | CT:28.78 TM:81.06 | CT:26.78 TM:82.7° |
| GeneJET Whole Blood Genomic DNA purification Mini Estuche | 400ul | 5.4ng | 49 μl | 0.79 | 0.15 | CT:37.12 TM:88° | CT:28.7 TM:81.66° | CT:28.92 TM:77.78° | CT:28.83 TM:80.76° | CT:31.49 TM:82.4° |
| QIAmp DNA Blood Mini Estuche | 400ul | 3.17ng | 20 μl | 1.16 | 0.2 | NA | NA | NA | NA | NA |
| Fenol:cloroformo:isoamílico | 4000ul | 78.3ng | 85 μl | 0.61 | 0.13 | CT:29.95 TM:83.65° | CT:27.5 TM:81.12° | CT:25.5 TM:77.15° | CT:28.5 TM:80.08° | CT:32.89 TM:81.7° |
| DNA clean and concentrator-5 | 85ul DNA | 10.3ng | 20 μl | 0.93 | 0.25 | CT:25.97 TM:84.8° | CT:27.17 TM:82.25° | CT:29.61 TM:78.67° | CT:28.18 TM:81.51° | CT:26.72 TM:83° |
| Fenol: cloroformo: isoamílico | 4000ul | 109ng | 80 μl | 0.57 | 0.14 | CT:29.95 TM:83.65° | CT:27.5 TM:81.12° | CT:25.5 TM:77.15° | CT:28.5 TM:80.08° | CT:32.89 TM:81.7° |
| Genomic DNA clean and concentrator-5 | 80ul | 6.9ng | 20 μl | 1.1 | 0.18 | CT:26.56 TM:82.26° | CT:25.73 TM:79.86° | CT:27.4 TM:75.98 | CT:26.86 TM:78.97° | CT:27.08 TM:80.61° |
| DNA GENOMICO (control positivo) | 300ul (sangre total) | 199.6ng | 100μl | 1.89 | 1.76 | CT:21.78 TM:85.09° | CT:22.89 TM:82.55° | CT:23.88 TM:78.67° | CT:22.91 TM:81.81° | CT:20.89 TM:83.3° |

Amplificación por qPCR de SRY, DYS14, TTC3, RPL17 y HSDB en DNA de plasma extraído y purificado con diferentes estuches de purificación, la eficiencia se midió por el valor de Ct que se obtuvo con cada uno utilizando la misma concentración de muestra y comparándola con un control positivo de DNA extraído de leucocitos.

3.3 LA AMPLIFICACIÓN DE SRY Y DYS14 EN MUESTRAS DE PLASMA MATERNO INDICAN LA PRESENCIA DE DNA FETAL A PARTIR DE UNA EDAD GESTACIONAL TEMPRANA

Se amplificaron SRY02 y DYS14 en muestras de DNA materno, posteriormente se corroboraron los resultados obtenidos con los resultados del ultrasonido (a partir de las 30 semanas de gestación cuando el sexo del bebé se ve definido en la ultrasonografía). La presencia de SRY y DYS14 en muestras de sangre materna determinó que había DNA fetal en las muestras analizadas (tabla 12), incluso en muestras de embarazadas con más de un saco gestacional se pudo determinar la presencia del al menos de un bebé de sexo masculino. De 33 muestras, en el 91% (30) de los casos el sexo fue correctamente determinado. Las muestras fueron tomadas a pacientes embarazadas desde la semana 7 de gestación.

Tabla 12. Determinación de sexo en muestras de DNA de plasma materno a partir de la semana siete de gestación

| No DE CASO | EDAD | SDG | # DE SACOS | SEXO US | SEXO ELIGENDER |
|------------|---------|------|------------|------------|----------------|
| 1 | NO DATO | 35 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 2 | NO DATO | 35 | 1 | FEMENINO | FEMENINO |
| 3 | NO DATO | 21 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 4 | NO DATO | 19 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 5 | NO DATO | 21 | 1 | FEMENINO | FEMENINO |
| 6 | NO DATO | 22 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 7 | NO DATO | 35 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 8 | NO DATO | 10 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 9 | NO DATO | 14 | 1 | FEMENINO | FEMENINO |
| 10 | NO DATO | 7 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 11 | NO DATO | 15 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 12 | 34 | 12.2 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 13 | 29 | 10.6 | 2 | FEM Y MASC | MASCULINO |

| | | | | | |
|-----------|----|------|---|-----------------------------------|---------------------------|
| | | | | | (AL MENOS 1) |
| 14 | 35 | 10.5 | 2 | FEM Y MASC | MASCULINO (AL MENOS 1) |
| 15 | 46 | 13.1 | 1 | FEMENINO | FEMENINO |
| 16 | 39 | 10.2 | 1 | FEMENINO | FEMENINO |
| 17 | 39 | 10.2 | 1 | FEMENINO | MASCULINO |
| 18 | 30 | 28.3 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 19 | 30 | 28.3 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 20 | 36 | 9.6 | 1 | FEMENINO | MASCULINO |
| 21 | 30 | 13.5 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 22 | 38 | 7 | 1 | FEMENINO | MASCULINO |
| 23 | 39 | 13.3 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 24 | 38 | 9.4 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 25 | 33 | 12.4 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 26 | 46 | 12.6 | 1 | FEMENINO | FEMENINO |
| 27 | 36 | 13 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 28 | 36 | 13.5 | 2 | DOS MASCULINOS | MASCULINO (AL MENOS 1) |
| 29 | 32 | 10.6 | 2 | FEM Y MASC | MASCULINO (AL MENOS 1) |
| 30 | 34 | 13 | 2 | DOS MASCULINOS | MASCULINO (AL MENOS 1) |
| 31 | 35 | 13.5 | 3 | DOS MASCULINOS, UN FEMENINO | MASCULINO (AL MENOS 1) |
| 32 | 34 | 28 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |
| 33 | 42 | 10 | 1 | MASCULINO | MASCULINO |

3.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE TTC3, RPL17 Y HSD3B2 EN DNA LIBRE EN PLASMA MATERNO

Finalmente, se estandarizó la amplificación de los mismos amplicones utilizados para la detección de trisomías en el sistema pre-implantación, demostrando que el DNA fetal obtenido de sangre materna puede ser sujeto de análisis por dosage génico para su uso futuro en la detección temprana de las aneuploidías, específicamente más frecuentes en nuestra población.

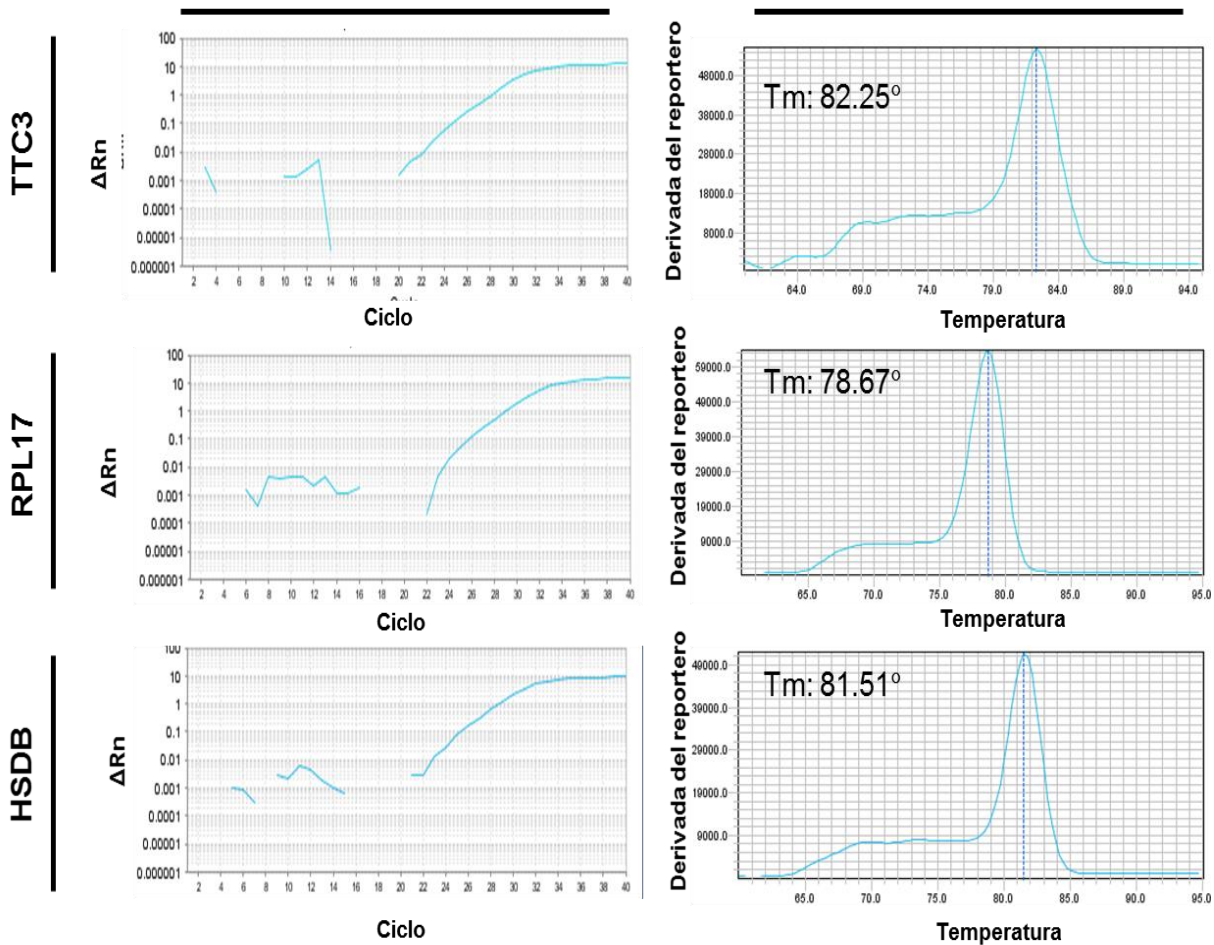


Figura 16. Amplificación de TTC3, RPL17 y HSD3B2 en DNA libre en plasma materno

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que el análisis genómico del embrión humano que se desarrolla en un laboratorio de fertilización asistida es necesario para tratar de garantizar la transferencia de embriones genómicamente sanos, favorecer la implantación embrionaria y el embarazo y abatir el aborto y la pérdida recurrente de la gestación. La tabla 13 muestra una comparación entre nuestros resultados y los resultados reportados por estudios similares en otros países.

Tabla 13. Aneuploidías más frecuentes en embriones de día 3 y día 5 reportadas en otros países: comparación con nuestro estudio

| N (País) | Día de biopsia | Tasa de aneuploidía (%) | Trisomías (%) | Monosomías (%) | Cromosomas más afectados | Cromosomas menos afectados | Referencias |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------|---------------|----------------|--------------------------|----------------------------|--|
| 87 (India) | 3 | 54 | 14.9 | 42.5 | 22 y 18 | No Data | Majumdar et al., 2016 |
| 150 (Japón) | 5 | 40.6 | 18 | 21.3 | 15, 22, 21, 16 y 18 | 4 y 12 | Chung Kyung 2013 |
| 52 (Inglaterra) | 5 | 40.4 | 51.3 | 48.7 | 22, 16, 15, 18, 21 y X | 1, 2, 5, 10, 17 y 19 | Fragouli et al., 2011 |
| 12 (Inglaterra) | 3 | 75 | 22 | 11 | 20, 21 y 22 | 6 | Wells and Delhanty, 2000 |
| 3412 (Estados Unidos) | 3 | 70.6 | Sin dato | Sin dato | 16 y 22 | Sin dato | Harton GL, et al., 2013 |
| 2467 (Estados Unidos) | 5 | 47.8 | Sin dato | Sin dato | 16 y 22 | Sin dato | Harton GL, et al., 2013 |
| 759 (UK) | 3 | 64.6 | 40 | 60 | 16, 22, 21, 4, 5 | 4, 6 | (Gutierrez-Mateo et al., 2011) |
| 274 (US) | 3 | 72.3 | 39.8 | 44.5 | 22, 16, 7 | 6, 9, 19 | (Rabinowitz et al., 2012) |
| 192 (Italy) | 5 | 55.2 | 37.9 | 42.7 | No Data | No Data | (Fiorentino et al., 2014) |
| 450 (México) | 5 | 46.6 | No Data | No Data | 16, 22, X | 3, 8, 10, 18, 20 | (Sánchez-Usabiaga et al., 2017) |
| 3154 (México) | 3 y 5 3 (294) 5 (2860) | 45.3 | 58.5 | 41.5 | 16, 21, 22, 19, 15, 20 | 3, 8, 6, 7, 17 | (Schaeffer E., et al., 2017, en preparación) |

Estudios similares realizados en otros países; se muestra número de muestras incluidas en cada estudio (N).

Los cromosomas mayormente afectados en todos estos estudios incluyendo el nuestro son el 16, 21, 22, 15 y 19. Entre las anomalías encontradas en nuestra población de estudio se descubrió que las trisomías fueron más frecuentes y se halló que las trisomías 16, 19 y 21 se presentaron con mayor frecuencia. Poco se sabe acerca de las consecuencias clínicas de las otras dos trisomías que resultaron ser muy frecuentes en este estudio, la trisomía 16 y la 19, ya que la mayoría de los embriones que se transfieren con estas anomalías resultan en abortos tempranos (Hassold and Hunt, 2001); sin embargo existen reportes de nacidos vivos con afectaciones en estos cromosomas, aunque su expectativa de vida es muy baja (Jung et al., 2008; Laus et al., 2012). Es importante notar que estos cromosomas deberían ser el blanco para pruebas futuras en las que se atiende al objetivo primario de transferir embriones sin aneuploidías a menores costos, habiendo determinado la ausencia de las trisomías más frecuentes en nuestra población. El total de aneuploidías que representa la suma de estas 4 trisomías es el 12%.

La tasa de aneuploidías en la cohorte es un concepto innovador que propone este trabajo, y que impacta directamente sobre el resultado de la implantación. Varios estudios demuestran que la transferencia de embriones euploides diagnosticados previamente por PGS, al ser comparada con la transferencia de embriones sin diagnóstico previo, genera una disminución considerable de las tasas de abortos espontáneos y aumenta la tasa de embarazos exitosos en pacientes con edad avanzada (Rubio et al., 2017; Yang et al., 2013). La transferencia de embriones aneuploides es una de las principales causas responsables del fracaso en los tratamientos FIV (Kane et al., 2016). A partir de este estudio, se propone que la tasa de aneuploidía de una corte embrionaria puede funcionar como un parámetro adicional que le brinde información al médico tratante sobre la calidad de los embriones disponibles para transferencia e información para poder tomar una decisión acerca de la transferencia de los mismos sabiendo sus posibilidades de implantación. Cabe mencionar que la tasa de aneuploidía es un factor importante más no determinante en el resultado de embarazo; es por ello que la predicción de implantación no es 100% exitosa. También es importante tomar en cuenta otros factores que están implicados en la implantación, como la receptividad del endometrio

y enfermedades maternas como diabetes, endometriosis, miomas, pólipos uterinos, enfermedades infecciosas, etc., que disminuyen la tasa de implantación (Valdes et al., 2017; Wenger et al., 2009). La implantación exitosa es un proceso complejo que requiere de un endometrio receptivo, un embrión sano y una comunicación sincronizada entre los tejidos maternos y embrionarios para que ésta se lleve a cabo (Teh et al., 2016). La estimación de la probabilidad de implantación propuesta en este trabajo, podría mejorarse en un futuro si se toman en cuenta los factores etiológicos de infertilidad de cada paciente en el rediseño de su formulación, calculando la influencia específica que pudieran tener cada uno de ellos en el resultado de la transferencia embrionaria.

En el análisis minucioso de todos los embriones diagnosticados por PGS se encontró que la edad materna juega un papel fundamental en el éxito de los tratamientos de FIV. En primer lugar se observó que la reserva ovárica disminuyó conforme aumentó la edad materna, se encontraron menos ovocitos disponibles para fertilizar, y aunque la tasa de fertilización fue comparable entre todos los grupos de edades, la tasa de embriones aneuploides no lo fue. Disminuyó también el número de ciclos en donde sí hubo embriones normales para transferir conforme avanzó la edad materna, en 90% de ciclos de pacientes ≤ 29 años sí hubo transferencia vs 19.23% de ciclos de pacientes ≥ 43 años donde sí hubo transferencia. Además se encontró que el riesgo de presentar ciertas aneuploidías aumenta con cada año de aumento de edad materna (1, 3, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 21 y 22), y que las pacientes jóvenes tienen una mayor probabilidad de implantación, tras la transferencia, que las pacientes de ≥ 38 años.

Asimismo, en este trabajo se observó que no solo hay embriones aneuploides en pacientes de edad avanzada, sino que hay un considerable porcentaje de aneuploidía en embriones provenientes de óvulos donados, procedentes de mujeres de menos de 29 años. Por esto es importante proponer el PGT en todos los tratamientos de reproducción asistida, de esta forma seleccionar al embrión cromosómicamente normal y para aumentar las posibilidades de implantación y de embarazo.

Además de la edad materna, varios factores pueden estar asociados a la infertilidad y al fracaso en los tratamientos de FIV. En estos últimos años, se ha mostrado interés en asociar el origen étnico y el grupo racial como probables factores de infertilidad. Un estudio del 2010 con 225,889 ciclos determinó que las mujeres negras, asiáticas e hispanas tuvieron una disminución significativa en la tasa de embarazo comparada con las mujeres blancas; además las mujeres hispanas y asiáticas tuvieron un riesgo significativamente mayor de pérdida de embarazo en el primer y segundo trimestre, mientras que las mujeres negras tuvieron un mayor riesgo de pérdida de embarazo en todos los trimestres; estos hallazgos fueron similares a los encontrados en otro estudio (Fujimoto et al., 2010), sugiriendo así que el grupo racial podría ser un factor implicado en la fertilidad, aunque es importante también considerar la falta de diagnóstico y tratamiento oportunos de enfermedades que pueden afectar la fertilidad como endometriosis, o síndrome de ovario poliquístico en estas mujeres y no necesariamente debido a su color de piel. (Baker et al., 2010).

Recientemente también se determinó la relación entre la ancestría genética y la tasa de aneuploidía embrionaria en pacientes que se sometieron a tratamientos de reproducción asistida. En este estudio se analizaron en total 2328 pacientes, clasificados por medio de marcadores informativos de ancestría (AIMs) en diferentes etnias (Europea, Africana, Asia oriental, y Asia del centro/sur). La tasa de aneuploidía fue determinada por cohorte embrionaria de cada paciente y se comparó entre las diferentes etnias, finalmente el análisis determinó la ausencia de diferencias en las tasas de aneuploidía entre los diferentes grupos étnicos (40.6%, 38.5%, 43.9% y 31.8% respectivamente), concluyendo que la ancestría genética no puede ser utilizada como un marcador para predecir la tasa de aneuploidía en una cohorte embrionaria (Franasiak et al., 2016). Desafortunadamente no existen estudios similares en donde se incluya la población americana.

La genotipificación es una herramienta molecular muy utilizada y validada para diagnóstico de características residentes en el genoma humano. La WGA actualmente es utilizada para estudios de análisis genómico con microarreglos, secuenciación masiva y PCR fluorescente para estudios de microsatélites (Emad et

al., 2015; Huang et al., 2015; Van der Aa et al., 2013). Sin embargo la genotipificación embrionaria para la detección de variaciones en el número de copias utilizando la técnica de PCR en tiempo real para embriones y utilizando como molde WGA no se había propuesto anteriormente.

Tras implementar un sistema que amplifica los genes SRY y DYS14, iniciamos nuestra validación del sistema para determinar la presencia del cromosoma Y. Para una determinación de sexo embrionario de máxima confiabilidad, fue necesaria la amplificación de ambos genes SRY y DYS14 y alcanzar una eficiencia del 98.8%. La razón por la cual se decidió incluir en el nuevo panel de diagnóstico preimplantacional la determinación de sexo obedece a que el 50% de los pacientes que solicitaron el análisis PGS en el Instituto Ingenes solicitaban el diagnóstico únicamente para seleccionar el sexo de su futuro bebé, o solicitaban *selección de espermatozoides XX* o *XY*, es decir una preselección de espermatozoides que puede hacerse debido a la diferencia en masa de los espermatozoides masculinos. Inicialmente la selección de sexo preimplantacional se indicaba únicamente a aquellas parejas con historial familiar de enfermedades genéticas ligadas a los cromosomas sexuales, posteriormente se ofreció como una opción para balanceo familiar. Actualmente en México no existe ninguna razón legal que impida la selección de sexo embrionaria por razones personales; de hecho en México hay vacíos legales importantes para regular las técnicas de reproducción asistida (Ley General de Salud, título III sobre la prestación de servicios de salud), por lo que muchas parejas, incluso de otros países en donde está prohibida la selección de sexo, optan por esta alternativa en México.

Actualmente se sabe que la trisomía 21 da origen a un fenotipo propenso a cardiopatías congénitas y retraso mental, mejor conocido como síndrome de Down. Esta cromosomopatía es la más frecuente y se presenta en nacidos vivos con una frecuencia 1 en 700 y hasta 1 en 40 en niños provenientes de mujeres con edad materna avanzada. Es muy importante su diagnóstico para evitar la transferencia de embriones con esta afectación ya que la trisomía 21 es compatible con la vida y aunque la esperanza de vida en los pacientes con esta enfermedad es alta, la calidad de vida no siempre es buena (Ramia et al., 2014). La trisomía 18 o síndrome de

Edwards incluye características como deficiencia de crecimiento prenatal, poli hidramnios, esternón corto y defectos cardíacos. La sobrevivencia media de los niños que nacen con esta afectación es de menos de 15 días, la muerte fetal espontánea es común en los individuos que portan esta trisomía (Rasmussen et al., 2003). El 5-10% de los niños que sobreviven el primer año poseen discapacidades serias y retraso mental severo, muchos de ellos mueren a causa de fallos cardíacos y respiratorios. Se estima que la prevalencia de trisomía 18 es de 1.6 casos por cada 10,000 nacimientos vivos; contando nacimientos vivos, muertes fetales y abortos selectivos, la prevalencia aumenta hasta 4 casos por cada 10,000 embarazos (Crider et al., 2008). Se decidió empezar por la detección de trisomía 21 ya que es una anomalía altamente frecuente tanto en embriones fertilizados *in vitro* como en bebés concebidos por medios naturales (Hassold and Hunt, 2001; Ramia et al., 2014; Wells and Delhanty, 2000). Aunque la trisomía 18 no resultó estar entre las aneuploidías más frecuentes encontradas en embriones, es la segunda trisomía más frecuente en recién nacidos vivos (Crider et al., 2008), y ya que este método está propuesto para hacerse en diagnóstico preimplantacional y prenatal, se decidió incluirla en el panel de estudio. Teniendo en mente generar un sistema de detección de trisomías que se aplique específicamente para embriones generados por FIV, empezamos utilizando a las T21 y T18 como modelo y mostramos que la WGA provee suficiente cantidad y calidad de DNA para detectar anomalías cromosómicas en un embrión por medio de técnicas de PCR en tiempo real determinando la cantidad de alelos mediante dosis génica. Esto puede proponerse como un método alternativo al análisis con CGH para reducir así tiempos y costos. Probamos a determinar específicamente la trisomía 21 usando TTC3, y la trisomía 18 con RPL17, examinando las diferencias cuantitativas utilizando los valores de Ct. Interesantemente en ninguno de los dos genes se observó una diferencia de Ct de 0.5 como era de esperarse. Para TTC3, la diferencia fue de 1.4 ciclos mientras que para RPL17 la diferencia fue de 1.7. Esto sugiere que la WGA amplifica el genoma de manera desigual o no uniforme y algunas regiones puedan estar sub o sobre representadas. Aun así, los análisis estadísticos muestran claramente que se puede distinguir entre embriones sanos y embriones con cualquiera de estas dos afectaciones.

Una de las perspectivas importantes de este trabajo es ampliar el panel de diagnóstico para trisomías 16 y 19 que resultaron ser muy frecuentes en este estudio. Poco se sabe acerca de éstas pero la mayoría de los embriones que se transfieren con estas anomalías resultan en abortos tempranos (Hassold and Hunt, 2001); la trisomía 16 está asociada a malformaciones cardíacas mientras que la 19 está relacionada con desórdenes mieloides y existen algunos reportes de casos de niños nacidos con estas afectaciones, aunque su expectativa de vida es muy baja (Jung et al., 2008; Laus et al., 2012). Se requerirá de un cuidadoso análisis *in silico* y de la literatura para localizar las regiones que se requieren amplificar en esos cromosomas con características diagnósticas confiables para su detección por dosage génico.

Una vez logrado el embarazo, natural o con la ayuda de la Medicina Reproductiva, un método de detección temprana de anomalías cromosómicas no invasivo sigue siendo una necesidad. Los métodos disponibles en el mercado siguen siendo de costo excesivo, no hacen un análisis genómico completo y no se procesan en México. En este trabajo, se logró estandarizar una metodología confiable para la extracción de DNA fetal de suero como molde para genotipificación. Se inició la detección de sexo fetal con buen éxito y se abrió la opción de continuar este estudio para la determinación de marcadores cromosómicos en trisomías, 21, 18 y la expectativa de poder diagnosticar la 19 y la 16. Este sistema a diferencia de la amniocentesis no es invasivo y presenta cualidades en costo y tiempo que lo hacen ideal para un primer análisis temprano al hacer el seguimiento de marcadores sanguíneos que se hace durante el primer trimestre del embarazo.

Las principales limitantes de este estudio son: 1) no se realizó un perfil cromosómico completo solamente se descartan embriones portadores de trisomías 18 y 21, por lo que no está indicado para pacientes con historial de presencia de otras aneuploidías, para estas pacientes se sigue indicando un PGS convencional, 2) detectar estas aneuploidía no puede garantizar la implantación ya que para tener certeza de sí un embrión va a implantar o no se deben considerar muchos otros factores referentes al estado receptivo del endometrio y a la calidad del embrión los cuales no pueden ser medidos únicamente con un análisis de detección de sexo y trisomías 18 y 21.

Finalmente la mayor fortaleza de este estudio es la propuesta factible de nuevas alternativas de diagnóstico preimplantacional, tanto para los embriones analizados por PGS, en cuyo caso la tasa de aneuploidía de la cohorte nos brinda un panorama más amplio sobre el posible resultado de implantación, como para aquellos embriones que no pueden ser analizados con esta herramienta debido a su alto costo, por ello la opción de la detección de dos de las anormalidades más frecuentes presentes en recién nacidos que pueden ser evitadas al momento de la transferencia a un precio mucho más accesible es un avance significativo. Poder ampliar el panel de detección a otras trisomías particularmente más frecuentes en nuestra población, sin aumentar mucho el costo de operación, abre las puertas para su utilización en diagnóstico preimplantacional no invasivo y en diagnóstico prenatal.

CONCLUSIONES

- La edad materna afecta de manera negativa el éxito de los tratamientos de FIV, y el incremento en la tasa de aneuploidías está directamente asociado con la edad materna e inversamente con el resultado de implantación. Nuestros cálculos indican que para las trisomías 1, 3, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 21 y 22 la probabilidad de aneuploidía aumentó hasta 1.15 veces por cada año de edad materna.
- Las aneuploidías más frecuentes que se presentan en la muestra de población mexicana que es atendida mediante FIV y que se analizó en este trabajo son las trisomías 16, 19 y 21 y las monosomías 22, 15 y pérdida del cromosoma Y; éstas son las que deberán considerarse para pacientes que no pueden costear un análisis cromosómico completo.
- La probabilidad de implantación de la cohorte embrionaria propuesta en este trabajo puede ser utilizada como una herramienta tanto para predecir el posible resultado de la transferencia (embarazo) como para saber el número ideal de embriones a transferir y aumentar así la posibilidad de embarazo.
- La WGA provee suficiente cantidad de DNA para medir características y anomalías genéticas en un embrión por medio de técnicas de PCR antes de transferir el embrión al útero materno durante un procedimiento FIV. Este método es una alternativa para el análisis de PGS/aCGH reduciendo costos y tiempos.
- Esta prueba marca una posibilidad de hacer diagnóstico genético prenatal en DNA fetal libre en plasma materno mediante técnicas de PCR. Se logró establecer un sistema de detección del sexo fetal al extraer DNA de buena calidad y cantidad a partir de plasma materno, con el que se pueden amplificar dos marcadores del cromosoma Y, lo que permitió comprobar la presencia de DNA fetal en la muestra materna, estos genes fueron detectables a partir de la semana 7 de gestación.

PERSPECTIVAS

1. Realizar un estudio prospectivo de todos los ciclos en los que se realice PGS utilizando la probabilidad de implantación propuesta en este trabajo para determinar el número ideal de embriones a transferir con respecto a la tasa de aneuploidía de la cohorte embrionaria.
2. Ampliar el panel de diagnóstico preimplantacional por dosis génica para la detección de trisomías 16 y 19 para pacientes que no pueden costear un análisis de perfil cromosómico completo y tratar de establecer una política de “100% de transferencias con embriones euploides”.
3. Continuar con la generación de un sistema de detección de trisomías a partir de DNA fetal libre, el cual puede servir para diagnóstico genético prenatal a partir de DNA fetal libre en plasma materno, o para diagnóstico genético preimplantacional a partir de DNA libre en blastocelo o en medio de cultivo embrionario generando así un método de diagnóstico genómico no invasivo en el cual no se tenga que recurrir a una biopsia embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Angell, R.R., Templeton, A.A., and Aitken, R.J. (1986). Chromosome studies in human in vitro fertilization. *Human genetics* 72, 333-339.
- Araki, T., Yamamoto, A., and Yamada, M. (1987). Accurate determination of DNA content in single cell nuclei stained with Hoechst 33258 fluorochrome at high salt concentration. *Histochemistry* 87, 331-338.
- Baird, D.T., Collins, J., Egozcue, J., Evers, L.H., Gianaroli, L., Leridon, H., Sunde, A., Templeton, A., Van Steirteghem, A., Cohen, J., *et al.* (2005). Fertility and ageing. *Human reproduction update* 11, 261-276.
- Baker, V.L., Luke, B., Brown, M.B., Alvero, R., Frattarelli, J.L., Usadi, R., Grainger, D.A., and Armstrong, A.Y. (2010). Multivariate analysis of factors affecting probability of pregnancy and live birth with in vitro fertilization: an analysis of the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System. *Fertility and sterility* 94, 1410-1416.
- Balaban, B., Sakkas, D., and Gardner, D.K. (2014). Laboratory procedures for human in vitro fertilization. *Seminars in reproductive medicine* 32, 272-282.
- Battaglia, D.E., Goodwin, P., Klein, N.A., and Soules, M.R. (1996). Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Human reproduction* 11, 2217-2222.
- Blagodatskikh, E.G., Nikitin, A.G., Seregin Iu, A., Blagodatskikh, K.A., and Nosikov, V.V. (2010). [The use of DYS14 marker for sex determination]. *Molekuliarnaia biologii* 44, 646-649.
- Boulay, J.L., Reuter, J., Ritschard, R., Terracciano, L., Herrmann, R., and Rochlitz, C. (1999). Gene dosage by quantitative real-time PCR. *BioTechniques* 27, 228-230, 232.
- Bozzette, M. (2002). Recent advances in prenatal screening and diagnosis of genetic disorders. *AACN clinical issues* 13, 501-510.
- Breman, A., Pursley, A.N., Hixson, P., Bi, W., Ward, P., Bacino, C.A., Shaw, C., Lupski, J.R., Beudet, A., Patel, A., *et al.* (2012). Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenatal diagnosis* 32, 351-361.
- Broquet, T., and Petit, E. (2004). Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular ecology* 13, 3601-3608.
- Crider, K.S., Olney, R.S., and Cragan, J.D. (2008). Trisomies 13 and 18: population prevalences, characteristics, and prenatal diagnosis, metropolitan Atlanta, 1994-2003. *American journal of medical genetics Part A* 146A, 820-826.
- Cui, K.H., Warnes, G.M., Jeffrey, R., and Matthews, C.D. (1994). Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet* 343, 79-82.
- Czyz, Z.T., Kirsch, S., and Polzer, B. (2015). Principles of Whole-Genome Amplification. *Methods in molecular biology* 1347, 1-14.
- Chaturvedi, P., Gilkes, D.M., Takano, N., and Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E2120-2129.
- Chen, H.F., Chen, S.U., Ma, G.C., Hsieh, S.T., Tsai, H.D., Yang, Y.S., and Chen, M. (2017). Preimplantation genetic diagnosis and screening: Current status and future challenges. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*.

- Deleye, L., De Coninck, D., Christodoulou, C., Sante, T., Dheedene, A., Heindryckx, B., Van den Abbeel, E., De Sutter, P., Menten, B., Deforce, D., *et al.* (2015). Whole genome amplification with SurePlex results in better copy number alteration detection using sequencing data compared to the MALBAC method. *Scientific reports* 5, 11711.
- Elbling, L., and Colot, M. (1985). Abnormal development and transport and increased sister-chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice. *Mutation research* 147, 189-195.
- Emad, A., Lamoureux, J., Ouellet, A., and Drouin, R. (2015). Rapid Aneuploidy Detection of Chromosomes 13, 18, 21, X and Y Using Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction with Few Microdissected Fetal Cells. *Fetal diagnosis and therapy* 38, 65-76.
- Feldman, B., Ebrahim, S.A., Hazan, S.L., Gyi, K., Johnson, M.P., Johnson, A., and Evans, M.I. (2000). Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies. *American journal of medical genetics* 90, 233-238.
- Ferrari, M., Carrera, P., Lampasona, V., and Galbiati, S. (2014). New trend in non-invasive prenatal diagnosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*.
- Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C.E., Minasi, M.G., and Greco, E. (2014). Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human reproduction* 29, 2802-2813.
- Franasiak, J.M., Olcha, M., Shastri, S., Molinaro, T.A., Congdon, H., Treff, N.R., and Scott, R.T., Jr. (2016). Embryonic aneuploidy does not differ among genetic ancestry according to continental origin as determined by ancestry informative markers. *Human reproduction* 31, 2391-2395.
- Fujimoto, V.Y., Luke, B., Brown, M.B., Jain, T., Armstrong, A., Grainger, D.A., Hornstein, M.D., and Society for Assisted Reproductive Technology Writing, G. (2010). Racial and ethnic disparities in assisted reproductive technology outcomes in the United States. *Fertility and sterility* 93, 382-390.
- Gardner, D.K., and Lane, M. (2014a). Culture of viable mammalian embryos. *Principles of Cloning*, 63-84.
- Gardner, D.K., and Lane, M. (2014b). Mammalian preimplantation embryo culture. *Methods in molecular biology* 1092, 167-182.
- Gardner, D.K., Lane, M., Calderon, I., and Leeton, J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 65, 349-353.
- Gutierrez-Mateo, C., Colls, P., Sanchez-Garcia, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Wells, D., and Munne, S. (2011). Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 95, 953-958.
- Haapaniemi Kouru, K., Malmgren, H., Nordenskjold, M., Fridstrom, M., Csemiczky, G., and Blennow, E. (2012). One-cell biopsy significantly improves the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) treatment: retrospective analysis of 569 PGD cycles at the Stockholm PGD centre. *Human reproduction* 27, 2843-2849.
- Handyside, A.H., Pattinson, J.K., Penketh, R.J., Delhanty, J.D., Winston, R.M., and Tuddenham, E.G. (1989). Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1, 347-349.
- Harper, J.C., Wilton, L., Traeger-Synodinos, J., Goossens, V., Moutou, C., SenGupta, S.B., Pehlivan Budak, T., Renwick, P., De Rycke, M., Geraedts, J.P., *et al.* (2012). The

ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Human reproduction update* 18, 234-247.

- Harton, G.L., Munne, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D.H., Griffin, D.K., Wells, D., and Group, P.G.D.P. (2013). Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 100, 1695-1703.
- Hassold, T., Abruzzo, M., Adkins, K., Griffin, D., Merrill, M., Millie, E., Saker, D., Shen, J., and Zaragoza, M. (1996). Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 28, 167-175.
- Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human molecular genetics* 16 *Spec No. 2*, R203-208.
- Hassold, T., and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature reviews Genetics* 2, 280-291.
- Hassold, T.J. (1998). Nondisjunction in the human male. *Curr Top Dev Biol* 37, 383-406.
- Huang, L., Ma, F., Chapman, A., Lu, S., and Xie, X.S. (2015). Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications. *Annual review of genomics and human genetics* 16, 79-102.
- In't Veld, P.A., Broekmans, F.J., de France, H.F., Pearson, P.L., Pieters, M.H., and van Kooij, R.J. (1997). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Human reproduction* 12, 752-754.
- Jung, S.I., Cho, H.S., Lee, C.H., Kim, K.D., Ha, J.O., Kim, M.K., Lee, K.H., and Hyun, M.S. (2008). Two cases of trisomy 19 as a sole chromosomal abnormality in myeloid disorders. *The Korean journal of laboratory medicine* 28, 174-178.
- Kamel, R.M. (2010). Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 8, 21.
- Kane, S.C., Willats, E., Bezerra Maia, E.H.M.S., Hyett, J., and da Silva Costa, F. (2016). Pre-Implantation Genetic Screening Techniques: Implications for Clinical Prenatal Diagnosis. *Fetal diagnosis and therapy* 40, 241-254.
- Kokkali, G., Vrettou, C., Traeger-Synodinos, J., Jones, G.M., Cram, D.S., Stavrou, D., Trounson, A.O., Kanavakis, E., and Pantos, K. (2005). Birth of a healthy infant following trophoctoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major. *Human reproduction* 20, 1855-1859.
- Kong, X.D., Liu, N., Xu, X.J., Zhao, Z.H., and Jiang, M. (2015). Screening of human chromosome 21 genes in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with Down syndrome. *Molecular medicine reports* 11, 1235-1239.
- Labarta, E., Bosch, E., Mercader, A., Alama, P., Mateu, E., and Pellicer, A. (2017). A Higher Ovarian Response after Stimulation for IVF Is Related to a Higher Number of Euploid Embryos. *BioMed research international* 2017, 5637923.
- Lathi, R.B., Westphal, L.M., and Milki, A.A. (2008). Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplanation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 89, 353-357.
- Laus, A.C., Baratela, W.A., Laureano, L.A., Santos, S.A., Huber, J., Ramos, E.S., Rebelo, C.C., Squire, J.A., and Martelli, L. (2012). Karyotype/phenotype correlation in partial trisomies of the long arm of chromosome 16: case report and review of literature. *American journal of medical genetics Part A* 158A, 821-827.
- Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485-487.

- Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M., and Hjelm, N.M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American journal of human genetics* 64, 218-224.
- Lupski, J.R. (1998). Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends in genetics : TIG* 14, 417-422.
- Macaluso, M., Wright-Schnapp, T.J., Chandra, A., Johnson, R., Satterwhite, C.L., Pulver, A., Berman, S.M., Wang, R.Y., Farr, S.L., and Pollack, L.A. (2010). A public health focus on infertility prevention, detection, and management. *Fertility and sterility* 93, 16 e11-10.
- Macas, E., Imthurn, B., and Keller, P.J. (2001). Increased incidence of numerical chromosome abnormalities in spermatozoa injected into human oocytes by ICSI. *Human reproduction* 16, 115-120.
- Maleki-Saghooni, N., Amirian, M., Sadeghi, R., and Latifnejad Roudsari, R. (2017). Effectiveness of infertility counseling on pregnancy rate in infertile patients undergoing assisted reproductive technologies: A systematic review and meta-analysis. *International journal of reproductive biomedicine* 15, 391-402.
- Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J.C., Verhoeve, H.R., Vogel, N.E., Arts, E.G., de Vries, J.W., Bossuyt, P.M., *et al.* (2007). In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *The New England journal of medicine* 357, 9-17.
- Mertzaniidou, A., Wilton, L., Cheng, J., Spits, C., Vanneste, E., Moreau, Y., Vermeesch, J.R., and Sermon, K. (2013). Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human reproduction* 28, 256-264.
- Oldach, D. (1999). "Real-time" polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 116, 763-764.
- Orr, B., Godek, K.M., and Compton, D. (2015). Aneuploidy. *Current biology : CB* 25, R538-542.
- Palermo, G.D., Cohen, J., and Rosenwaks, Z. (1996). Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertility and sterility* 65, 899-908.
- Palermo, G.D., Neri, Q.V., Monahan, D., Kocent, J., and Rosenwaks, Z. (2012). Development and current applications of assisted fertilization. *Fertility and sterility* 97, 248-259.
- Pascual, F.I.F.d.M., M. A.; Borque de Larrea L. (2009). Valoracion de una reaccion en cadena de la polimerasa cuantitativa y fluorescente (QF-PCR) para el diagnostico rapido de aneuploidias\$. *Revista del Laboratorio Clinico* 2, 169-177.
- Paunio, T., Reima, I., and Syvanen, A.C. (1996). Preimplantation diagnosis by whole-genome amplification, PCR amplification, and solid-phase minisequencing of blastomere DNA. *Clinical chemistry* 42, 1382-1390.
- Perez-Enciso, M., and Ferretti, L. (2010). Massive parallel sequencing in animal genetics: wherefroms and wheretos. *Animal genetics* 41, 561-569.
- Plaseski, T., Noveski, P., Trivodalieva, S., Efremov, G.D., and Plaseska-Karanfilska, D. (2008). Quantitative fluorescent-PCR detection of sex chromosome aneuploidies and AZF deletions/duplications. *Genetic testing* 12, 595-605.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive, M. (2006). Definition of "infertility". *Fertility and sterility* 86, S228.
- Rabinowitz, M., Ryan, A., Gemelos, G., Hill, M., Baner, J., Cinnioglu, C., Banjevic, M., Potter, D., Petrov, D.A., and Demko, Z. (2012). Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil Steril* 97, 395-401.

- Ramia, M., Musharrafieh, U., Khaddage, W., and Sabri, A. (2014). Revisiting Down syndrome from the ENT perspective: review of literature and recommendations. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* 271, 863-869.
- Rasmussen, S.A., Wong, L.Y., Yang, Q., May, K.M., and Friedman, J.M. (2003). Population-based analyses of mortality in trisomy 13 and trisomy 18. *Pediatrics* 111, 777-784.
- Rickman, L., Fiegler, H., Carter, N.P., and Bobrow, M. (2005). Prenatal diagnosis by array-CGH. *European journal of medical genetics* 48, 232-240.
- Rodríguez-Santiago, B.A., L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal* 23, 56-66.
- Rubio, C., Bellver, J., Rodrigo, L., Castillon, G., Guillen, A., Vidal, C., Giles, J., Ferrando, M., Cabanillas, S., Remohi, J., *et al.* (2017). In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertility and sterility* 107, 1122-1129.
- Sánchez-Usabiaga, R., González-Becerra, J., Vera-Aguado, M., Ramírez, E., and Durand-Montaño. (2017). Incidence and parental origin of aneuploidies in blastocysts: comparison between two centers of assisted reproduction in Mexico. *Ginecol Obstet Mex* 85, 289-297.
- Schaeffer, E., Lopez-Bayghen, B., Neumann, A., Porchia, L.M., Camacho, R., Garrido, E., Gomez, R., Camargo, F., and Lopez-Bayghen, E. (2017). Whole Genome Amplification of Day 3 or Day 5 Human Embryos Biopsies Provides a Suitable DNA Template for PCR-Based Techniques for Genotyping, a Complement of Preimplantation Genetic Testing. *BioMed research international* 2017, 1209158.
- Sehnert, A.J., Rhees, B., Comstock, D., de Feo, E., Heilek, G., Burke, J., and Rava, R.P. (2011). Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clinical chemistry* 57, 1042-1049.
- Simon, C., Rubio, C., Vidal, F., Gimenez, C., Moreno, C., Parrilla, J.J., and Pellicer, A. (1998). Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reproduction, fertility, and development* 10, 87-92.
- Smolock, E.M., Korshunov, V.A., Glazko, G., Qiu, X., Gerloff, J., and Berk, B.C. (2012). Ribosomal protein L17, RpL17, is an inhibitor of vascular smooth muscle growth and carotid intima formation. *Circulation* 126, 2418-2427.
- Srebniak, M., Boter, M., Oudesluijs, G., Joosten, M., Govaerts, L., Van Opstal, D., and Galjaard, R.J. (2011). Application of SNP array for rapid prenatal diagnosis: implementation, genetic counselling and diagnostic flow. *European journal of human genetics : EJHG* 19, 1230-1237.
- Stembalska, A., Slezak, R., Pesz, K., Gil, J., and Sasiadek, M. (2007). Prenatal diagnosis--principles of diagnostic procedures and genetic counseling. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 45 Suppl 1, S11-16.
- Storchova, Z. (2012). The Causes and Consequences of Aneuploidy in Eukaryotic Cells, *Aneuploidy in Health and Disease*.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., and Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic acids research* 24, 3189-3194.

- Tateno, H. (2009). Possible causal factors of structural chromosome aberrations in intracytoplasmic sperm injection of the mouse. *Reproductive medicine and biology* 8, 89-95.
- Tateno, H., and Kamiguchi, Y. (2007). Evaluation of chromosomal risk following intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of reproduction* 77, 336-342.
- Teh, W.T., McBain, J., and Rogers, P. (2016). What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *Journal of assisted reproduction and genetics* 33, 1419-1430.
- Torres, E.M., Williams, B.R., and Amon, A. (2008). Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics* 179, 737-746.
- Traeger-Synodinos, J. (2017). Pre-implantation genetic diagnosis. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 39, 74-88.
- Tsujie, T., Takemura, M., Kimura, T., Shimoya, K., Tsutsui, T., Ogita, K., Ozaki, M., and Murata, Y. (2006). Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 32, 368-372.
- Valdes, C.T., Schutt, A., and Simon, C. (2017). Implantation failure of endometrial origin: it is not pathology, but our failure to synchronize the developing embryo with a receptive endometrium. *Fertility and sterility* 108, 15-18.
- Van der Aa, N., Zamani Esteki, M., Vermeesch, J.R., and Voet, T. (2013). Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome medicine* 5, 71.
- Ventura-Junca, P., Irarrazaval, I., Rolle, A.J., Gutierrez, J.I., Moreno, R.D., and Santos, M.J. (2015). In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. *Scientific and bioethical implications for IVF in humans. Biological research* 48, 68.
- Vermeesch, J.R., Voet, T., and Devriendt, K. (2016). Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis. *Nature reviews Genetics* 17, 643-656.
- Wale, P.L., and Gardner, D.K. (2016). The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human reproduction update* 22, 2-22.
- Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., Odenbourg, R., and Keefe, D.L. (2001). Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Human reproduction* 16, 2374-2378.
- Warden, C.R., Pillers, D.A., Rice, M.J., Wildes, J., Livingston, J.S., Clark, B.A., Gilhooly, J.T., and Magenis, R.E. (2001). Interstitial duplication of the short arm of chromosome 1 in a newborn with congenital heart disease and multiple malformations. *American journal of medical genetics* 101, 100-105.
- Watanabe, H. (2018). Risk of chromosomal aberration in spermatozoa during intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of reproduction and development*.
- Wells, D., and Delhanty, J.D. (2000). Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular human reproduction* 6, 1055-1062.
- Wells, D., Sherlock, J.K., Handyside, A.H., and Delhanty, J.D. (1999). Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic acids research* 27, 1214-1218.
- Wenger, J.M., Loubeyre, P., Marci, R., and Dubuisson, J.B. (2009). [Endometriosis: review of the literature and clinical management]. *Revue medicale suisse* 5, 2085-2086, 2088-2090.

- Xu, K., and Montag, M. (2012). New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why? *Seminars in reproductive medicine* 30, 259-266.
- Yang, Z., Salem, S.A., Liu, X., Kuang, Y., Salem, R.D., and Liu, J. (2013). Selection of euploid blastocysts for cryopreservation with array comparative genomic hybridization (aCGH) results in increased implantation rates in subsequent frozen and thawed embryo transfer cycles. *Mol Cytogenet* 6, 32.
- Zacchini, F., Arena, R., Abramik, A., and Ptak, G.E. (2017). Embryo biopsy and development: the known and the unknown. *Reproduction* 154, R143-R148.
- Zargari, M., Sadeghi, M.R., Shahhosseiny, M.H., Kamali, K., Saliminejad, K., Esmaeilzadeh, A., and Khorshid, H.R. (2011). Fetal Sex Determination using Non-Invasive Method of Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma of Pregnant Women During 6(th)- 10(th) Weeks of Gestation. *Avicenna journal of medical biotechnology* 3, 201-206.

ANEXOS

ANEXO 1. TRABAJOS PUBLICADOS

- Schaeffer, E., Lopez-Bayghen, B., Neumann, A., Porchia, L.M., Camacho, R., Garrido, E., Gomez, R., Camargo, F., and Lopez-Bayghen, E. (2017). **Whole Genome Amplification of Day 3 or Day 5 Human Embryos Biopsies Provides a Suitable DNA Template for PCR-Based Techniques for Genotyping, a Complement of Preimplantation Genetic Testing.** BioMed research international 2017, 1209158
- Elizabeth Schaeffer, MSc; Leonardo M. Porchia, PhD; Esther López-Bayghen, PhD. (2018). **Aneuploidy rates inversely correlate with implantation during *in vitro* fertilization procedure in patients from Mexico: a retrospective study.** En preparación.
- Elizabeth Schaeffer, Leonardo Porchia, Almena López-Luna, Dinorah Hernández Melchor, and Esther López-Bayghen. (2018). **Aneuploidy rates inversely correlate with implantation during *in vitro* fertilization procedure.** IntechOpen, enviado para su revision.

Research Article

Whole Genome Amplification of Day 3 or Day 5 Human Embryos Biopsies Provides a Suitable DNA Template for PCR-Based Techniques for Genotyping, a Complement of Preimplantation Genetic Testing

Elizabeth Schaeffer,^{1,2} Bruno López-Bayghen,³ Adina Neumann,¹ Leonardo M. Porchia,³ Rafael Camacho,³ Efraín Garrido,² Rocío Gómez,³ Felipe Camargo,¹ and Esther López-Bayghen³

¹Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular, Instituto de Infertilidad y Genética, Ingenes, Ciudad de México, Mexico

²Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN, Ciudad de México, Mexico

³Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN, Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Esther López-Bayghen; ebayghen@cinvestav.mx

Received 22 January 2017; Revised 31 March 2017; Accepted 24 April 2017; Published 22 June 2017

Academic Editor: Peter J. Oefner

Copyright © 2017 Elizabeth Schaeffer et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Our objective was to determine if whole genome amplification (WGA) provides suitable DNA for qPCR-based genotyping for human embryos. Single blastomeres (Day 3) or trophoblastic cells (Day 5) were isolated from 342 embryos for WGA. Comparative Genomic Hybridization determined embryo sex as well as Trisomy 18 or Trisomy 21. To determine the embryo's sex, qPCR melting curve analysis for SRY and DYS14 was used. Logistic regression indicated a 4.4%, 57.1%, or 98.8% probability of a male embryo when neither gene, SRY only, or both genes were detected, respectively (accuracy = 94.1%, kappa = 0.882, and $p < 0.001$). Fluorescent Capillary Electrophoresis for the amelogenin genes (AMEL) was also used to determine sex. AMELY peak's height was higher and this peak's presence was highly predictive of male embryos (AUC = 0.93, accuracy = 81.7%, kappa = 0.974, and $p < 0.001$). Trisomy 18 and Trisomy 21 were determined using the threshold cycle difference for RPL17 and TTC3, respectively, which were significantly lower in the corresponding embryos. The Ct difference for TTC3 specifically determined Trisomy 21 (AUC = 0.89) and RPL17 for Trisomy 18 (AUC = 0.94). Here, WGA provides adequate DNA for PCR-based techniques for preimplantation genotyping.

1. Introduction

Use of assisted reproduction technology, such as in vitro fertilization (IVF), has become more widespread over the past decade. One of the main causes is due to women waiting later in life to get pregnant; however, IVF alone cannot compensate for the lower fertilization rates that are associated with advanced age [1]. During assisted reproductive treatments, it is highly suggested for patients to complement IVF with Preimplantation Genetic Testing (PGT) to assess embryos for possible aneuploidies, genetic defects, or diseases.

A variety of methods are currently available for PGT, with each having their advantages and disadvantages. For

example, Comparative Genomic Hybridization (CGH) and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) require days rather than hours to perform, meaning embryos have to be frozen. Moreover, these techniques come with high procedural costs [2]. The most important concerns for PGT are the reliability of prediction, method error rates, ex vivo embryo maintenance, and, to a lesser extent, procedural costs. As for reliability of prediction and method error rates, allele drop-out (ADO) has been shown to diminish or remove the signal for multiple techniques [3] leading to incorrect genotype assignment. On the other hand, false allele (FA), an amplification artifact that causes the appearance of new allele, is also leading to erroneous identification of the chromosome

make-up. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a rapid, relatively inexpensive, and highly sensitive technique, making it a suitable option for specific genotyping. Interestingly, the initial step of CGH for PGT requires the whole genome to be amplified, which allows further analysis of many PGT targets. Despite this fact, to our knowledge, information whole genome amplification (WGA) coupled with PCR-based strategies is a technology still being optimized which needs further assessment ([3–7]).

Some of the most characterized PCR-based techniques focus on determining the sex of tissues for forensic science or for embryos post implantation. Currently, most methods for sex determination use the detection of genes that are only associated with the Y-chromosome, such as sex determining region Y (SRY) and DYS14, a marker found in the intron of the TSPY gene [8, 9]. SRY is a single copy gene [10], whereas TSPY is a multicopy gene [11, 12]; therefore, differences in the detection capabilities for each gene could be expected. Moreover, the initial amount of genetic material could significantly affect the detection of SRY, especially when starting with a single cell. Another well-characterized system is examining the amelogenin genes. The amelogenin genes, which are present on both the X-chromosome (AMELX) and the Y-chromosome (AMELY), have been used to determine sex in cattle [13], sheep, and deer [14] as well as in other species of the Bovidae family [14]. In humans, both genes are nearly identical; however, there is a 6 bp insert in intron 1 of AMELY. Using PCR, Shadrach et al. demonstrated that amplifying this region with a single PCR reaction produced a 104 and 110 bp amplicon for AMELX and AMELY, respectively [15]. Thus, the presence of two amplicons suggests male tissue, whereas one amplicon suggests female tissue.

Two common genetic abnormalities with high prevalence during IVF procedures are Trisomy 21 (Down syndrome) and Trisomy 18 (Edwards syndrome). For Trisomy 21, current methods include examining the Down Syndrome Critical Region, located on chromosome 21, which contains many genes whose duplication lead to the phenotypic features of Down syndrome, such as Tetratricopeptide Repeat Domain 3 (TTC3) gene [16, 17]. Recently, quantitative amplification of the TTC3 gene was shown to discriminate between subjects with Down syndrome from normal subjects; however, this study focused on prenatal and neonatal sources [16]. For Trisomy 18, investigators can examine the ribosomal protein gene (RPL17), located at chromosome 18q21.1-q21.1 [18]; however, the association between RPL17 and Trisomy 18 detection has yet to be investigated.

For humans, PCR-based techniques for AMEL, SRY, and DYS14 have been implemented to determine the embryo's sex after implantation; however, these methods require a significant amount of genomic DNA. The possibility of examining these genes before embryo implantation has yet to be fully investigated; therefore, we tested the ability for the detection of these amplicons when using the WGA product as the template. Here, we examined SRY, DYS14, AMELX, AMELY, TTC3, and RPL17 using WGAs from a single blastomere (Day 3) or trophoblastic (Day 5) biopsies, to determine the two

important trisomies and the sex of the embryos from patients undergoing IVF treatments.

2. Materials and Methods

2.1. Study Patients and Ethical Approval. Eighty-three women (age range: 21–47 years), undergoing IVF in Mexico City, were included in this cross-sectional study. Patients were clinically evaluated according to a standardized protocol that included personal and family clinical history. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Ingenes Institute. Written informed consent was obtained from all patients, conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2. In Vitro Fertilization and Pregnancy. All patients were subjected to controlled ovarian stimulation for 10 days with gonadotrophin-releasing hormone agonists and antagonists. Ovarian response was assessed measuring serum estradiol levels and follicular development was evaluated by ultrasound examination. Oocyte retrieval was conducted 20 hours after human chorionic gonadotropin administration with ultrasound guidance. The follicles aspirated ranged between 2 and 43 (average = 12.7 ± 7.7) and the embryos obtained ranged between 1 and 10 (average = 3.7 ± 2.3) per patient. The average fertilization rate was $72.3 \pm 20.4\%$. An embryologist monitored and recorded all information about fertilization rates, embryo development, and embryo morphology for each oocyte.

2.3. Embryo Biopsy (Day 3 and Day 5) and Collection of Control Samples. For Day 3 embryos, we utilized the S-biopsy method. The S-biopsy method is a simplified displacement method in combination with laser-assisted hatching for the removal of a blastomere and is performed on cleavage stage embryos [19]. Briefly, a laser (Octax, PL, Europe) was used to create a thin funnel in the zona pellucida adjacent to the desired blastomere. Next, the blastomere was extracted by aspirating the complete embryo with a 140 μm stripper capillary micropipette, leading to the ejection of the blastomere. The blastomere was then placed into a 0.2 μL PCR tube and separated for further analysis.

For Day 5 embryos (expanded blastocyst stage containing 50 to 150 cells), a laser (Octax, PL, Europe) was used to create a thin funnel in the zona pellucida on the opposite side to the inner cell mass. Blastocysts were incubated for a further 2-3 hours to allow blastocoele expansion and herniation of the trophectoderm cells from the zona, at which time the embryo was placed into 20 μL of medium (Vitrolife) under oil for biopsy. Applying gentle suction with the biopsy pipette (MBB-FP-SM-35, Origio, Malov, Denmark), the trophectoderm cells were encouraged to herniate from the zona. Four to five trophectoderm cells were dissected from each of the blastocysts using four laser pulses of 3-minute duration. 10–15 cells were retrieved, washed, and placed into a 0.2 μL PCR tube.

For the control samples, 37 adults (12 females and 25 males) were randomly selected and buccal samples were

TABLE 1: qPCR primers.

| Gene | Forward primer | Reverse primer | Size | Ref. |
|--------|--|--------------------------------|----------------------------------|-----------|
| GAPDH | 5'-TTTAACTCTGGTAAAGTGGATATTG-3' | 5'-CTGTTGTCATACTTCTCATGGTT-3' | 363 bp | This work |
| SRY | 5'-GCTGGGATAACCAGTGGAAAA-3' | 5'-TCTTGAGTGTGTGGCTTTTCG-3' | 247 bp | [22, 23] |
| DYS14 | 5'-CATCCAGAGCGTCCCTGG-3' | 5'-TTCCCCTTTGTTCCCCAAA-3' | 147 bp | [24] |
| AMEL | 5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3' (6-carboxyfluorescein labeled) | 5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3' | 106 bp (XX) 110 bp (XY) | [25] |
| TTC3 | 5'-GAATACTTTGATGATTGCCAACAG-3' | 5'-TCACTAGAATACTGCTTCGAGAC-3' | 141 bp | This work |
| RPL17 | 5'-CCCCACTTAGATGTACATAGCC-3' | 5'-TGGAGGACTTCAGCTTATTCTG-3' | 236 bp | This work |
| HSD3B2 | 5'-CCCCTCCATACCCGTACAG-3' | 5'-GTAGAGAACTTTCCAACACTTGAC-3' | 206 bp | This work |

collected. As for the control samples for Trisomy detection, buccal samples were collected from 11 normal adults (5 females and 6 males) and 4 with Down syndrome (1 female and 3 males). Using dilution and micromanipulation, 10–15 cells were isolated and placed into a 0.2 μ L PCR tube. These samples underwent the same WGA process as Day 3 and Day 5 embryo biopsies. Furthermore, blood samples were collected to provide a sufficient amount of genomic DNA, not requiring a WGA step for analysis, using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to manufacturer's instructions.

2.4. WGA and CGH. Each sample (Day 3, Day 5, or control samples) was amplified using the SurePlex amplification system (BlueGnome, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. CGH was carried out using the 24Sure V3 microarray (Illumina, San Diego, CA, USA) using the protocol described by Fragouli et al. [20, 21]. The amplified DNA was fluorescently labelled (Fluorescence Labelling System, BlueGnome). The samples were coprecipitated, denatured, and analyzed by array hybridization. The hybridization time was 16 hours. A laser scanner (InnoScan 710, Innopsys, Carbonne, France) was used to excite the fluorophores and read the hybridization images. The hybridization images were stored in TIFF format and analyzed by the BlueFuse Multi-Analysis software (BlueGnome) using criteria and algorithms recommended by the manufacturer. With this approach, it was possible to determine the chromosome constitution of each embryo. Additionally, X- and Y-chromosome hybridization allowed the classification of the embryos as either male (hybridization of Y-chromosome probes) or female (no hybridization of Y-chromosome probes, coupled with higher hybridization of X-chromosome probes). CGH data are available in the public repository Gene Expression Omnibus (GEO accession number GSE97386 for Y-chromosome and GSE97903 for Trisomy at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE97386>).

2.5. Genotyping via qPCR. Primers for GAPDH, SRY, DYS14, TTC3, RPL17, and hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase and 3 beta- and steroid delta-isomerase 2C (HSDB) are presented in Table 1 [22–26]. Primers were first validated by

amplifying genomic DNA from adult samples. The regions of interest were amplified using the KAPA SYBR® FAST qPCR system. Each 10.0 μ L reaction consisted of 5.0 μ L of Universal PCR Master Mix, 4 pM of each primer, and 200 to 250 ng of purified WGA. The mixture was vortexed for 5 seconds and then centrifuged for 5 seconds. The PCR conditions were 10 minutes at 98°C, followed by 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 1 minute at 72°C, followed by 10 minutes at 72°C using the StepOne Plus instrument (ThermoFisher). All the PCR products were resolved through capillary electrophoresis using the BioAnalyzer Labchip GX (Caliper). The products showed a single band corresponding to the predicted base pair length. Moreover, the bands were cloned and analyzed via sequencing to verify their identity. SYBR Green was used during amplification to construct melting curves that were analyzed to verify if the peaks corresponded with theoretical melting temperatures for each amplicon (Figure 1).

For quantitative genotyping, a subset of 43 embryos biopsied on Day 5 from 31 patients was analyzed for PGT. The embryos were separated into 3 groups based on CGH results (normal, Trisomy 21, or Trisomy 18). For quality control, each sample was run as a standard curve for TTC3, RPL17, and HSDB (endogenous control) with 3.75, 7.5, and 15 ng of purified WGA. Under ideal conditions, the slope of the log WGA concentration to C_T should be -3.3 ± 0.4 , to have all three fragments amplified at comparable efficiency. For result analysis, the reaction mixture was the same as above with 15 ng of purified WGA. Each reaction was subjected to 1 cycle of 95°C for 10 seconds, followed by 40 cycles of 95°C for 3 seconds, 58°C for TTC3, and RPL17 or 62°C for HSDB for 30 seconds. Lastly, a melting curve stage (95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute, and 95°C for 15 seconds) was constructed to determine the purity. For result analysis, C_T value considered was that obtained from the reactions containing 15 ng of purified WGA.

2.6. Determination of AMELX and AMELY. To determine AMELX and AMELY (primers in Table 1), an initial PCR reaction, containing 5 μ L of Universal PCR Master Mix, 4 pM of each primer, and 200–250 ng of purified WGA, was prepared. The PCR conditions were the same as for GAPDH, SRY, and DYS14. A secondary PCR reaction was

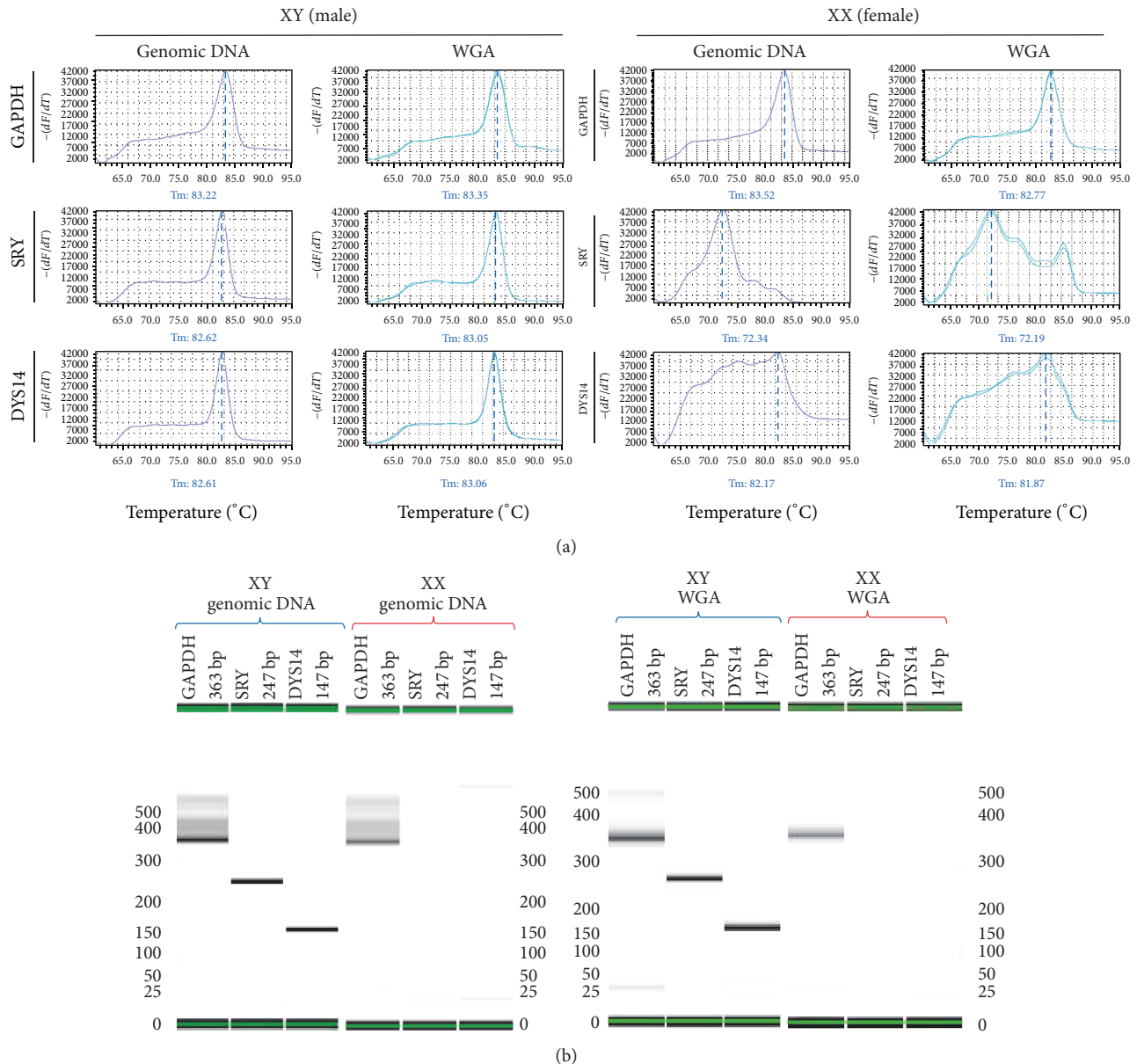


FIGURE 1: GAPDH, SRY, and DYS14 melting curve analysis. Isolated genomic DNA from control adults (Genomic) and WGA from a blastomere were used as templates for GAPDH, SRY, and DYS14 qPCR reactions. Representative data for males and females are shown. (a) Melting temperature peaks were determined by negative first derivatives ($-dF/dT$) plot. These plots were used for identification of the embryo's sex. Melt curve data was extracted from the StepOne software and used to create graphs. Representative graphs for each gene and sample type are shown. (b) PCR products were resolved through capillary electrophoresis using the BioAnalyzer Labchip GX. Products showed a single band corresponding to the predicted base pair length.

run with $1\ \mu\text{L}$ of the first amplification product in $0.2\ \text{mL}$ PCR tubes containing a similar reaction mix, but now including the forward primer for AMEL conjugated with 6-carboxyfluorescein. Amplicons were analyzed by capillary electrophoresis on the ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer using the GeneMapper ID v.3.2 software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). All samples were analyzed with an internal control and an internal size standard (GeneScan-500LIZ, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). According to the recommendations of Szibor et al. [27], the genotyping

was performed by comparing to the female control DNA 9947A (Promega Corporation, Madison, WI, USA) [28]. The presence of 1 peak at 104 bp was presumed to be indicative of a female genotype (Figure 2(a)), whereas the presence of two peaks at 104 and 110 bp was presumed to be male (Figure 2(b)).

2.7. Statistical Analysis. Rates for ADO and FA were calculated according to Broquet and Petit [29]. The Shapiro-Wilk test was used to determine if the data were normally

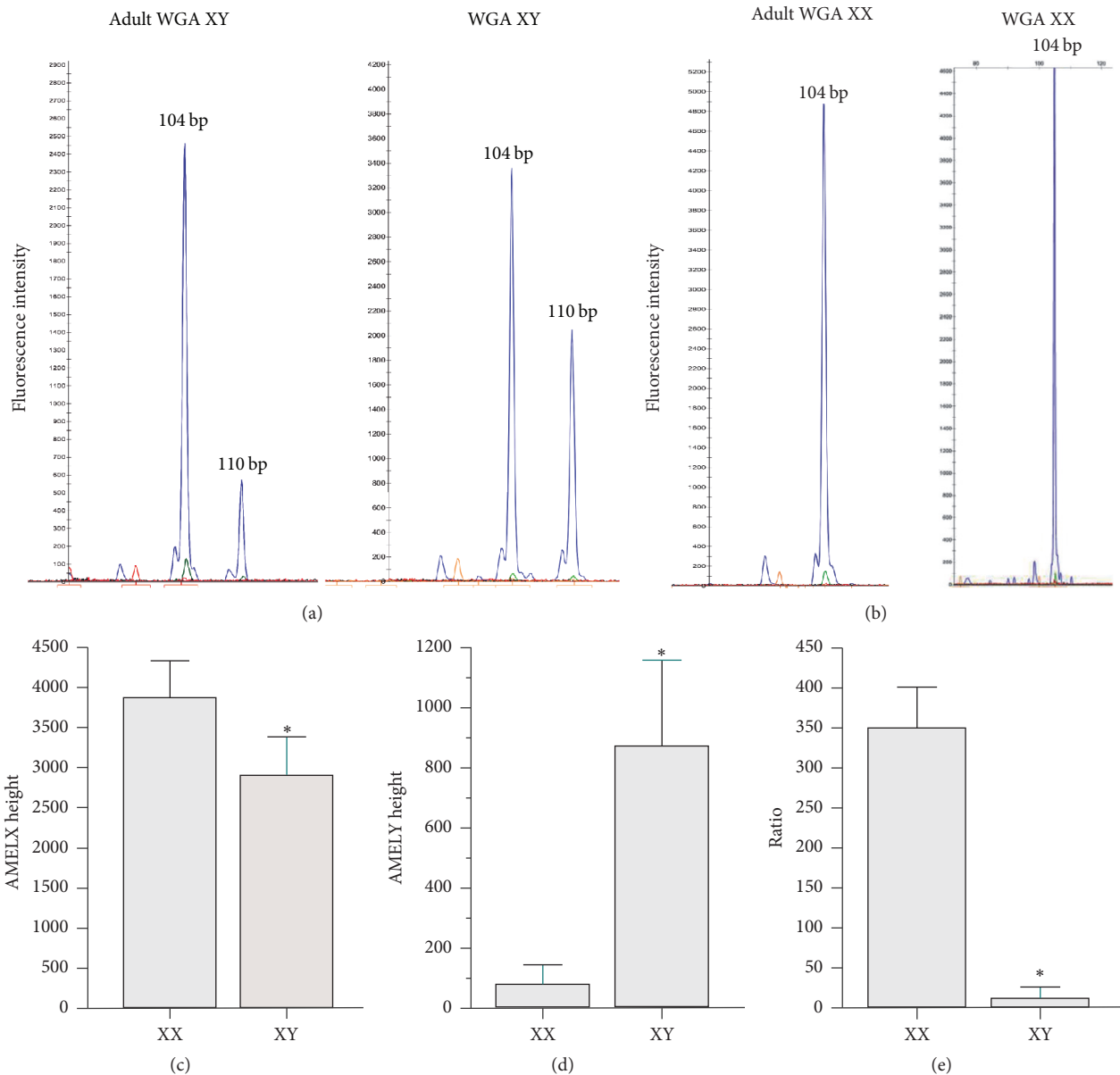


FIGURE 2: Capillary electrophoresis analysis of amelogenin intron 1. Male and female adult DNA, isolated from 10–15 cells from a buccal sample, were prepared under the same conditions as DNA isolated from Day 5 embryos. PCR products were separated by capillary electrophoresis to confirm AMELX (104 bp) and AMELY (110 bp) for male (a) and female adults (b). Comparison of the AMELX (c), AMELY (d), and peak height and X/Y ratio (e) for Day 3 and Day 5 embryo biopsies. The height of the bar is the average and the error bars represent the 95% CI. * indicates a significant difference between groups ($p < 0.05$).

distributed. Either the Mann–Whitney U test, T -test, or ANOVA with a post hoc Bonferroni test was used to examine differences between groups. p values < 0.05 were considered significant. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to determine the specificity and sensitivity of AMELX and AMELY genes as an indicator of male embryos and for TTC3 and RPL17 to analyze Trisomy 21 and Trisomy 18. The area under the curve (AUC) was measured to determine the degree of predictability. Logistic regression was used to assess the association between SRY, DYS14, or both genes and the embryo's sex. Cohen's kappa was calculated

to determine the level of agreement between the index and the standard (CGH). All analyses were carried out with the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS, v. 22.0, Chicago, IL USA).

3. Results

3.1. Study Characteristics. Three hundred and forty-two embryos from 83 women were considered for this study. The embryos were randomly distributed for either the GSD index analysis ($n = 214$) or the AMEL analysis ($n = 128$). Six

TABLE 2: Melting curve analysis of SRY and DYS14 to determine embryo sex.

| Gene | Female | | Male | | p | Kappa | OR | 95% CI |
|-------------|---------|-----------|---------|-----------|--------|-------|-----|---------|
| | Correct | Incorrect | Correct | Incorrect | | | | |
| SRY | 107 | 1 | 83 | 13 | <0.001 | 0.861 | 683 | 88–5328 |
| SRY + DYS14 | 101 | 7 | 91 | 5 | <0.001 | 0.882 | 262 | 81–856 |

samples showed poor or no amplification at the WGA step and 8 samples showed no amplification of GAPDH, resulting in the loss of 14 embryos for analysis. Using CGH, 146 embryos were determined to be male, whereas 182 embryos were female. For detecting Trisomy 21 or Trisomy 18, a subset of 43 embryos from 31 women was considered for this study. Using CGH, 21 embryos were normal, whereas 9 embryos had a gain in chromosome 18 and 13 embryos had a gain in chromosome 21.

3.2. GSD Index Correlated with the Embryo's Sex. As part of the amplification of SRY, DYS14, and GAPDH, melting curves were produced. Melting curves produced using embryonic WGA DNA as template were compared to melting curves produced using adult genomic DNA. All peaks corresponded to the predicted melting temperature (Figure 1(a)). Moreover, when PCR products were separated by capillary electrophoresis, the predicted band size was observed, indicating the accuracy of the method (Figure 1(b)). The presence of GAPDH indicated a successful amplification. If SRY, DYS14, or both genes were present, the embryos were considered male (*GSD index*). 52.0% of the samples were negative for either SRY or DYS14, suggesting a female embryo (Table 2). On the other hand, 41.2% of the samples were positive for both SRY and DYS14, suggesting a male embryo. Interestingly, 14 samples were positive for only DYS14 and negative for SRY. Logistic regression analysis was performed to evaluate the association between the GSD index and the sex of the embryo. Specifically, SRY and DYS14 together were highly associated with male embryos (Table 2). This resulted in a 4.4% probability of an embryo being male when SRY and DYS14 are not present; however, the probability increased to 57.1% or 98.8% when there was a positive detection for DYS14 or both genes, respectively. When the GSD index was compared to the CGH data, the test was highly accurate (test accuracy = 94.1%, kappa = 0.882, and $p < 0.001$). For SRY, no ADO or FA was seen with data from the adult controls; however, for the embryos, the ADO and FA rates were 13.5% and 0.5%, respectively. For DYS14, no ADO or FA was seen with the control data, whereas, for the embryos, the ADO and FA rates were 5.2% and 3.4%, respectively.

3.3. AMELY Gene Is Highly Predictive for Male Embryos. For analysis of the AMEL genes, using the control WGA samples, the male adult samples consistently had two peaks at 104 and 110 bp (Figure 2(a)), whereas the female adult samples only produced one peak at 104 bp (Figure 2(b)). This was in agreement with the genomic samples, suggesting that starting with 10–15 cells did not affect the sensitivity of the method.

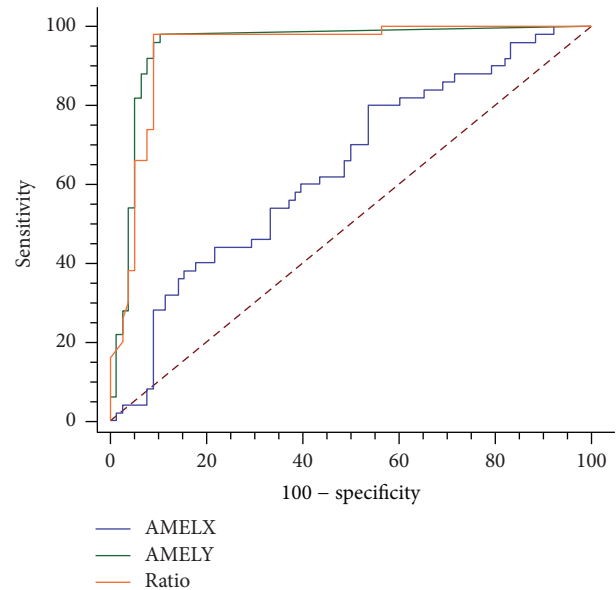


FIGURE 3: Receiver operating characteristic curve for amelogenin genes in identifying male embryos. AMELX (blue), AMELY (green), and the peak height ratio (orange) were assessed.

All of the samples used for the AMEL analysis had suitable genome amplification.

CGH determined that 39.1% of the 128 embryos were male. For AMELX, the peak height was statistically higher in females, while the AMELY peak was higher in males (Figures 2(c) and 2(d), resp.). For AMELY, 8 female embryos had a pronounced peak and 1 male embryo failed to produce a peak. Due to this situation, we examined the peak height ratio and determined that the ratio was significantly higher in females (Figure 2(e)). For AMELX, the peak height was a weak indicator of the embryo's sex (AUC = 0.64, 95% CI: 0.54–0.74, and $p < 0.01$; Figure 3). The AMELY peak height and the peak height ratio, on the other hand, were excellent indicators of the embryo's sex (AUC = 0.95, 95% CI: 0.91–0.99 and AUC = 0.94, 95% CI: 0.90–0.98, resp., $p < 0.01$). Using the ROC curve, a cutoff value of 23.5 for the AMELY peak height was determined (Youden index = 0.877, sensitivity = 98%, and specificity = 90%). When the samples were reanalyzed with this cutoff, the test was exceptionally predictive (test accuracy = 93.0%, kappa = 0.856, and $p < 0.001$). A cutoff value of 21.8 was determined for the peak height ratio (Youden index = 0.890, sensitivity = 98%, and specificity = 91%), which also indicated a highly predictive test (test accuracy = 93.8%, kappa = 0.871, and $p < 0.001$). For AMELY, ADO was 2.0% and FA was 6.3% for the embryo data.

TABLE 3: Detection for Trisomy 18 and Trisomy 21 for embryo samples.

| Gene | Group | N^a | C_T^b | p^c | p^d | AUC ^e |
|-------|-------------------|-----------|--------------------|------------------|--------------|--|
| TTC3 | Normal | 21 | 4.77 ± 0.56 | — | — | — |
| | Trisomy 18 | 6 | 4.81 ± 1.49 | 0.536 | — | 0.66 (0.36–0.96), $p = 0.211$ |
| | Trisomy 21 | 13 | 3.39 ± 0.99 | <0.001 | 0.008 | 0.89 (0.74–1.00), $p < 0.001$ |
| RPL17 | Normal | 21 | 2.19 ± 0.80 | — | — | — |
| | Trisomy 18 | 9 | 0.53 ± 0.53 | <0.001 | — | 0.94 (0.86–1.00), $p < 0.001$ |
| | Trisomy 21 | 13 | 1.77 ± 0.87 | 0.400 | 0.002 | 0.50 (0.32–0.69), $p = 0.968$ |

^a N equals the number of embryos per a group. For TTC3, 3 embryos with Trisomy 18 had C_T values greater than 30 and were excluded from the analysis.

^bValues are mean threshold cycle (C_T) ± stand deviation; ^c p value for the comparison between Trisomy embryos and normal embryos using ANOVA with a post hoc Bonferroni test; ^d p value for the comparison between Trisomy 18 embryos and Trisomy 21 embryos using ANOVA with a post hoc Bonferroni test. ^eThe area under a Receiver-Operator Characteristic Curve (AUC) between Trisomy groups and the normal group. Values are expressed as AUC (95% confidence interval), p value.

3.4. Trisomy 18 and Trisomy 21 Detection. For TTC3, a gene present in chromosome 21, the normal group and Trisomy 18 group had similar threshold cycle values; however, Trisomy 21 group had a threshold cycle about 1.4 cycles lower than the normal group ($p < 0.001$, Table 3), suggesting the presence of a gain in chromosome 21. C_T difference for TTC3 specifically determined Trisomy 21 (AUC = 0.89, 95% CI: 0.74–1.00, and $p < 0.001$) and not Trisomy 18 (AUC = 0.66, 95% CI: 0.36–0.96, and $p = 0.211$). C_T cutoff value of 3.85 was calculated for TTC3 to determine Trisomy 21 (Youden index = 0.886, sensitivity = 92.3%, and specificity = 96.3%). Using this cutoff, the test was highly accurate (accuracy = 95.0%, kappa = 0.840, and $p < 0.001$). For RPL17, a gene specific for chromosome 18, Trisomy 18 group had a threshold cycle about 1.7 cycles lower than the normal group ($p < 0.05$). This C_T difference for RPL17 specifically determined Trisomy 18 (AUC = 0.94, 95% CI: 0.86–1.00, and $p < 0.001$) and not Trisomy 21 (AUC = 0.55, 95% CI: 0.35–0.74, and $p = 0.644$). C_T cutoff value of 0.985 was calculated for RPL17 to determine Trisomy 18 (Youden index = 0.801, sensitivity = 88.9%, and specificity = 91.2%), suggesting an exceptional test (accuracy = 90.7%, kappa = 0.742, and $p < 0.001$). A graphic description is presented in Supplementary Figure in Supplementary Material available online at <https://doi.org/10.1155/2017/1209158>. Overall, these data suggest the possible use of PCR-based techniques and threshold cycle differences to determine genetic abnormalities within hours of an embryo biopsy.

4. Discussion

In this work, we attempted to assess the ability to couple PCR-based techniques with WGA to determine its prognostic capability for preimplantation genotyping. We selected as our models the two well-characterized sex determination systems. For IVF treatments, determining the sex of the embryo is not a procedural concern and is normally determined with PGT when assessing sex-linked genetic diseases. However, under certain other circumstances, knowing the sex of the embryo is desired. But with high PGT costs and lengthy procedural times, cheaper and faster alternative techniques are still needed. Here, we demonstrate that two assays, examining the AMEL genes by Fluorescent Capillary

Electrophoresis and examining the SRY and DYS14 genes by melting curve analysis are highly accurate at determining the embryo's sex. Moreover, we tested the ability of qPCR to determine Trisomy 18 and Trisomy 21. When using TTC3, we could specifically determine Trisomy 21, and when using RPL17, we could specifically determine Trisomy 18.

The two Y-chromosome regions, SRY and DYS14, were demonstrated to specifically indicate the sex of the embryo when assessed by melting curve analysis. As seen with other studies, using both genes demonstrated a marked improvement of sexing the fetus [12, 30–32]; however, these studies used maternal plasma as the source. To our knowledge, this is one of the first studies to examine the SRY and DYS14 regions to sex an embryo before implantation. Moreover, our results demonstrate similar efficiencies as studies which have used cell-free fetal DNA. Eleven male embryos, all having varying degrees of aneuploidies, were misidentified. They were negative for both markers, suggesting the loss of the Y-chromosome. Four had CGH-confirmed loss of the Y-chromosome. Interestingly, six female embryos were positive for DYS14 and not SRY. This result was also observed with White et al., in which, using qPCR, they detected low levels of DYS14 in female fetuses [33].

The use of the AMEL genes to determine the sex of tissues and fetuses in utero is well documented. However, due to limited genetic material, its preimplantation use remains limited. Here, we used WGA to increase the amount of genetic material and determine that, with this additional step, examining AMEL gene specifically predicted the sex of the embryo. Interestingly, we had one male embryo that was negative for the AMELY gene. This could be due to the presence of an AMELY-negative male. In Mexico, the rate of AMELY-negative males was reported to be 0.08% [34]. However, this is the only report to focus on Latin America and the reported rate is lower than other regions, such as India [35, 36], Singapore [37], and Malaysia [36], which can range between 0.88 and 3.60%.

Six of the female embryos were positive for AMELY. Stapleton et al. reported a family in which three female members had the AMELX and the AMELY genotypes, only possessing a small portion of the Y-chromosome [38]. Another possibility is that these embryos could represent the XX male genotype, in which a portion of the Y-chromosome

translocated to the X-chromosome [39, 40]. Moreover, three of the six embryos were identified as having an additional X-chromosome. Monitoring translocation events was outside the scope of this research and was not determined. It is expected to have higher rates of sex chromosome-linked disorders among IVF treatments and women of advanced age [41, 42], which could explain our results. Nevertheless, our results are consistent with the CGH data, indicating that examining AMELX and AMELY to identify an embryo's sex is possible, before implantation.

We also examined the threshold cycle difference associated with two well-characterized trisomies. Interestingly, for either gene the expected cycle difference of 0.5 cycles was not achieved. For TTC3 the difference was 1.4 cycles and for RPL17 was 1.7 cycles. This suggests that the WGA step may not be amplifying the genome equally or evenly. Additionally the difference between normal and trisomic embryos could be due to copy number variation. Goodrich et al. demonstrated that varying levels of mosaicism could affect the detection of Trisomies 13, 15, and 18. Only high levels of mosaicism, ranging from 33% to 83%, allowed for reliable detection of the selected aneuploidies [43]. To address this issue, we plan to include multiple chromosome-specific targets in future studies. Nevertheless, the results show that for Trisomy 18 and Trisomy 21, the threshold cycle was less than the control, indicating an alternative mechanism for a quick and less expensive detection of genetic abnormalities.

Other factors that could lead to discordance between the experimental techniques and the CGH results are ADO or FA. Many technical issues are associated with WGA, from the type of cells used (blastomere versus trophoctoderm [7]), to the number of cells used for the WGA step [6], to the quantity and quality of DNA, all of which can impact ADO and FA rates. Other studies have shown that ADO rates for WGA based techniques range between 1.0 and 27.7% and can be as high as 50% [3–7]. Here, minimizing these technical issues, our ADO rate was 2.0% for AMELY (single copy gene), 5.2% for DYS14 (multiple copy genes), and 13.5% for SRY (single copy gene). On the contrary, ADO was not found among the control sample. The difference between the ADO rates for SRY and DYS14 suggests that multiple copy genes could decrease the ADO rate. However, AMELY, which is a single copy gene, had a lower ADO rate. This could be accounted by the greater effort to optimize AMEL detection for forensic sciences, even though the AMELY efficiency remains questionable. It could also be accounted by the different methods to detect SRY and DYS14 (qPCR melting curve analysis) and AMELY (Fluorescent Capillary Electrophoresis). Moreover, for the GSD index, both SRY and DYS14 were required to achieve a 98.8% probability that the embryo was male. For us, the DYS14 only embryos receive no classification in the clinical setting. None of the controls demonstrated FA for AMELY, SRY, or DYS14, whereas the embryos had FA rates of 6.3, 0.5, and 3.4%, respectively. Other studies have shown similar FA rates, ranging between 0.04 and 3.35% [4–6]. Lastly, the variation in the AMELX and AMELY peaks could be more explained by PCR efficiency or failure.

This study has a few limitations. First, we are basing the accuracy of our methods on the CGH microarray, which in itself has a conservative estimated error rate of 2–9% [44, 45]. According to our own data, our system has 3% error rate. It would be better to associate the results of the two assays with late-stage ultrasound or live births. However, due to the regulations in Mexico, in which single embryo transfers and selecting embryos based on their sex is only permitted under certain situations, this is unfeasible. Second, disagreements between the two methods and CGH microarray data could be due to rearrangements or mutations that alter primer efficiency. Third, the assays are solely qualitative and cannot distinguish between any sex chromosome disorders, such as Klinefelter's syndrome, Turner syndrome, Triple X, and XYY. We posit that qPCR could overcome this issue in a similar fashion as seen with detection of Trisomy 18 and Trisomy 21. To be certain of multiple chromosomes, we suggest the use of multiple targets; however, more studies are required.

5. Conclusion

Here, we demonstrate that an initial whole genome amplification step provided a sufficient amount of DNA to assess genetic abnormalities of an embryo by different PCR-based techniques: capillary electrophoresis, melting curve analysis, and differential qPCR. These techniques were applied before transfer of an embryo into the uterus during IVF, suggesting a practical use of qPCR with a WGA template for testing. This method provides an alternative to CGH microarray analysis, thus reducing cost and time.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to Azucena Ocampo Hugo Sierra and Paola Uribe for technical assistance with the biopsy and microarray processing and Paola Cerda for technical assistance. This study was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt-PEI 212650 and 231793 to Esther López-Bayghen). Elizabeth Schaeffer and Bruno López-Bayghen were recipients of Conacyt scholarships.

References

- [1] D. T. Baird, J. Collins, J. Egozcue et al., "Fertility and ageing," *Human Reproduction Update*, vol. 11, no. 3, pp. 261–276, 2005.
- [2] S. Mastenbroek, M. Twisk, J. van Echten-Arends et al., "In vitro fertilization with preimplantation genetic screening," *New England Journal of Medicine*, vol. 357, no. 1, pp. 9–17, 2007.
- [3] L.-J. Chang, C.-C. Huang, Y.-Y. Tsai et al., "Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases," *Human Reproduction*, vol. 28, no. 5, pp. 1435–1444, 2013.

- [4] Y. Hou, K. Wu, X. Shi et al., "Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing," *GigaScience*, vol. 4, no. 1, article no. 37, 2015.
- [5] C. Zong, S. Lu, A. R. Chapman, and X. S. Xie, "Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell," *Science*, vol. 338, no. 6114, pp. 1622–1626, 2012.
- [6] A. Lauri, G. Lazzari, C. Galli et al., "Assessment of MDA efficiency for genotyping using cloned embryo biopsies," *Genomics*, vol. 101, no. 1, pp. 24–29, 2013.
- [7] S. Rechitsky, T. Pakhalchuk, G. San Ramos, A. Goodman, Z. Zlatopolsky, and A. Kuliev, "First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for single-gene disorders, and/or preimplantation human leukocyte antigen typing, combined with 24-chromosome aneuploidy testing," *Fertility and Sterility*, vol. 103, no. 2, pp. 503–512, 2015.
- [8] R. Griffiths and B. Tiwari, "Primers for the differential amplification of the sex-determining region Y gene in a range of mammal species," *Molecular Ecology*, vol. 2, no. 6, pp. 405–406, 1993.
- [9] D. Pomp, B. A. Good, R. D. Geisert, C. J. Corbin, and A. J. Conley, "Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos," *Journal of animal science*, vol. 73, no. 5, pp. 1408–1415, 1995.
- [10] I. Hromadnikova, B. Houbova, D. Hridelova et al., "Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination," *Prenatal Diagnosis*, vol. 23, no. 3, pp. 235–238, 2003.
- [11] K. M. Finning and L. S. Chitty, "Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice," *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 69–75, 2008.
- [12] F. J. Fernández-Martínez, A. Galindo, A. García-Burguillo et al., "Noninvasive fetal sex determination in maternal plasma: a prospective feasibility study," *Genetics in Medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 101–106, 2012.
- [13] S. Ennis and T. F. Gallagher, "A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus," *Animal Genetics*, vol. 25, no. 6, pp. 425–427, 1994.
- [14] I. Pfeiffer and B. Brenig, "X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*)," *BMC Genetics*, vol. 6, article 16, 2005.
- [15] B. Shadrach, M. Commane, C. Hren, and I. Warshawsky, "A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification," *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 6, no. 4, pp. 401–405, 2004.
- [16] L. Sun, Z. Fan, X. Weng et al., "Rapid detection of Down's syndrome using quantitative real-time PCR (qPCR) targeting segmental duplications on chromosomes 21 and 11," *Gene*, vol. 552, no. 2, pp. 272–276, 2014.
- [17] X. D. Kong, N. Liu, X. J. Xu, Z. H. Zhao, and M. Jiang, "Screening of human chromosome 21 genes in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with Down syndrome," *Molecular Medicine Reports*, vol. 11, no. 2, pp. 1235–1239, 2015.
- [18] T. Tsujie, M. Takemura, T. Kimura et al., "Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction," *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, vol. 32, no. 4, pp. 368–372, 2006.
- [19] L. Cedillo, A. Ocampo-Bárceñas, I. Maldonado, F. J. Valdez-Morales, F. Camargo, and E. López-Bayghen, "A simple, less invasive stripper micropipetter-based technique for day 3 embryo biopsy," *Fertility Research and Practice*, vol. 2, no. 13, 2016.
- [20] E. Fragouli, S. Alfarawati, D. D. Daphnis et al., "Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation," *Human Reproduction*, vol. 26, no. 2, pp. 480–490, 2011.
- [21] E. Fragouli, M. Katz-Jaffe, S. Alfarawati et al., "Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure," *Fertility and Sterility*, vol. 94, no. 3, pp. 875–887, 2010.
- [22] K.-H. Cui, G. M. Warnes, R. Jeffrey, and C. D. Matthews, "Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification," *The Lancet*, vol. 343, no. 8889, pp. 79–82, 1994.
- [23] M. Zargari, M. R. Sadeghi, M. H. Shahhosseiny et al., "Fetal sex determination using non-invasive method of cell-free fetal dna in maternal plasma of pregnant women during 6th–10th weeks of gestation," *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, vol. 3, no. 4, pp. 201–206, 2011.
- [24] E. G. Blagodatskikh, A. G. Nikitin, I. A. Seregin, K. A. Blagodatskikh, and V. V. Nosikov, "The use of DYS14 marker for sex determination," *Molekuliarnaia Biologiya*, vol. 44, no. 4, pp. 646–649, 2010.
- [25] F. Pascual and L. Borque de Larrea, "Valoracion de una reaccion en cadena de la polimerasa cuantitativa y fluorescente (QF-PCR) para el diagnostico rapido de aneuploidias," *Revista del Laboratorio Clinico*, vol. 2, no. 4, pp. 169–177, 2009.
- [26] P. Chaturvedi, D. M. Gilkes, N. Takano, and G. L. Semenza, "Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 20, pp. E2120–E2129, 2014.
- [27] R. Szibor, S. Hering, and J. Edelmann, "A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online," *International Journal of Legal Medicine*, vol. 120, no. 4, pp. 252–254, 2006.
- [28] R. Thompson, S. Zoppis, and B. McCord, "An overview of DNA typing methods for human identification: past, present, and future," *Methods in Molecular Biology*, vol. 830, pp. 3–16, 2012.
- [29] T. Broquet and E. Petit, "Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics," *Molecular Ecology*, vol. 13, no. 11, pp. 3601–3608, 2004.
- [30] R. R. Jacob, R. Saxena, and I. C. Verma, "Noninvasive diagnosis of fetal gender: utility of combining DYS14 and SRY," *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, vol. 19, no. 9, pp. 505–511, 2015.
- [31] H. R. Khorram Khorshid, M. Zargari, M. R. Sadeghi, H. Edallatkah, M. H. Shahhosseiny, and K. Kamali, "Early fetal gender determination using real-time PCR analysis of cell-free fetal DNA during 6th–10th weeks of gestation," *Acta Medica Iranica*, vol. 51, no. 4, pp. 209–214, 2013.
- [32] A. Kolialexi, G. Tounta, P. Apostolou et al., "Early non-invasive detection of fetal Y chromosome sequences in maternal plasma using multiplex PCR," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 161, no. 1, pp. 34–37, 2012.
- [33] H. E. White, C. L. Dent, V. J. Hall, J. A. Crolla, and L. S. Chitty, "Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e45073, 2012.

- [34] J. S. Velarde-Félix, J. Salazar-Flores, G. Martínez-Cortés et al., "Deletion mapping and paternal origin of a Mexican AMELY negative male," *Legal Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 262–264, 2011.
- [35] K. Thangaraj, A. G. Reddy, and L. Singh, "Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis?" *International Journal of Legal Medicine*, vol. 116, no. 2, pp. 121–123, 2002.
- [36] Y. M. Chang, L. A. Burgoyne, and K. Both, "Higher failures of amelogenin sex test in an Indian population group," *Journal of Forensic Sciences*, vol. 48, no. 6, pp. 1309–1313, 2003.
- [37] R. Y. Yong, L. S. Gan, Y. M. Chang, and E. P. Yap, "Molecular characterization of a polymorphic 3-Mb deletion at chromosome Yp11.2 containing the AMELY locus in Singapore and Malaysia populations," *Human Genetics*, vol. 122, no. 3-4, pp. 237–249, 2007.
- [38] P. M. Stapleton, D. Lai, C. D. Millar, E. Wu, M. Andres, and D. R. Love, "Discovery of three related females who type XY at the amelogenin locus," *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, vol. 1, no. 1, pp. 577–579, 2008.
- [39] E. Margarit, A. Soler, A. Carrió et al., "Molecular, cytogenetic, and clinical characterisation of six XX males including one prenatal diagnosis," *Journal of Medical Genetics*, vol. 35, no. 9, pp. 727–730, 1998.
- [40] K. S. Reddy, "Clinical management of a rare de novo translocation 46,X,t(Y;15) (p11.2 approximately 11.3;q11.2).ish t(Y;15)(DYZ3+,AMELY+,SNRPN+,D15Z+) found prenatally," *Prenatal Diagnosis*, vol. 18, no. 3, pp. 294–297, 1998.
- [41] J. Wang and M. V. Sauer, "In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement," *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol. 2, no. 4, pp. 355–364, 2006.
- [42] L. Y. Pylyp, L. O. Spinenko, N. V. Verhoglyad, and V. D. Zukin, "Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 30, no. 5, pp. 729–732, 2013.
- [43] D. Goodrich, X. Tao, C. Bohrer et al., "A randomized and blinded comparison of qPCR and NGS-based detection of aneuploidy in a cell line mixture model of blastocyst biopsy mosaicism," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 33, no. 11, pp. 1473–1480, 2016.
- [44] C. Gutiérrez-Mateo, P. Colls, J. Sánchez-García et al., "Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos," *Fertility and Sterility*, vol. 95, no. 3, pp. 953–958, 2011.
- [45] S. Munné, "Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization," *Current Genomics*, vol. 13, no. 6, pp. 463–470, 2012.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<https://www.hindawi.com>



Aneuploidy rates inversely correlate with implantation during *in vitro* fertilization procedures: in favor of PGT

Elizabeth Schaeffer¹, Leonardo Porchia¹, Almena López-Luna^{1,2}, Dinorah Hernández Melchor^{1,2}, and Esther López-Bayghen^{1,2}

¹ Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular, Instituto de Infertilidad y Genética SC, INGENES, Ciudad de México, México

² Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN, Ciudad de México, México

*Address all correspondence to: ebayghen@cinvestav.mx

Abstract

Aneuploidy, the hold of an abnormal number of chromosomes that differs from the normal karyotype, is a recognized leading cause of miscarriage and birth defects. In human gametes and embryos, aneuploidy rates are prevalent, and these rates increase with advanced maternal age; additionally, it has been suggested that hormonal stimulation for achieving *in vitro* fertilization (IVF) protocols further increases aneuploidy rates. Although about 65% of chromosomally abnormal embryos culminate in spontaneous miscarriages, there is still evidence of live births harboring crucial aneuploidies. Furthermore, although some frequent aneuploidies are consistent, others differ between countries, making it harder to focus on a specific set of anomalies, but is important to focus regionally on those more prevalent. Preimplantation genetic testing (PGT) is a highly endorsed technique in assisted reproductive treatments to evaluate possible embryo aneuploidies, genetic defects, and congenital disorders. On this subject, this study shows that IVF aneuploidy rates in embryo-cohorts of high morphological quality are inversely associated with implantation rates. In its entirety, this study reinforces the utility of PGT for embryo evaluation.

Keywords: Aneuploidy, preimplantation genetic testing, embryo implantation, *in vitro* fertilization, karyotype.

1. Introduction

Aneuploidy is defined as a chromosome number that is not an exact multiple of the usually haploid number [1]. The terms haploid and diploid that describe single (n) and double (2n) chromosome sets in cells originate from the Greek terms *haplóos* meaning single and *diplóos* meaning double. The term ploidy was subsequently derived to describe the total chromosome content of cells. Consequently, the term euploid refers to a chromosome with an exact multiple of the haploid number [2]. Human body cells (somatic cells) are diploid, carrying two complete sets of chromosomes: one set of 23 chromosomes from their father and one set of 23 chromosomes from their mother, the two sets combined provide a full complement of 46 chromosomes. Human gametes (or sex cells) sperm and oocytes are haploid and contain only one set of 23 chromosomes.

Aneuploidies can occur either by chromosome gains (trisomies) and losses (monosomies) due to chromosome segregation errors, so-called “whole chromosomal” aneuploidy, or due to rearrangements of chromosomal parts, often accompanied by deletions, amplifications or translocations of large regions of the genome, that is referred to as a “structural” or “segmental” aneuploidy [3]. Whole chromosomal aneuploidies might arise due to random and sporadic chromosome missegregation events that occur with low frequency during any cell division. The missegregation levels range from 1/1000 to 1/10,000 in human cells [4].

Meiosis generates haploid gametes through a specialized cell division process that consists of one round of DNA replication followed by two cell divisions. The first division, or meiosis I (MI), involves the segregation of homologous chromosomes from each other, whereas meiosis II (MII) involves the segregation of the sister chromatids. Missegregation can also occur in germline cells, and the errors that arise in meiosis result in aneuploid embryos [5].

2. Incidence of aneuploidy

Errors in meiotic chromosome segregation frequently occur during oogenesis (~20%), especially during the first meiotic division, this incidence of meiotic errors in oocytes is more elevated in women with advanced maternal age and may be due to the prolonged time that oocytes spend arrested in meiosis I before ovulation [6]. However, some patterns of nondisjunction appear to be chromosome-specific, almost all cases of trisomy 16 are linked to errors at maternal MI, while MII errors are surprisingly common in trisomy 18. Opposite, in sperm the incidence of aneuploidy is only 2%. Another considerable percentage of errors (~20%) arise during the first mitosis after fertilization. Among clinically recognized spontaneous abortions (fetal deaths occurring between 6–8 weeks and 20 weeks gestation), the incidence increases to ~50% [7], the most common specific abnormalities are sex-chromosome monosomy (45,X), accounting for nearly 10% of all spontaneous abortions, and trisomies 16, 21 and 22, which together constitute 50% of all trisomies identified in spontaneous abortions. The incidence among stillbirths (fetal deaths occurring between ~20 weeks gestation and term) is ~4% with the types of abnormality being similar to those identified in newborns, ~0.3% of liveborn are aneuploid with the most common abnormalities being trisomies 21, 18, 13 and sex-chromosome trisomies 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY [5, 8].

2.1. Aneuploidies and live births

Although about 65% of chromosomally abnormal embryos culminate in spontaneous miscarriages, there is still evidence of live births harboring crucial aneuploidies. Table 1 describes cases that are well documented.

3. Impact of aneuploidy on the efficiency of ART

Assisted reproduction is a solution in many of the growing cases of infertile couples worldwide. A high rate of embryos produced *in vitro* present chromosomal aneuploidy (~50%), and such aneuploid embryos have reduced the potential for achieving a viable pregnancy. Such abnormalities are recognized as the leading cause of implantation failure and spontaneous miscarriage [60]. Among conceptions that survive to term, aneuploidy is the leading genetic cause of developmental disabilities and mental retardation [5]. Table 2 describes data from different infertility centers predominantly showing that aneuploidy rates are similar.

The relatively high aneuploidy rate observed in human embryos after an IVF/ICSI cycle has been attributed to the technique itself since this prevalence seems to be lower in natural conceptions [75]. Many hypotheses have been proposed that may explain these findings: (1) controlled ovarian stimulation treatments, (2) factors related to the ICSI technique and (3) lab conditions as embryo culture.

3.1. Ovarian stimulation and the incidence of embryo aneuploidy

To increase the number of oocytes that can be retrieved for IVF, gonadotrophins are commonly used for superovulation in humans. Exogenous administration of gonadotrophins results in higher concentrations of

steroids that may affect oocyte and embryo quality. Ovarian stimulation effects have been well characterized mainly in the murine model, and have shown that aggressive stimulation leads to a poorer embryo development potential that could increase the chromosomal abnormalities rate [76]. In humans, studies are scarce and less conclusive. A recent study in a population of young normovulatory women showed that a high ovarian response after controlled ovarian stimulation with moderate gonadotropin doses did not increase the embryo aneuploidy rate. Indeed, the higher the ovarian response, the more the euploid embryos obtained [77], the remaining question is whether this can also be extrapolated to infertile patients with good ovarian reserve.

3.2. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique and the incidence of embryo aneuploidy

ICSI has become critical for the treatment of severe male infertility. The principal feature of ICSI is the direct injection of spermatozoa into an oocyte, which facilitates the production of fertilized embryos regardless of semen characteristics, such as sperm concentration and motility. However, the chromosomal integrity of ICSI zygotes is degraded compared to zygotes obtained from an *in vitro* fertilization [78, 79]. During the ICSI procedure, a sperm pretreatment is performed to mimic the conditions of natural fertilization and support the progression of fertilization effects. Studies on mouse models revealed that the chromosomal integrity of zygotes derived from ICSI without any pretreatment of spermatozoa was impaired in comparison with zygotes derived of conventional IVF [80], even the culture sperm conditions may affect the chromosomal stability of the embryo [81]. Chromosomal damage may occur due to the injection of non-capacitated, acrosome-intact spermatozoa, so to reduce the risk of chromosomal aberrations during the ICSI procedure, it is crucial that sperm capacitation and the acrosome reaction be appropriately artificially induced in the proper medium before use [82].

4. Embryo culture and the incidence of embryo aneuploidy

Fertilization and embryo development *in vitro* have the potential to introduce (often inadvertently) stress which cannot only impair embryo development in the laboratory, but also have down-stream effects after transfer.

In vivo, the developing preimplantation embryo is exposed to gradients of nutrients, hormones, cytokines and growth factors as it progresses through the fallopian tube to the uterus. Within the lumen of the female tract, the embryo resides in a few hundred nanoliters of a complex viscous fluid characterized by high levels of mucins, albumin, and glycosaminoglycans and by reduced levels of oxygen (typically 2–8%). The embryo is in constant motion, moved by gentle ciliated and muscular action of the female tract [83]. This scenario is in stark contrast to the laboratory environment, where typically gametes and embryos are exposed to relatively large volumes of culture medium, remain static during culture, while resting on a polystyrene substrate, and create unstirred layers where the end products of metabolism concentrate and nutrients become limiting [84].

Embryos are sensitive to both chemical and physical signals within their microenvironment. Factors within the laboratory as oxygen level, ammonium released from amino acids into the culture, poor laboratory air quality, temperature and pH, oil overlay, embryo culture volume/density, the static nature of culture, light or even mechanical factors as pipetting, can negatively impact gametes and embryos and generate stress. When more than one stress factor is present in the laboratory, more negative synergies can result, and these factors play a significant role in influencing the development and events post transfer [85]. For example, recent studies have reported that a decrease in temperature has the potential to affect the stability of the oocyte's meiotic spindle, reducing fertilization rates, delaying embryo development and decreasing clinical pregnancy rates [86]. However, more studies are needed to demonstrate the impact of embryo culture on aneuploidy rates.

5. Aneuploidy detection: techniques for PGT

PGT is the genetic diagnosis analysis performed to identify euploid embryos before uterine transfer [87]. PGT determines the numeric chromosomal constitution of a cellular biopsy sample obtained from a cultured embryo to determine its competence [88, 89].

PGT was first described in 1990 by Handyside *et al.* [90] when the sex of the six- to eight-cell stage embryos from two couples with a known risk of transmitting X-linked diseases was assessed by DNA amplification of a Y chromosome-specific repeat sequence. The earliest PGT studies in the 2000's were based on the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique where 3 to 12 chromosomes can be analyzed on cleavage stage or polar body biopsies [87]. Those studies had disappointing results in clinical practice since it had no beneficial effect on live birth rate after IVF [91]. The major drawback of FISH-based PGT is the limited number of chromosomes that can be analyzed considering that aneuploidy can affect any of the 22 autosomes and both sex chromosomes [92]; consequently, there have been dramatic improvements in PGT technology to make it valuable for clinical practice.

Nowadays, several methodologies for 24-chromosome analysis are available for clinical use that aim to increase implantation rates and decrease miscarriage rates associated with IVF [87]: microarray comparative genomic hybridization (mCGH), single-nucleotide polymorphism (SNP) microarray, real-time polymerase chain reaction (qPCR), and next-generation sequencing (NGS) [93, 94]. This review will focus on relevant aspects of the PGT techniques used in our laboratory.

5.1. Microarray comparative genomic hybridization (mCGH)

mCGH is a ratio labeling protocol to compare the DNA product of a clinical sample to a healthy control. For PGT, biopsied embryonic cells must be lysed to extract sample's DNA, which will be further amplified by a protocol that provides whole genome coverage [87, 92, 95]. The resulting DNA products are co-hybridized with a standard DNA control sample (46,XY and 46,XX) with a series of site-specific fluorophores on a microarray chip with approximately 4000 markers spaced throughout the genome [87]. Then, a confocal laser platform detects the relative color intensity, and a bioinformatic compares the intensity of each fluorophore in the sample versus the control to identify any bias and determine the ploidy status of the sample [87, 92, 95].

The mCGH analysis reports the ratio of sample DNA to a reference DNA, as a chromosomal profile where the molecular karyotype is represented. Usually, the sample DNA is labeled with a green fluorescent dye, while the reference DNA sample is tagged red [96]. Thus, diploid embryos will have a relatively equal ratio of green-to-red fluorescence in every pair of chromosomes, represented as a continuous horizontal plot line. A monosomy will be represented as a clear downward deviation in the plotted line, indicating a relative lack of green-to-red signal intensity; contrary, a trisomy will be displayed as an upward deviation in the plotted line due to a relative increase in the green-to-red signal intensity.

The specificity rate of mCGH-based PGT is about 99% [87]. The test results can be available within 12 to 15 hours, considering that the entire analysis can be performed during this short timeframe [87, 88]. Additionally, brand-specific features are offered by each manufacturer; Table 3 highlights the commercially available kits for mCGH-based PGT.

mCGH entails some disadvantages: first, the embryo sample requires a previous whole genome amplification (WGA) process to support single-cell diagnostics by mCGH [92], raising the possibility of introducing errors during the amplification [88]; second, mCGH is a semiquantitative technique that only reports the ratio of sample DNA to a reference DNA; it is to say that only imbalances in DNA content can be identified. Therefore, mCGH is unable to detect uniparental disomy or triploid embryos as it cannot discriminate between 46,XX from 69,XXX, or 46,XY from 69,XXY [87, 88, 92]. Last, the mCGH used for PGS cannot identify structural chromosome aberrations or diagnose mosaicism in a trophectoderm sample [87].

5.2. Next-generation sequencing (NGS)

NGS refers to the emerging technology of non-Sanger-based DNA sequencing that allows to sequence in parallel millions of DNA strands with high throughput yield. In the field of ART, this powerful tool is being applied for PGT to replace cytogenetic microarrays [95, 98].

Different platforms are commercially available for NGS with different technological approaches. Illumina's MiSeq NGS platform applies a sequencing-by-synthesis method, where DNA is attached and amplified *in situ* to be subsequently used as template for synthetic sequencing with fluorescent labeled reversible-terminator nucleotides [101]. Ion Torrent NGS technology, commercialized by ThermoFisher Scientific, is based on collecting data by sensing the hydrogen ions that are released as byproducts when nucleotides are incorporated by a template-directed DNA polymerase synthesis on an ion chip [102].

Despite the dissimilarities between platforms, the common basis of chromosome copy number analysis by NGS is the fragmentation of the amplified DNA sample into small segments of 100 to 200 base-pairs that are further sequenced in parallel until the number of reads covering a determined position in the genome is attained, in general, a 30x coverage (sequencing each base-pair 30 times) ensures sufficient accuracy. The sequence data obtained are then compared with a reference genome and counted by a bioinformatic software. The copy number of a specific chromosome should be proportional to the number of counted sequences; therefore, an increase or reduction in the number of reads will respectively represent a trisomy or a monosomy [94, 96].

NGS allows to simultaneously perform both qualitative and quantitative analyses of multiple embryos with high-resolution data for chromosomal analysis [93, 94]. The greater sensitivity and precision offered by NGS [93, 103, 104] makes possible to exclude embryos with mosaicism [103, 104] and partial aneuploidies or triploidies [104], improving pregnancy outcomes due to its enhanced capability for detecting those challenging abnormalities.

PGT by NGS is able to predict not only chromosome copy number for the diagnosis of whole chromosome aneuploidy with 99.98% assignment consistency [94], but also single-gene disorders [105], abnormalities of the mitochondrial genome [106], and segmental chromosome imbalances [94, 96]. Balanced chromosomal rearrangements cannot be detected by NGS [94].

The increasing demand and accelerated development are continuously reducing the cost of NGS technology [107]. Also, potential cost-benefit ratios can be achieved when the full sequencing capacity of the apparatus is exploited [93, 94, 96]. Furthermore, molecular tools, like barcoding, are being implemented to allow multiplex high-throughput sequencing [108] this promising strategy will reduce the diagnosis' cost per patient by performing simultaneous analysis of multiple embryos from different patients [94].

6. Aneuploidy and women age

In our study, by analyzing the mCGH data, the total number of aneuploidies was found to be 734, and from these, 641 (87.3%) were derived from patients and 93 (12.7%) from donors. Overall, this study displayed similar rates of monosomies, trisomies, double aneuploidies and multiple aneuploidies. The total number of monosomies (191) was like the number of trisomies (194), accounting for 26 and 26.4% of the total aneuploidies, correspondingly. Furthermore, the total number of double (165) and multiple (184) aneuploidies was also very similar, accounting for 22.5 and 25.1% of the total aneuploidies, correspondingly. Nevertheless, it is worth noticing that when considering only the donor group, monosomies seem to be more prevalent: 38.7% of the total donors' aneuploidies were monosomies vs. 24.7% of trisomies, 16.1% of double aneuploidies, and 20.4% of multiple aneuploidies; what is more, the percentage of monosomies in the donor group is higher than that of the monosomies of the patient group (38.7 vs. 24.3%). The most common monosomies affected chromosomes were 15, 22 and 16, whereas the most common trisomies affected chromosomes 16, 19, and 21.

It has been shown that the lowest risk for embryonic aneuploidy is between ages 26 to 30, with aneuploidy rates steadily increasing with maternal age after 26 years of age [109] and leaping significantly from the age

of 39 [110]. For this reason, women of advanced maternal age are encouraged to favor oocyte donation to yield high-quality viable embryos.

Interestingly, some studies have identified that women of younger ages possess an increased prevalence of aneuploidy, with >40% of aneuploidy in women of 23 years and under [109] and 58% of aneuploidy in women of <31 years of age. In the current study, both the donor (≤ 29 years) and the patient group of ≤ 29 years displayed high aneuploid rates, 28.5 and 27.4% respectively (Table 4). Given the high rates of aneuploidy in younger women, attention should be paid in detecting aneuploidy in embryos from women of young maternal age, especially since this group of patients is not routinely encouraged to perform a PGT. Still, whether there is a difference between the distribution of aneuploidies between donors and patients remains uncertain. In this study, it was determined that, except for chromosome 7 that possesses a lower aneuploidy frequency in the donor group, there was no significant difference of aneuploidy frequency between the donor and its comparable patient age group (≤ 29 years) (Table 5).

In our population, the most commonly affected chromosomes were chromosomes 16, 21, 22, 19, 15, 20, and X (Table 5). Furthermore, it was determined that chromosomes 9, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, and 22 are prone to suffer a copy loss, resulting in a monosomy; whereas chromosomes 1, 3, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 20, 21, and 22 are more likely to show a copy gain, resulting in a trisomy (Table 5).

When stratifying our analysis in age groups (a: ≤ 29 , b: 30-34, c: 35-37, d: 38-40, e: 41-43, and f: ≥ 44 years of age), a visible continuous increase in aneuploidy rate can be observed as maternal age increases (Table 6), furthermore, this increase in aneuploidy goes hand in hand with a continuous decrease in pregnancy rates as age increases, excepting the 41-43 age group which yielded a higher pregnancy rate (55.17%), however, it is worth noticing this group also presented a high pregnancy loss rate (31.25%) (Table 6).

7. Remarks

One of the most critical reasons for unsuccessful IVF procedures is implantation failure due to aneuploid embryos. Aneuploidies are the major cause of perinatal death and genetic abnormalities; consequently, the detection of chromosomal disorders constitutes the most frequent indication for PGT. Here, we report on the aneuploidy rates found in IVF procedures in Mexico. Moreover, we show that the level of aneuploidy among high morphological quality embryos is still an important issue to be faced in everyday ART practice, and this evidence works in favor of continuing to use PGT analysis.

Abbreviations

| | |
|-------|--|
| ANOVA | Analysis of variance |
| ART | Assisted reproductive techniques |
| Chr | Chromosome |
| FISH | Fluorescence <i>in situ</i> hybridization |
| ICSI | Intracytoplasmic sperm injection |
| IVF | <i>In vitro</i> fertilization |
| mCHG | Microarray comparative genomic hybridization |
| MI | Meiosis I |
| MII | Meiosis II |
| NGS | Next-generation sequencing |
| OR | Odds ratio |

| | |
|-------|-------------------------------------|
| PGT | Preimplantation genetic testing |
| qPCR | Real-time polymerase chain reaction |
| SNP | Single-nucleotide polymorphism |
| WGA | Whole genome amplification |
| β-hCG | Beta human chorionic gonadotropin |

References

1. Torres, E.M., B.R. Williams, and A. Amon, *Aneuploidy: cells losing their balance*. Genetics, 2008. **179**(2): p. 737-46.
2. Orr, B., K.M. Godek, and D. Compton, *Aneuploidy*. Curr Biol, 2015. **25**(13): p. R538-42.
3. Storchova, Z., *The Causes and Consequences of Aneuploidy in Eukaryotic Cells, Aneuploidy in Health and Disease*. 2012.
4. Hassold, T., H. Hall, and P. Hunt, *The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No. 2**: p. R203-8.
5. Hassold, T. and P. Hunt, *To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(4): p. 280-91.
6. Battaglia, D.E., et al., *Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women*. Hum Reprod, 1996. **11**(10): p. 2217-22.
7. Kim, J.W., et al., *Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 153.
8. Hassold, T., et al., *Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology*. Environ Mol Mutagen, 1996. **28**(3): p. 167-75.
9. Kulikowski, L.D., et al., *Pure duplication 1q41-qter: further delineation of trisomy 1q syndromes*. Am J Med Genet A, 2008. **146A**(20): p. 2663-7.
10. Campos, T.C.a.F., Puntero B., *Trisomía parcial 1q por translocación materna*. An Esp Pediatr, 2000. **52**: p. 178-184.
11. Rasmussen, S.A., et al., *Partial duplication 1q: report of four patients and review of the literature*. Am J Med Genet, 1990. **36**(2): p. 137-43.
12. Acosta Sabatés, M.M.H.G., Iván; García Martínez, Débora A.; and Lavaut Sánchez, Kalia., *Duplication 2 q 2.1- q 3.1: a case report*. Rev Cubana Pediatr, 2008. **80**(1).
13. Sebold, C.D., et al., *Partial trisomy 2q: report of a patient with dup (2)(q33.1q35)*. Am J Med Genet A, 2005. **134A**(1): p. 80-3.
14. Schumacher, R.E., A.P. Rocchini, and G.N. Wilson, *Partial trisomy 2q*. Clin Genet, 1983. **23**(3): p. 191-4.
15. Dworschak, G.C., et al., *Comprehensive review of the duplication 3q syndrome and report of a patient with Currarino syndrome and de novo duplication 3q26.32-q27.2*. Clin Genet, 2017. **91**(5): p. 661-671.
16. Natera-de Benito, D., et al., *A patient with a duplication of chromosome 3p (p24.1p26.2): a comparison with other partial 3p trisomies*. Am J Med Genet A, 2014. **164A**(2): p. 548-50.
17. Charrow, J., M.M. Cohen, and D. Meeker, *Duplication 3p syndrome: report of a new case and review of the literature*. Am J Med Genet, 1981. **8**(4): p. 431-6.
18. Varley, J., T. Wehner, and S. Sisodiya, *Diaphragm myoclonus followed by generalised atonia in a patient with trisomy 4p: unusual semiology in an unusual condition*. Epileptic Disord, 2015. **17**(4): p. 473-7.
19. Collia, A., et al., *[Partial duplication of chromosome 4 in a patient with bilateral ocular coloboma]*. Arch Argent Pediatr, 2012. **110**(4): p. e59-62.
20. Celle, L., et al., *Duplication of chromosome region 4q28.3-qter in monozygotic twins with discordant phenotypes*. Am J Med Genet, 2000. **94**(2): p. 125-40.
21. Velagaleti, G.V., D.L. Morgan, and V.S. Tonk, *Trisomy 5p. A case report and review*. Ann Genet, 2000. **43**(3-4): p. 143-5.

22. Fujita, M., et al., *A new case of "complete" trisomy 5p with isochromosome 5p associated with a de novo translocation t(5;8)(q11;p23)*. Clin Genet, 1994. **45**(6): p. 305-7.
23. Orye, E., Y. Benoit, and B. van Mele, *Complete trisomy 5p owing to de novo translocation t(5;22)(q11;p11) with isochromosome 5p associated with a familial pericentric inversion of chromosome 2, inv 2(p21q11)*. J Med Genet, 1983. **20**(5): p. 394-6.
24. Sivasankaran, A., et al., *De-novo 'pure' partial trisomy (6)(p22.3-->pter): a case report and review of the literature*. Clin Dysmorphol, 2017. **26**(1): p. 26-32.
25. Savarese, M., et al., *Familial trisomy 6p in mother and daughter*. Am J Med Genet A, 2013. **161A**(7): p. 1675-81.
26. Zelante, L., et al., *Interstitial "de novo" tandem duplication of 7(q31.1-q35): first reported case*. Ann Genet, 2003. **46**(1): p. 49-52.
27. Alfonsi, M., et al., *A new case of pure partial 7q duplication*. Cytogenet Genome Res, 2012. **136**(1): p. 1-5.
28. Cecilia Mellado, R.M., Fermina López, Patricia Sanz, Silvia Castillo, Cecilia Villaseca, Vera Daher, Lorena Tobella and Samuel Salazar, *Trisomia 8: reporte de cuatro casos*. Rev. Chil. Pediatr, 1997. **53**(2): p. 93-98.
29. Brambila-Tapia, A.J., et al., *Pure 9p trisomy derived from a terminal balanced unreciprocal translocation*. Genet Couns, 2014. **25**(3): p. 289-97.
30. Arnold, G.L., et al., *Trisomy 9: review and report of two new cases*. Am J Med Genet, 1995. **56**(3): p. 252-7.
31. Wong, S.L., et al., *Distal 10q trisomy with copy number gain in chromosome region 10q23.1-10q25.1: the Wnt signaling pathway is the most pertinent to the gene content in the region of copy number gain: a case report*. BMC Res Notes, 2015. **8**: p. 250.
32. Manolakos, E., et al., *Proximal 10q duplication in a child with severe central hypotonia characterized by array-comparative genomic hybridization: A case report and review of the literature*. Exp Ther Med, 2014. **7**(4): p. 953-957.
33. Utine, G.E., et al., *Partial trisomy 11q syndrome (11q23.1-->11qter) due to de novo t(11q; 13q) detected by multicolor fluorescence in situ hybridisation*. Genet Couns, 2005. **16**(3): p. 291-5.
34. Pihko, H., E. Therman, and I.A. Uchida, *Partial 11q trisomy syndrome*. Hum Genet, 1981. **58**(2): p. 129-34.
35. Geckinli, B.B., et al., *CLINICAL REPORT OF A PATIENT WITH DE NOVO TRISOMY 12q23.1q24.33*. Genet Couns, 2015. **26**(4): p. 393-400.
36. Oka, N., et al., *Norwood Procedure Performed on a Patient With Trisomy 13*. Int Heart J, 2016. **57**(1): p. 121-2.
37. Tunca, Y., J.S. Kadandale, and E.K. Pivnick, *Long-term survival in Patau syndrome*. Clin Dysmorphol, 2001. **10**(2): p. 149-50.
38. Lu, H.T. and X.H. Han, *[One case report of Patau syndrome]*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2011. **49**(7): p. 555-6.
39. Dutta, U.R., V.K. Pidugu, and A. Dalal, *Partial proximal trisomy 14: identification and molecular characterization in a girl with global developmental delay*. Genet Couns, 2013. **24**(2): p. 207-16.
40. Lacro, R.V., et al., *Duplication of distal 15q: report of five new cases from two different translocation kindreds*. Am J Med Genet, 1987. **26**(3): p. 719-28.
41. Schnatterly, P., et al., *Distal 15q trisomy: phenotypic comparison of nine cases in an extended family*. Am J Hum Genet, 1984. **36**(2): p. 444-51.
42. Laus, A.C., et al., *Karyotype/phenotype correlation in partial trisomies of the long arm of chromosome 16: case report and review of literature*. Am J Med Genet A, 2012. **158A**(4): p. 821-7.
43. Aviña Fierro J.A., R.B.E.a.H.A.D.A., *Trisomía 16 completa. Reporte de un caso clínico*. Revista Mexicana de Pediatría, 2005. **72**(5): p. 237-239.
44. Ho, A.C., et al., *A newborn with a 790 kb chromosome 17p13.3 microduplication presenting with aortic stenosis, microcephaly and dysmorphic facial features - is cardiac assessment necessary for all patients with 17p13.3 microduplication?* Eur J Med Genet, 2012. **55**(12): p. 758-62.

45. Belligni, E.F., et al., *790 Kb microduplication in chromosome band 17p13.1 associated with intellectual disability, afebrile seizures, dysmorphic features, diabetes, and hypothyroidism*. Eur J Med Genet, 2012. **55**(3): p. 222-4.
46. Saldarriaga, W., H. Rengifo-Miranda, and J. Ramirez-Cheyne, [*Trisomy 18 syndrome: A case report*]. Rev Chil Pediatr, 2016. **87**(2): p. 129-36.
47. Zellweger, H., K. Beck, and C.E. Hawtrey, *Trisomy 18. Report of a Case and Discussion of the Syndrome*. Arch Intern Med, 1964. **113**: p. 598-605.
48. Bharucha, B.A., et al., *Trisomy 18: Edward's syndrome (a case report of 3 cases)*. J Postgrad Med, 1983. **29**(2): p. 129-32.
49. Jung, S.I., et al., *Two cases of trisomy 19 as a sole chromosomal abnormality in myeloid disorders*. Korean J Lab Med, 2008. **28**(3): p. 174-8.
50. Humphries, J.E. and M.S. Wheby, *Trisomy 19 in a patient with myelodysplastic syndrome and thrombocytosis*. Cancer Genet Cytogenet, 1990. **44**(2): p. 187-91.
51. Avila, M., et al., *Delineation of a new chromosome 20q11.2 duplication syndrome including the ASXL1 gene*. Am J Med Genet A, 2013. **161A**(7): p. 1594-8.
52. Sidwell, R.U., et al., *Pure trisomy 20p resulting from isochromosome formation and whole arm translocation*. J Med Genet, 2000. **37**(6): p. 454-8.
53. Hayes, S.A., et al., *Cardiovascular and general health status of adults with Trisomy 21*. Int J Cardiol, 2017. **241**: p. 173-176.
54. He, X., D. Yao, and Z.Y. Zhao, [*Trisomy 22 syndreom: a report of 2 cases*]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2015. **17**(5): p. 524-5.
55. Heinrich, T., et al., *Live-born trisomy 22: patient report and review*. Mol Syndromol, 2013. **3**(6): p. 262-9.
56. Petersen, M.B., M. Hansen, and B.W. Djernes, *Full trisomy 22 in a newborn infant*. Ann Genet, 1987. **30**(2): p. 101-4.
57. Ciaccio, C., et al., *Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses*. Ital J Pediatr, 2017. **43**(1): p. 39.
58. Vazquez Gonzalez, B., [*Turner syndrome; case report*]. Ginecol Obstet Mex, 1958. **13**(2): p. 103-10.
59. Song, Y., et al., [*Morphology and pathogenesis of 47, XYY/47, XY, +mar identified in patients with super male syndrome*]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2015. **32**(3): p. 378-80.
60. Lathi, R.B., L.M. Westphal, and A.A. Milki, *Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplanation genetic diagnosis*. Fertil Steril, 2008. **89**(2): p. 353-7.
61. Majumdar, G., et al., *Preimplantation genetic screening for all 24 chromosomes by microarray comparative genomic hybridization significantly increases implantation rates and clinical pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization with poor prognosis*. J Hum Reprod Sci, 2016. **9**(2): p. 94-100.
62. Chung, M.K., et al., *Comprehensive chromosome analysis of blastocysts before implantation using array CGH*. Mol Cytogenet, 2013. **6**(1): p. 22.
63. Fragouli, E., et al., *Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation*. Hum Reprod, 2011. **26**(2): p. 480-90.
64. Wells, D. and J.D. Delhanty, *Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(11): p. 1055-62.
65. Harton, G.L., et al., *Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization*. Fertil Steril, 2013. **100**(6): p. 1695-703.
66. Gutierrez-Mateo, C., et al., *Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos*. Fertil Steril, 2011. **95**(3): p. 953-8.
67. Rabinowitz, M., et al., *Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres*. Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 395-401.
68. Fiorentino, F., et al., *Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles*. Hum Reprod, 2014. **29**(12): p. 2802-13.
69. Sánchez-Usabiaga RA, G.-B.J., Vera-Aguado MG, Ramírez EG, Durand-Montaña C., *Incidence and parental origin of aneuploidies in blastocysts: comparison between two centers of assisted reproduction in Mexico*. Ginecol Obstet Mex, 2017. **85**(5): p. 289-297.

70. López-Rioja MJ, A.-R.M., Sánchez-González CM, Recio-López , Zavala-González PN, García-Sánchez R, Chávez-Badiola A, *Preimplantation genetic testing for aneuploidies PGT-A: Results of the transition between different technologies.* Ginecol Obstet Mex, 2018. **86**(2): p. 96-107.
71. Franasiak, J.M., et al., *Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophoctoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure.* J Assist Reprod Genet, 2014. **31**(11): p. 1501-9.
72. Fragouli, E., et al., *The origin and impact of embryonic aneuploidy.* Hum Genet, 2013. **132**(9): p. 1001-13.
73. Capalbo, A., et al., *Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development.* Hum Reprod, 2013. **28**(2): p. 509-18.
74. Fragouli, E., et al., *Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure.* Fertil Steril, 2010. **94**(3): p. 875-87.
75. Simon, C., et al., *Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage.* Reprod Fertil Dev, 1998. **10**(1): p. 87-92.
76. Elbling, L. and M. Colot, *Abnormal development and transport and increased sister-chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice.* Mutat Res, 1985. **147**(4): p. 189-95.
77. Labarta, E., et al., *A Higher Ovarian Response after Stimulation for IVF Is Related to a Higher Number of Euploid Embryos.* Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 5637923.
78. In't Veld, P.A., et al., *Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa.* Hum Reprod, 1997. **12**(4): p. 752-4.
79. Macas, E., B. Imthurn, and P.J. Keller, *Increased incidence of numerical chromosome abnormalities in spermatozoa injected into human oocytes by ICSI.* Hum Reprod, 2001. **16**(1): p. 115-120.
80. Tateno, H., *Possible causal factors of structural chromosome aberrations in intracytoplasmic sperm injection of the mouse.* Reprod Med Biol, 2009. **8**(3): p. 89-95.
81. Tateno, H. and Y. Kamiguchi, *Evaluation of chromosomal risk following intracytoplasmic sperm injection in the mouse.* Biol Reprod, 2007. **77**(2): p. 336-42.
82. Watanabe, H., *Risk of chromosomal aberration in spermatozoa during intracytoplasmic sperm injection.* J Reprod Dev, 2018.
83. Gardner, D.K., et al., *Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells.* Fertil Steril, 1996. **65**(2): p. 349-53.
84. Gardner, D.K. and M. Lane, *Culture of viable mammalian embryos.* Principles of Cloning, 2014: p. 63-84.
85. Wale, P.L. and D.K. Gardner, *The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction.* Hum Reprod Update, 2016. **22**(1): p. 2-22.
86. Wang, W.H., et al., *Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy.* Hum Reprod, 2001. **16**(11): p. 2374-8.
87. Brezina, P.R., R. Anchan, and W.G. Kearns, *Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences?* J Assist Reprod Genet, 2016. **33**(7): p. 823-32.
88. Brezina, P.R. and W.H. Kutteh, *Clinical applications of preimplantation genetic testing.* BMJ, 2015. **350**: p. g7611.
89. Brezina, P.R., D.S. Brezina, and W.G. Kearns, *Preimplantation genetic testing.* BMJ, 2012. **345**: p. e5908.
90. Handyside, A.H., et al., *Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification.* Nature, 1990. **344**(6268): p. 768-70.
91. Mastenbroek, S., et al., *Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs.* Hum Reprod Update, 2011. **17**(4): p. 454-66.
92. Kaser, D.J. and E.S. Ginsburg, *Embryo biopsy for aneuploidy detection in the general infertility population.* Semin Reprod Med, 2014. **32**(2): p. 100-6.
93. Imudia, A.N. and S. Plosker, *The Past, Present, and Future of Preimplantation Genetic Testing.* Clin Lab Med, 2016. **36**(2): p. 385-99.
94. Fiorentino, F., et al., *Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos.* Fertil Steril, 2014. **101**(5): p. 1375-82.

95. Kurahashi, H., et al., *Preimplantation genetic diagnosis/screening by comprehensive molecular testing*. *Reprod Med Biol*, 2016. **15**(1): p. 13-19.
96. Sermon, K., *Novel technologies emerging for preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic testing for aneuploidy*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(1): p. 71-82.
97. Agilent. *GenetiSure Pre-Screen Kit Details & Specifications*. Available from: <https://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=8100002>.
98. Illumina. *24sure PGS Microarray*. Available from: https://support.illumina.com/array/array_kits/24sure-pgs-microarray-kit.html.
99. PerkinElmer. *KaryoLite BoBs Kit*. Available from: <http://www.perkinelmer.com/product/karyolite-bobs-4501-0010>.
100. RHS. *EmbryoCollect*. Available from: <http://www.rhsc.com.au/our-products/embryocollect/>.
101. Bentley, D.R., et al., *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. *Nature*, 2008. **456**(7218): p. 53-9.
102. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 348-52.
103. Fragouli, E., *Next generation sequencing for preimplantation genetic testing for aneuploidy: friend or foe?* *Fertil Steril*, 2018. **109**(4): p. 606-607.
104. Friedenthal, J., et al., *Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles*. *Fertil Steril*, 2018. **109**(4): p. 627-632.
105. Treff, N.R., et al., *Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease*. *Fertil Steril*, 2013. **99**(5): p. 1377-1384 e6.
106. Fragouli, E., et al., *Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential*. *PLoS Genet*, 2015. **11**(6): p. e1005241.
107. Yin, X., et al., *Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts*. *Biol Reprod*, 2013. **88**(3): p. 69.
108. Knapp, M., M. Stiller, and M. Meyer, *Generating barcoded libraries for multiplex high-throughput sequencing*. *Methods Mol Biol*, 2012. **840**: p. 155-70.
109. Franasiak, J.M., et al., *The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening*. *Fertil Steril*, 2014. **101**(3): p. 656-663 e1.
110. Lukaszuk, K., et al., *Next generation sequencing for preimplantation genetic testing of blastocysts aneuploidies in women of different ages*. *Ann Agric Environ Med*, 2016. **23**(1): p. 163-6.

ANEXO 2. TABLA DE COMPARACION DE T°M TEORICAS Y T°M REALES DE TODOS LOS AMPLICONES UTILIZADOS PARA LA GENOTIPIFICACIÓN

| Marcador | Tamaño del amplicón | Tm teórica | Tm obtenida por qRT-PCR |
|--------------|---------------------|------------|-------------------------|
| GAPDH | 363pb | 86.2° | 83.2° |
| SRY | 247pb | 82.6° | 83.05° |
| DYS14 | 147pb | 82.9° | 83.05° |
| TTC3 | 141pb | 80.8° | 82.4° |
| RPL17 | 236pb | 78.53° | 78.9° |
| HSDB | 206pb | 80.9° | 81.7° |
| SRY02 | 146pb | 84° | 84.2° |

*Las T°m teóricas de cada amplicón fueron calculadas con el software OligoCalc

ANEXO 3. SECUENCIAS TEORICAS DE LOS AMPLICONES
GENERADOS POR PCR DE TODOS LOS MARCADORES

| Marca dor | Secuencia |
|-----------|---|
| GAPDH | TCACATCCATCAGAAACCTG GGGACGTTAGCAGCTGGGGCAGAGATGATGGCCCTTTTGGC TCCCTCTGAAAGCAAGCCCCAACCTTCTCCATGGTAGTGAAGACACTGATGGACTCCACAAT GTACTCAGTGCCAGTATCGCCCTATTTGATTTTGGTAGGATCTAGCTTTCCATTAATGACAAGC TTCCATTCTCAGCCTTGACAGTGCCATGGAATTCGCCATGGGTGGAATCATACTGGAACATG TAGGCCTTGTAGTTGAGCTAAATGAAGGGGTCATCGATGGCGA TAATATCCACTTTACCAGA GTAAA |
| SRY | GCTGGGATACCAGTGGAAAA TGCTTACTGAAGCCGAAAAATGGCCATTCTTCCAGGAGGCAC AGAAATTACAGGCCATGCACAGAGAGAAATACCCGAATTATAAGTATCGACCTCGTCGGAAG GCGAAGATGCTGCCGAAGAATTGCAGTTTCTCCCGCAGATCCCGCTTCGGTACTCTGCAG CGAAGTGCAACTGGACAACAGGTTGTACAGGGATGACTGTA CGAAAGCCACACTCAAGA |
| DYS14 | CATCCAGAGCGTCCTGG CTTCTGGGCCAATGTTGTATCCTTCTCAGTGTTTCTTCGGCCTTT CTAGTGGAGAGGTGCTCTCGGGGAAGTGTAAGTGACCGATGGGCAGCTCGGCCTCGATGTG ACT TTTGGGAACAAGGGGA |
| HSDB | AAAGTTCTCTACAGTCAACCCA GTCTATGTTGGCAACGTGGCCTGGGCCACATTCTGGCCT TGAGGGCTCTGCGGGACCCCAAGAAGGCCCAAGTGTCCGAGGTCAATTCTATTACATCTCA GATGACACGCCTACCAAAGCTATGATAACCTTAATTACATCCTGAGCAAAGAGTTTGGCCTC CGCCTTGATTCCAGATGGAGCCTTCTTTAACC CTGATGTAAGTGGCTTC |
| RPL17 | TGGAGGACTTCAGCTTATTCTG GAGGCAGGAAACCTAGTCGTTAAGGACTAAGGGGGAAAAA TACTTAAATGGTAGAAATCAACAGAACCTAAGTTCATTAGATGAAAAAGAAGTGTACAGAATC ACTCAGGTTCTTGACTTAAAAGAACTAAATGTGATCAATTACTGAAAACAAGCTTCTTAGATTT GGGAGAGGGCCCATTTTGAAGT GGCTATGTACATCTAAGTGGGG |
| TTC3 | GAATACTTTGATGATTGCCAACAG TGGCTAATAAAAATGACGGCTACCACACTCATGGGTCAC TGGGGCTGCGCAGGGCTCTTTGAGGTGGGTGGCTTCTTTTGAAAGTACTATGAAC GTCTCG AAGCAGTATTCTAGTGA |

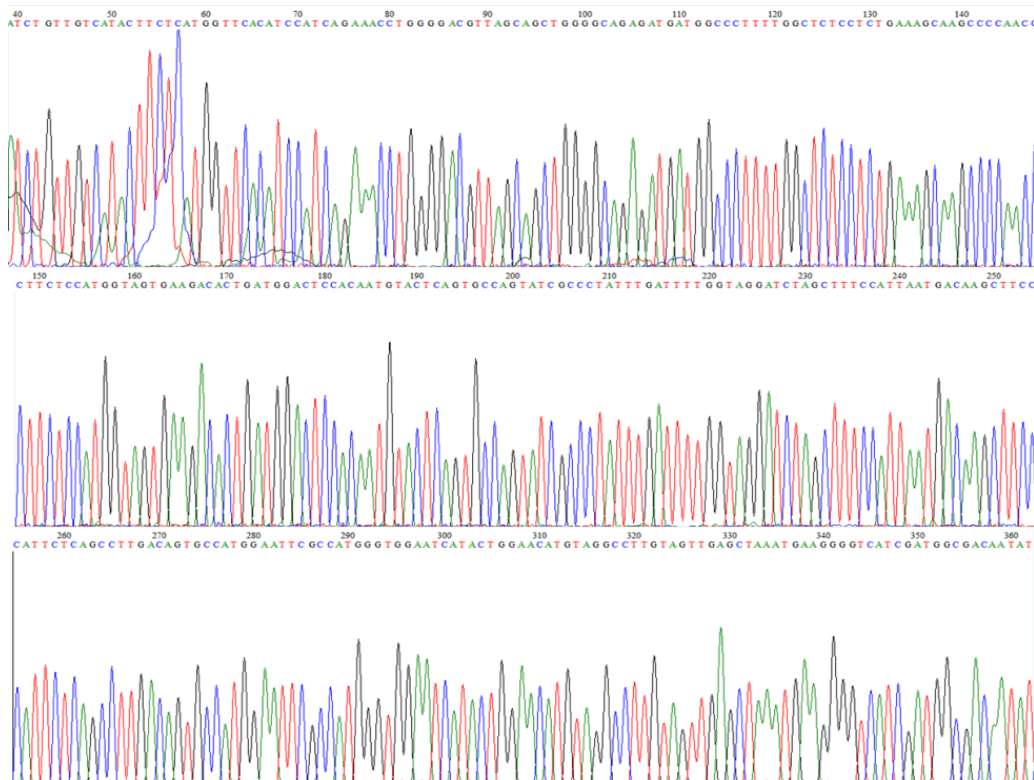
ANEXO 4. ELECTROFEROGRAMAS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN Y BLAST PARA DETERMINAR IDENTIDAD DE CADA AMPLICON

GAPDH

Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 3, mRNA
 Sequence ID: [NM_001289745.2](#) Length: 1401 Number of Matches: 1

Range 1: 235 to 596 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|------------|------------|
| 374 bits(414) | 2e-101 | 297/362(82%) | 21/362(5%) | Plus/Minus |
| Query 1 | CTGTTGTCATACTTCTCATGGTTCACATCCATCAGAAACCTGGGGACGTTAGCAGCTGGG | 60 | | |
| Sbjct 596 | CTGTTGTCATACTTCTCATGGTTCACACCCATGACGAACATGGGGGCATCAGCAGAGGGG | 537 | | |
| Query 61 | GCAGAGATGATGGCCCTTTTGGCTCTCCTCTGAAAGCAAGCCCCAACCTTCTCCATGGTA | 120 | | |
| Sbjct 536 | GCAGAGATGATGACCCCTTTTGGCTCCCCCTGCAAAATGAGCCCCAGCCTTCTCCATGGTG | 477 | | |
| Query 121 | GTGAAGACACTGATGGACTCCACAATGTAAGTCCAGTCCAGTATCGCCCTATTGATTTTG | 180 | | |
| Sbjct 476 | GTGAAGACGCCAGTGGACTCCACGACGTAAGTCCAGTCCAGTATCGCCCACTTGATTTTG | 417 | | |
| Query 181 | GTAGGATCTAGCT-----TTCCATTAATGACAAGCTTCCATTCT | 219 | | |
| Sbjct 416 | GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGATGGTGGGATTTCCATTGATGACAAGCTTCCCGTTC | 357 | | |
| Query 220 | TCAGCCTTGACAGTGCATGGAATTCGCATGGGTGGAATCATACTGGAACATGTAGGCC | 279 | | |
| Sbjct 356 | TCAGCCTTGACGGTGCATGGAATTTGCCATGGGTGGAATCATAATTGGAACATGTAAACC | 297 | | |
| Query 280 | TTGTAGTTGAGCTAAATGAAGGGGTGATCGATGGCGACAATATCCACTTACCAGAGTTA | 339 | | |
| Sbjct 296 | ATGTAGTTGAGGTCATGAAGGGGTGATGATGGCAACAATATCCACTTACCAGAGTTA | 237 | | |



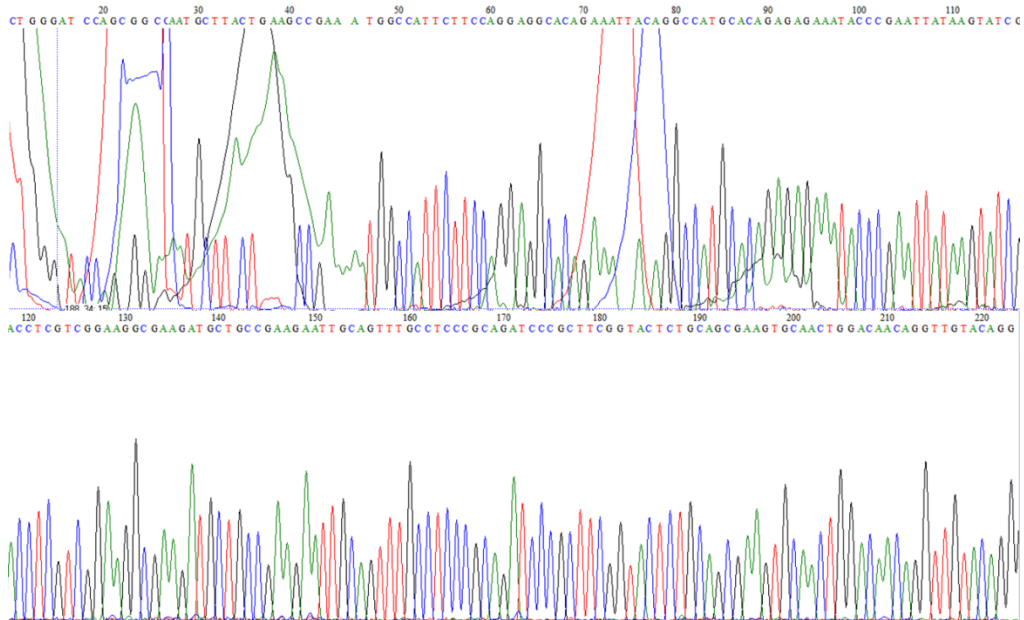
SRY

Homo sapiens sex determining region Y (SRY), mRNA
Sequence ID: [NM_003140.2](#) Length: 887 Number of Matches: 1

Range 1: 418 to 665 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|-----------|-----------|
| 416 bits(225) | 6e-114 | 241/248(97%) | 3/248(1%) | Plus/Plus |
| Query 11 | CTGGGAT-CCAGCGGCCAATGCTTACTGAAGCCG--AAATGGCCATTCTTCCAGGAGGCA | 67 | | |
| Sbjct 418 | CTGGGATACCAAGTGGAAAATGCTTACTGAAGCCGAAAATGGCCATTCTTCCAGGAGGCA | 477 | | |
| Query 68 | CAGAAATTACAGGCCATGCACAGAGAGAAAATACCCGAATTATAAGTATCGACCTCGTCGG | 127 | | |
| Sbjct 478 | CAGAAATTACAGGCCATGCACAGAGAGAAAATACCCGAATTATAAGTATCGACCTCGTCGG | 537 | | |
| Query 128 | AAGGCGAAGATGCTGCCGAAGAATTGCAGTTTGCCTCCCGCAGATCCCCTTCGGTACTC | 187 | | |
| Sbjct 538 | AAGGCGAAGATGCTGCCGAAGAATTGCAGTTTGCCTCCCGCAGATCCCCTTCGGTACTC | 597 | | |
| Query 188 | TGCAGCGAAGTGCAACTGGACAACAGGTTGTACAGGGATGACTGTACGAAAGCCACACAC | 247 | | |
| Sbjct 598 | TGCAGCGAAGTGCAACTGGACAACAGGTTGTACAGGGATGACTGTACGAAAGCCACACAC | 657 | | |
| Query 248 | TCAAGAAT | 255 | | |
| Sbjct 658 | TCAAGAAT | 665 | | |



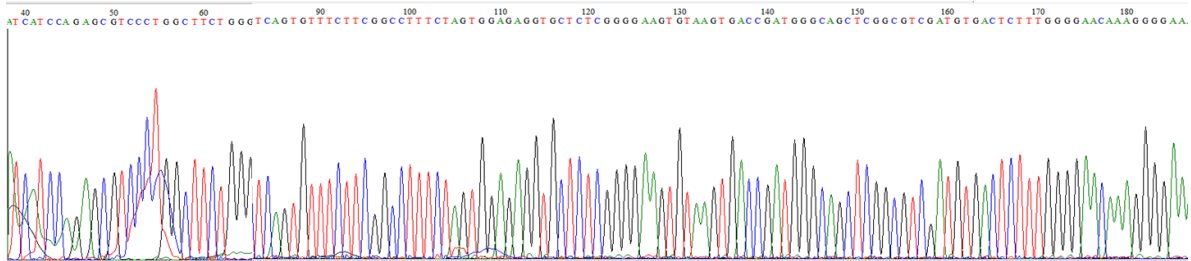
DYS14

Range 7: 9487782 to 9487928 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|---------------|-----------|-----------|
| 266 bits(294) | 9e-69 | 147/147(100%) | 0/147(0%) | Plus/Plus |

Features: [18221 bp at 5' side: testis-specific Y-encoded protein 1 isoform TSPY-S](#)
[39998 bp at 3' side: testis-specific Y-encoded protein 10 isoform 1](#)

```
Query 39      TCATCCAGAGCGTCCCTGGCTTCTGGGCCAATGTTGTATCCTTCTCAGTGTTTCTTCGGC 98
Sbjct 9487782  TCATCCAGAGCGTCCCTGGCTTCTGGGCCAATGTTGTATCCTTCTCAGTGTTTCTTCGGC 9487841
Query 99      CTTTCTAGTGGAGAGGTGCTCTCGGGGAAGTGTAAAGTGACCGATGGGCAGCTCGGCCTCG 158
Sbjct 9487842  CTTTCTAGTGGAGAGGTGCTCTCGGGGAAGTGTAAAGTGACCGATGGGCAGCTCGGCCTCG 9487901
Query 159     ATGTGACTCTTTGGGGAACAAAGGGGA 185
Sbjct 9487902  ATGTGACTCTTTGGGGAACAAAGGGGA 9487928
```

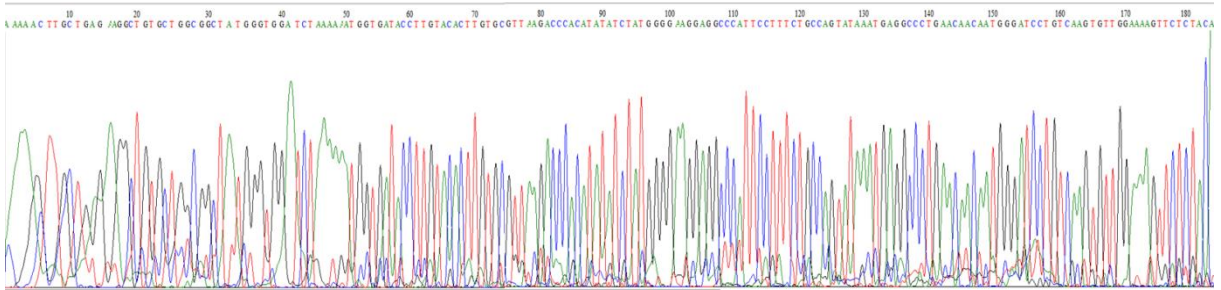


HSDB

Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2 (HSD3B2), transcript variant 2, mRNA
Sequence ID: [NM_001166120.1](#) Length: 1807 Number of Matches: 1

Range 1: 721 to 906 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------|-----------|-----------|
| 320 bits(173) | 2e-85 | 183/187(98%) | 4/187(2%) | Plus/Plus |
| Query 1 | AAAAA-CTTGCTGAGAAGGCTGTGCTGGCGGCTA-TGGGTGG-ATCTAAAAAATGGTGAT | 57 | | |
| Sbjct 721 | AAAAAGCTTGCTGAGAAGGCTGTGCTGGCGGCTAATGGGTGGAATCTAAAAAATGGTGAT | 780 | | |
| Query 58 | ACCTTGACACTTGTGCGTTAAGACCCACATATATCTATGGGGAAGGAGGCCATTCCTT | 117 | | |
| Sbjct 781 | ACCTTGACACTTGTGCGTTAAGACCCACATATATCTATGGGGAAGGAGGCCATTCCTT | 840 | | |
| Query 118 | TCTGCCAGTATAAATGAGGCCCTGAACAACAATGGGATCCTGTCAAGTGTGGAAAAAGTT | 177 | | |
| Sbjct 841 | TCTGCCAGTATAAATGAGGCCCTGAACAACAATGGGATCCTGTCAAGTGTGGAAA-GTT | 899 | | |
| Query 178 | CTCTACA | 184 | | |
| Sbjct 900 | CTCTACA | 906 | | |

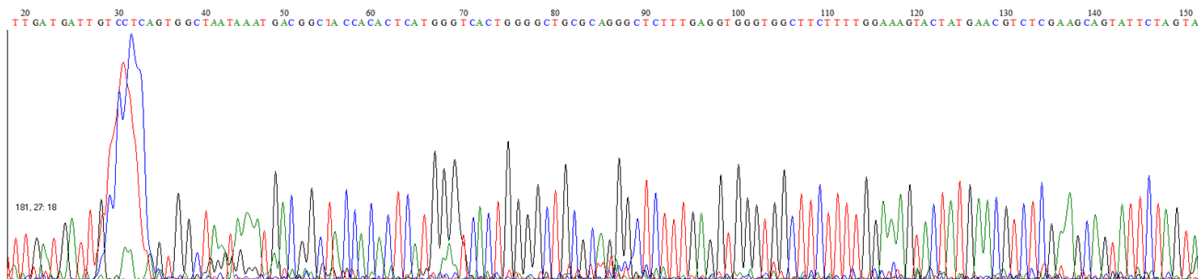


TTC3

Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 3 (TTC3), transcript variant 9, mRNA
Sequence ID: [NM_001353937.1](#) Length: 7749 Number of Matches: 1

Range 1: 6386 to 6516 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|-----------|-----------|
| 223 bits(246) | 3e-56 | 128/131(98%) | 0/131(0%) | Plus/Plus |
| Query 1 | TGATGATTGTCTCAGTGGCTAATAAAATGACGGCTACCACACTCATGGGTCCTGGGGC | 60 | | |
| Sbjct 6386 | TGATGATTGCCAACAGTGGCTAATAAAATGACGGCTACCACACTCATGGGTCCTGGGGC | 6445 | | |
| Query 61 | TGCGCAGGGCTCTTTGAGGTGGGTGGCTTCTTTTGGAAAAGTACTATGAACGTCTCGAAGC | 120 | | |
| Sbjct 6446 | TGCGCAGGGCTCTTTGAGGTGGGTGGCTTCTTTTGGAAAAGTACTATGAACGTCTCGAAGC | 6505 | | |
| Query 121 | AGTATTCTAGT | 131 | | |
| Sbjct 6506 | AGTATTCTAGT | 6516 | | |



RPL17

Homo sapiens chromosome 18, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: [NC_000018.10](#) Length: 80373285 Number of Matches: 1

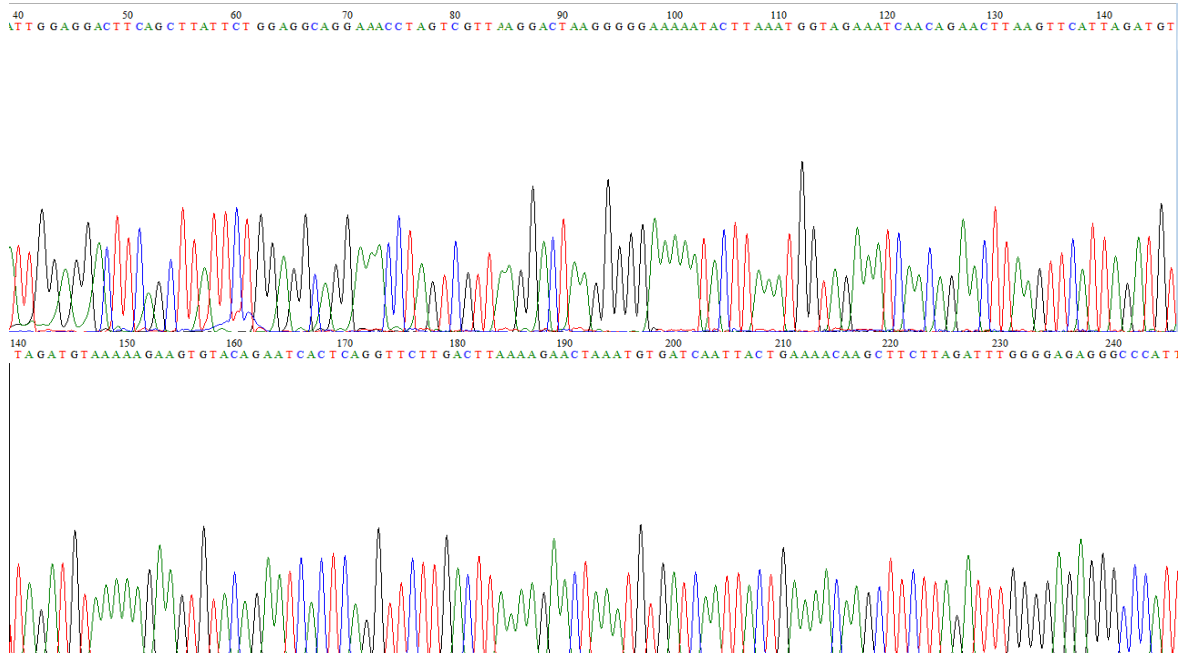
Range 1: 49488618 to 49488851 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|---------------|-----------|-----------|
| 423 bits(468) | 3e-116 | 234/234(100%) | 0/234(0%) | Plus/Plus |

Features: [RPL17-C18orf32 protein isoform 2](#)
[RPL17-C18orf32 protein isoform 1](#)

| | | | |
|-------|----------|--|----------|
| Query | 1 | TGGAGGACTTCAGCTTATTCTGGAGGCAGGAAACCTAGTCGTTAAGGACTAAGGGGGAAA | 60 |
| Sbjct | 49488618 | TGGAGGACTTCAGCTTATTCTGGAGGCAGGAAACCTAGTCGTTAAGGACTAAGGGGGAAA | 49488677 |
| Query | 61 | AATACTTAAATGGTAGAAATCAACAGAACTTAAGTTCATTAGATGTAAAAAGAAGTGAC | 120 |
| Sbjct | 49488678 | AATACTTAAATGGTAGAAATCAACAGAACTTAAGTTCATTAGATGTAAAAAGAAGTGAC | 49488737 |
| Query | 121 | AGAATCACTCAGGTTCTTGACTTAAAAAGAACTAAATGTGATCAATTACTGAAAAAAGCT | 180 |
| Sbjct | 49488738 | AGAATCACTCAGGTTCTTGACTTAAAAAGAACTAAATGTGATCAATTACTGAAAAAAGCT | 49488797 |
| Query | 181 | TCCTAGATTTGGGGAGAGGGCCCATTTTGAAGTGGCTATGTACATCTAAGTGGG | 234 |
| Sbjct | 49488798 | TCCTAGATTTGGGGAGAGGGCCCATTTTGAAGTGGCTATGTACATCTAAGTGGG | 49488851 |



ANEXO 5. CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ELECCIÓN DE GÉNERO EMBRIONARIO

Nosotros los abajo firmantes de este consentimiento y desde ahora denominados como pacientes nos identificamos como:

Sra.: _____ de _____ años
_____ de edad.
(Nombre (s), Apellido Paterno y Apellido Materno de la paciente)

Con _____ domicilio _____ en:

(Calle, Número, Colonia, Ciudad o Estado)

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____

Identificación: _____ No: _____

Sr.: _____ de _____ años
_____ de edad.
(Nombre (s), Apellido Paterno y Apellido Materno del paciente)

Con _____ domicilio _____ en:

(Calle, Número, Colonia, Ciudad o Estado)

Teléfono: _____ Correo electrónico: _____

Identificación: _____ No: _____

Con este documento certificamos que hemos sido informados de las alternativas de tratamiento que nos han sido expuestas por:

Dr(a): _____

(Nombre (s), Apellido Paterno y Apellido Materno del Médico Tratante, Representante de INGENES)

Con domicilio en: Carretera México-Toluca 5420 5° Piso Col. El Yaqui

(Calle, Número, Colonia, Ciudad o Estado)

Cédula Profesional No: _____

Nos ha sido explicado que, por nuestro proceso de infertilidad, es conveniente se nos realice tratamiento de fecundación «in vitro» con transferencia de embriones y que es posible que deba realizarse con microinyección espermática (ICSI). Así mismo nos ha sido explicada la posibilidad de llevar el Diagnóstico de sexo embrionario a los posibles que se generen como consecuencia del tratamiento de Fecundación In Vitro.

I. ¿En qué consiste?

El Diagnóstico de sexo embrionario es una técnica utilizada como complemento de la Fecundación In Vitro (FIV), cuyo propósito es conocer el sexo de los embriones, se realiza en el embrión antes de su implantación en el útero. La técnica de Diagnóstico de Sexo Embrionario es el resultado de la combinación de: 1) Fecundación In Vitro con o sin microinyección espermática, 2) la biopsia de células embrionarias por medio de la micromanipulación y 3) las técnicas de diagnóstico molecular.

II. ¿Cuándo está indicada?

Las indicaciones más frecuentes son:

- Alteraciones genéticas paternas/maternas transmisibles ligadas al cromosoma X o Y, cuyo gen no es conocido o sufre cierta heterogeneidad, pero se evita con selección de sexo.
- Balanceo familiar

En nuestro caso particular este procedimiento permitirá que:

III. ¿Cuál es la finalidad del tratamiento?

La finalidad del proceso de elección de sexo embrionario es favorecer la implantación de los embriones con el sexo elegido previamente, como una opción terapéutica o de equilibrio familiar.

IV. Beneficios

Aumentar las probabilidades de tener un bebé del género deseado.

El sistema Eligen para diagnosticar el sexo embrionario fue desarrollado para analizar a los embriones con suficiente calidad para realizar la biopsia sin afectar su desarrollo. Todo el proceso se realiza en Ingenes bajo un sistema estandarizado de amplificación genómica, por lo que el resultado está listo antes de la transferencia embrionaria, (24-36 h después de la biopsia) con una mayor especificidad y confiabilidad que los otros métodos utilizados.

Las técnicas actuales de enriquecimiento de la muestra espermática para Fecundación In Vitro (con o sin microinyección espermática) requieren estándares muy altos y el mismo proceso puede llegar a dañar los gametos masculinos.

V. Procedimiento

Inicia con la obtención de óvulos y espermatozoides para su fecundación In Vitro con o sin microinyección espermática, los óvulos fecundados se mantendrán en observación, al tercer día; cuando el embrión se encuentra en estadio de 6-8 células se procede a la extracción de una o dos células; a este proceso se le conoce como biopsia embrionaria. Las células obtenidas son analizadas en el laboratorio, mientras que los embriones se

colocan de nuevo en el incubador, donde se mantienen en cultivo hasta que se consigue el resultado del diagnóstico y se valora su posible transferencia.

Con el resultado del análisis genético el equipo de Médicos y Biólogos emiten una recomendación de los embriones que deben ser transferidos, esta decisión se basa en la elección del sexo deseada así como las características morfológicas de viabilidad embrionaria.

Finalmente los embriones viables normales de un ciclo en el que diagnosticó el sexo embrionario no transferidos, se preservarán mediante congelación, previa autorización de los pacientes y firma de consentimiento correspondiente.

VI. Resultados

Hemos podido establecer un sistema que diagnóstica el sexo del embrión con una especificidad del 93%.

Sin embargo los factores que condicionan la probabilidad de contar con un número suficiente de embriones de buena calidad son la edad de la paciente, las causas que han determinado la indicación de diagnosticar de sexo embrionario, el número de ovocitos obtenidos de buena calidad, el número de ovocitos fecundados y embriones viables para biopsia.

VII. Riesgos

- Fallo del procedimiento para obtener la biopsia o producir algún daño al embrión durante la biopsia lo que producirá la detención de su desarrollo. Los embriones pueden no sobrevivir o no evolucionar satisfactoriamente tras la biopsia, este riesgo se relaciona en principio con la calidad de los gametos y los embriones.
- Imposibilidad de realizar la extracción de las células, hay ocasiones que por la morfología del embrión no es posible realizar la biopsia, en estos casos la recomendación es dejar en observación, evaluar el desarrollo hasta día 5 o estadio de blastocisto y determinar en conjunto con el equipo médico si se desea la transferencia de aquellos embriones viables aún sin conocer el sexo.
- Existe la posibilidad de no obtener un diagnóstico del género embrionario concluyente en algún embrión debido a alteraciones en la estructura genética del embrión. Cabe aclarar que este procedimiento únicamente determina el sexo del embrión y no determina alteraciones genéticas presentes en el mismo.

No obstante los riesgos y debido a la naturaleza de la muestra empleada, se aconseja que la madre lleve control prenatal.

VIII. Información económica

Debido a que esta prueba es parte de un proyecto de investigación, Ingenes asume los costos del procedimiento.

IX. Aspectos particulares sobre el diagnóstico o el tratamiento preimplantacional.

Todas las intervenciones que se realicen sobre el embrión vivo (*in vitro*) no podrán tener otra finalidad que la determinación del sexo. Asimismo, cuando los fines que se persiguen son terapéuticos, la intervención no puede tener otro propósito que el de tratar una enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas, y ello bajo los siguientes requisitos:

- a) Que la pareja o mujer sola, hayan sido rigurosamente informados sobre los procedimientos, investigaciones diagnósticas, posibilidades y riesgos de la terapéutica propuesta y las hayan aceptado previamente.
- b) Que se trate de enfermedades con un diagnóstico muy preciso, de pronóstico grave o muy grave, y cuando ofrezcan garantías, al menos razonables, de la mejoría o solución del problema.
- c) Que se disponga de una lista de enfermedades en las que la terapéutica sea posible con criterios estrictamente científicos.
- d) Que se busque equilibrio o balanceo familiar

X. Alternativas a la técnica de Diagnóstico de Sexo Embrionario

- Selección de espermatozoides mediante el uso de citómetro de flujo/láser.
- Adopción legal.

XI. Disponibilidad de volver a preguntar

Los pacientes tienen derecho a recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con el tratamiento. Por lo que, si desea mayor información de la que está en este consentimiento, puede solicitarla en cualquier momento.

XII. Posibilidad de retirar o modificar el consentimiento