



Estudio genético preimplantación para aneuploidías: resultados de la transición entre diferentes tecnologías

López-Rioja MJ,¹ Aguinaga-Ríos M,² Sánchez-González CM,¹ Recio-López Y,¹ Zavala-González PN,³ García-Sánchez R,³ Chávez-Badiola A⁴

Resumen

OBJETIVO: Comunicar los resultados obtenidos del análisis del estudio genético preimplantación para aneuploidías en dos centros de reproducción asistida de México en un periodo de tres años, utilizando dos diferentes técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio observacional, retrospectivo, en donde se reporta el resultado de blastocitos sometidos a preimplantación para aneuploidías durante 2014-2017, en dos centros de reproducción asistida (Ciudad de México y Guadalajara).

RESULTADOS: Se analizaron 404 blastocitos de 129 pacientes (edad promedio 39 ± 4 años). Los embriones se dividieron en dos grupos según la técnica aplicada: 76 por a-CGH y 328 por secuenciación de nueva generación. El porcentaje de embriones euploidos fue de 33%. Las aneuploidías numéricas fueron las más frecuentes. Hasta la terminación del estudio se habían transferido 69 embriones euploidos con tasas de implantación de 78% para secuenciación de nueva generación y de 57% para a-CGH.

CONCLUSIONES: La tasa de implantación reportada en este estudio fue mayor con el análisis de preimplantación para aneuploidías por secuenciación de nueva generación. Los resultados reportados en nuestra experiencia sopportan la necesidad de favorecer una opción de transferencia de embrión único. Es importante reconocer los retos de las nuevas tecnologías y la necesidad de técnicas moleculares más sensibles.

PALABRAS CLAVES: Prueba genética; aneuploidia; fertilización in vitro; blastocisto; implantación; transferencia de embrión único.

¹ Médico residente del segundo año de Biología de la Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Ciudad de México.

² Genética Médica, New Hope Fertility Center México.

³ Departamento de Embriología, New Hope México.

⁴ Director Médico, New Hope México.

Recibido: septiembre 2017

Aceptado: febrero 2018

Correspondencia

Alejandro Chávez Badiola
drchavez-badiola@nhfc.mx

Este artículo debe citarse como

López-Rioja MJ, Aguinaga-Ríos M, Sánchez-González CM, Recio-López Y, Zavala-González PN, García-Sánchez R, Chávez-Badiola A. Estudio genético preimplantación para aneuploidías: resultados de la transición entre diferentes tecnologías. Ginecol Obstet Mex. 2018 feb;86(2):96-107.

DOI: <https://doi.org/10.24245/gom.v86i2.1634>



Ginecol Obstet Mex. 2018 February;86(2):96-107.

Preimplantation genetic testing for aneuploidies PGT-A: Results of the transition between different technologies.

López-Rioja MJ,¹ Aguinaga-Ríos M,² Sánchez-González CM,¹ Recio-López Y,¹ Zavala-González PN,³ García-Sánchez R,³ Chávez-Badiola A⁴

Abstract

OBJECTIVE: Communicate the results obtained from the analysis of the preimplantation genetic study for aneuploidy in two centers of assisted reproduction in Mexico in a period of three years, using two different molecular techniques.

MATERIALS AND METHODS: Descriptive, retrospective study, which reports the blastocysts PGT-A results, over 2014-2017, in two Fertility Centers (Ciudad de México and Guadalajara). The embryos were divided in two groups by their molecular techniques studied: 76 by a-CGH and 328 by NGS

RESULTS: We analyzed a total of 404 blastocysts from 129 patients (mean age 39 ± 4 years), with two different molecular techniques: a-CGH and NGS. The euploid embryos percentage was 33%. The numerical aneuploidies were the most frequent. Up to the ending of the study, 69% of the euploid embryos had been transferred. The implantation rates were 78% for those analyzed by NGS and 57% with a-CGH.

CONCLUSIONS: The implantation rate was bigger with the PGT-A by NGS. Our results reported, supports a single embryo transfer policy. It is important to recognize the challenges of new technologies and the need for more sensitive molecular techniques.

KEYWORDS: Genetic testing; Aneuploidies; In vitro fertilization; Blastocysts; Implantation; Single embryo transfer.

ANTECEDENTES

La frecuencia de infertilidad es mayor en mujeres de edad avanzada, en quienes está documentada una mayor tasa de alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploidías), que representan la principal causa de fracaso reproductivo.^{1,2} Con el propósito de optimizar los resultados en las

técnicas de reproducción asistida de alta complejidad, la biología molecular se ha dado a la tarea de desarrollar técnicas de estudio genético previas a la implantación (PGT por sus siglas en inglés *preimplantation genetic testing*) que analizan a los embriones antes de su transferencia e implantación.³⁻⁷ La biopsia del embrión puede realizarse en diferentes estadios: primer o

segundo cuerpo polar, blastómera o blastocisto. Se utilizan distintas metodologías para identificar anomalías cromosómicas, mutaciones génicas, concordancia de HLA y otras enfermedades hereditarias.⁸

La técnica de estudio genético preimplantación se aplicó por primera vez en 1990, en una biopsia de blastómera por dos grupos de estudio. En Inglaterra Handyside y su grupo detectaron el sexo fetal en una pareja con riesgo de una enfermedad ligada al cromosoma X conocida como deficiencia de ornitín transcarbamilasa.⁹ En Estados Unidos Verlinsky realizó el estudio genético preimplantación en un embrión con deficiencia de alfa-1 antitripsina.¹⁰ A partir de entonces este estudio se ha efectuado en numerosos centros de reproducción asistida alrededor del mundo; para el año 2010 habían nacido cerca de 10,000 seres humanos con estudio genético preimplantación.¹¹

Las técnicas de diagnóstico preimplantación han tenido una transición tecnológica que va desde la hibridación fluorescente *in situ*,¹²⁻¹⁵ el estudio de microarreglos,¹⁶⁻²⁰ hasta la más reciente secuenciación de nueva generación.^{21,22} La hibridación fluorescente *in situ* tiene la capacidad de establecer un diagnóstico específico para un número limitado de cromosomas; es una prueba rápida, capaz de detectar alteraciones numéricas y eliminaciones.¹²⁻¹⁵ El estudio de hibridación genómica comparativa con microarreglos (a-CGH) tiene la capacidad de detectar variaciones en el número de copias (CNVs), con la limitante de no detectar alteraciones balanceadas o poliploidías. Tiene una tasa de detección de mosaicismo de 4.8 a 32%, con más de 40% de células aneuploidías.¹⁶⁻²⁰ El microarreglo de polimorfismos de secuencia única tiene la ventaja de detectar enfermedades monogénicas, triploidías y disomía uniparental además de variaciones en el número de copias.²³ Por último, el estudio de secuenciación de nueva generación tiene mayor

resolución, detecta desequilibrios segmentarios entre 800 kb a 1 Mb. Tiene una tasa de detección de mosaicismo del 100%, con más de 20% de células aneuploidías. Puede realizarse en 24 horas, lo que permite la transferencia de embriones en fresco.^{21,22,24,25} En el **Cuadro 1** se muestran las diferentes tecnologías utilizadas para el estudio genético preimplantación.

La indicación más común del estudio genético preimplantación es la detección de anomalías cromosómicas numéricas, conocida como estudio genético preimplantación para aneuploidías. La transferencia de embriones euploidios ha sido propuesta como una forma de incrementar la tasa de implantación y de embarazo, así como para disminuir la pérdida gestacional en pacientes que requieran técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.²⁶

En tres estudios se demostró un aumento en la tasa de implantación en pacientes a quienes se efectuó el estudio genético preimplantación para aneuploidías, en comparación con pacientes sin este análisis.^{2,24,27} El estudio genético preimplantación para aneuploidías está indicado en pacientes con: edad materna avanzada, parejas con pérdida recurrente en la implantación, pérdida gestacional recurrente o factor masculino severo.²⁸

Con la publicación de los resultados de estudios controlados y con asignación al azar, el Consorcio Europeo de PGD recomendó no efectuar el estudio genético preimplantación para aneuploidías en blastómeras y no utilizar la técnica de hibridación fluorescente *in situ*.²⁹ La tecnología recomendada en la actualidad es la biopsia de trofoectodermo en etapa de blastocisto.²⁸

Diferentes estudios indican que entre 40 y 60% de los embriones humanos tienen alguna aneuploidía, y que este número se incrementa a 51.6% en pacientes mayores de 40 años.³⁰ La

**Cuadro 1.** Cuadro comparativo de las tecnologías utilizadas para el estudio genético preimplantación para aneuploidías

Técnica	Diagnóstico	Ventaja	Desventaja
FISH	Específico para algunos cromosomas	- Prueba rápida - Alteraciones numéricas	- No detecta ganancias - No analiza todos los cromosomas
a-CGH	Detección de alteraciones de 5-Kb	- Detecta variaciones en el número de copias (CNVs) - Mosaicismo >40 células aneuploidies	- No detecta alteraciones balanceadas - No detecta poliploidías
Secuenciación de nueva generación	Detección de alteraciones de 1.5Mb	- Mayor tasa de detección - Mayor velocidad - Mejor interpretación de resultados - Mosaicismo >20 células aneuploidies	- No detecta aneuploidías segmentarias menores a 800 kb

frecuencia de eliminaciones, o duplicaciones cromosómicas conocidas como aneuploidías segmentarias, es de 6 a 7% en estado de blastocisto.^{31,32} Vera-Rodríguez y colaboradores analizaron 124 embriones con aneuploidías segmentarias de los que 62.1% fueron eliminaciones y 37.9% duplicaciones.³³ Hace poco Sánchez-Usabiaga y sus coautores reportaron aneuploidías segmentarias en 10.2% de 615 blastocistos analizados.³⁴

Fiorentino y su grupo²¹ y Yang y colaboradores³⁵ no encontraron diferencias en la detección de aneuploidías en embriones analizados por a-CGH en comparación con secuenciación de nueva generación.

Hoy en día se ha demostrado que la transferencia selectiva de un embrión único (eSET) es útil para reducir la tasa de embarazo múltiple, sin que afecte la tasa final de embarazo. Lo anterior reduce las implicaciones obstétricas, neonatales, psicológicas y sociales que esto deriva, por lo que es muy importante contar con el embrión con mayor potencial reproductivo, para minimizar la frecuencia de abortos por aneuploidías.^{36,37}

El objetivo de nuestro estudio es comunicar los resultados obtenidos del análisis del estudio genético preimplantación para aneuploidías en dos centros de reproducción asistida de México en

un periodo de tres años, utilizando dos diferentes técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo y descriptivo en el que se reporta el resultado de blastocistos a los que se tomó una biopsia de trofectodermo, con indicación de estudio genético preimplantación para aneuploidías, durante tres años consecutivos (junio 2014 a julio 2017), en dos centros de reproducción asistida en México.

Con fines de análisis y reporte de resultados, los embriones se dividieron en dos grupos de acuerdo con el método diagnóstico aplicado para análisis genético: grupo 1 blastocistos analizados con a-CGH (junio 2014 a julio 2015); grupo 2, blastocistos analizados por secuenciación de nueva generación (agosto 2015 a julio 2017).

Estimulación ovárica, fecundación y cultivo embrionario

La estimulación ovárica se realizó con un protocolo de mínima estimulación previamente descrito (miniFIV)^{®,25} Los óvulos identificados durante la aspiración folicular se colocaron en *Human Tubal Factor* (HTF^{®, Life Global, EUA}) durante dos horas hasta ser decumulados. Dos horas más tarde se efectuó la inyección intraci-

toplasmática de esperma con identificación de huso meiótico (SL-ICSI).³⁸ Tras la fecundación, los óvulos se transfirieron a placas NUNC™ 150255 (Nunc, EUA) con medio de cultivo especializado (Global Total®, Life Global, EUA) y recubiertos con aceite (Life Guard Oil®, Life Global, EUA) para ser incubados (Tri-gas; Astec, Japón): CO₂ 8.5%; O₂ 6.5%. La fecundación se verificó 19 horas posteriores a la inyección.³⁹ Se continuó el cultivo extendido a blastocisto, sin cambio en medios de cultivo o valoración intermedia. Previo a la biopsia los blastocistos se clasificaron según Gardner y Schoolcraft.⁴⁰

Biopsia de troflectodermo

Durante los primeros 12 meses del estudio (grupo 1) solo se tomaron biopsias a los embriones con troflectodermo con clasificaciones A y B. Para el grupo 2, y siguiendo los cambios en los protocolos internos, se tomó una biopsia de troflectodermo a todo embrión con células de troflectodermo, independientemente de su clasificación (grados A, B y C).⁴⁰ En todos los casos se tomaron biopsias de embriones que, independientemente de su tamaño, tuvieran masa celular interna grados A y B.

Para la biopsia de troflectodermo, el blastocisto se deposita en placas NUNC™ 150265 (Nunc, EUA), con medio HTFW-HEPES® al 10% de HSA (Life Global, EUA) y se recubre con aceite (Life Global Guard Oil, USA) y se sujetó con una pipeta holding (Origio, EUA) hasta identificar la masa celular interna. En ese momento se realizó la eclosión, con disparo único de láser de diodo de 1460 nm (Zylos-tk®; Hamilton Thorne, EUA) y se introdujo una pipeta de biopsia (28-32 µm, Origio, EUA) para aspirar entre 4 y 7 células con ayuda del microinyector (CellTram Oil Vario, Eppendorf, EUA). Durante la aspiración pueden efectuarse hasta tres disparos de corte con láser y las células obtenidas en la biopsia se liberan en HTFW-HEPES para, posteriormente, lavarlas

en solución salina con fosfato estéril (PBS), cargarse en un tubo con medio especializado para fijación de ADN (IGenomix, México) y enviarlas al proveedor para análisis con a-CGH o secuenciación de nueva generación (grupos 1 y 2, respectivamente).

Técnica de análisis cromosómico

Hibridación genómica comparativa con microarreglos (a-CGH): el ADN de las células se amplifica con el sistema de amplificación SurePlex (Illumina). La muestra de los embriones y de los controles femenino y masculino se marca con los fluoróforos Cy3 y Cy5 según las instrucciones del fabricante.⁴¹ Las muestras se mezclan e hibridan en el microarreglo 24sure (V2 and V3, Illumina) durante 6 a 12 horas. La intensidad de la fluorescencia se detecta con un escáner con láser (Power scanner, TECAN) y los datos se procesan en BlueFuse Multi (v3.2, Illumina). El estudio se completa en menos de 24 horas. Los resultados se interpretaron de acuerdo con Zegers-Hochschild 2017.⁴²

Secuenciación de nueva generación (NGS): permite la amplificación de todo el genoma con el sistema de amplificación SurePlex (Illumina). Las bibliotecas se comparan con la incorporación de códigos individuales. Despues de la amplificación isotérmica y enriquecimiento se efectúa la secuenciación en un chip de 316 o 318, con el equipo de secuenciación PGM (Life-Thermofisher, USA). El análisis de las secuencias y la interpretación de los datos se procesa en el programa Ion Reporter (Life-Thermofisher, EUA).

Las alteraciones cromosómicas se clasifican en: a) numéricas: trisomías y monosomías; b) complejas: con más de dos alteraciones numéricas o segmentarias y c) aneuploidías segmentarias: mutaciones genéticas con pérdidas y duplicaciones.



El análisis cromosómico se procesó en los laboratorios IGenomix, de Estados Unidos y México.

Vitrificación y desvitrificación

Los procesos de vitrificación y desvitrificación se efectuaron con Cryotop® (Kitazato, Biopharma, Japón) siguiendo los protocolos previamente publicados.⁴³ A manera de resumen todos los blastocistos se vitrificaron inmediatamente después de la biopsia de trofectodermo con Kitazato-Vitrification Kit (Biopharma, Japón), en espera del reporte del estudio genético preimplantación para aneuploidías. Una vez confirmada la euploidía y en ciclo de preparación endometrial con reemplazo hormonal, se desvitrifica un único blastocisto (Kitazato, Biopharma, Japón), 4-6 horas antes de la transferencia.

Transferencia embrionaria y confirmación del embarazo

En todos los casos solo se transfirió un blastocisto ($\geq 180\mu$) en medio con hialuronato (EmbryoGlue®, Vitrolife, Suecia), con guía ultrasonográfica transvaginal y catéter Kitazato® (Kitazato, Japón). Siete días posteriores a la transferencia se efectuó una prueba de embarazo con determinación cuantitativa de la fracción beta hCG en sangre.

Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado para la realización de los protocolos de estimulación ovárica. Previo a la biopsia de troflectodermo todas las pacientes recibieron asesoría genética y firmaron consentimientos de acuerdo con protocolos internos y del laboratorio de referencia (IGenomix, México).

En el reporte de resultados se incluyeron todos los blastocistos a los que se tomó una biopsia, independientemente de la indicación para el estudio, edad materna, origen de los óvulos

(propios o donados), o diagnóstico de infertilidad. Los embriones que no supervivieron a la biopsia o los procesos de criopreservación y descongelación también se reportaron. Para comparar el número de embriones euploides, aneuploides y con ADN no detectado de a-CGH y secuenciación de nueva generación, se realizó prueba de χ^2 . Se utilizó el programa SPSS v21.

RESULTADOS

Se tomaron biopsias de trofoectodermo para estudio genético preimplantación para aneuploidías de 404 blastocistos, de 129 pacientes. La edad materna promedio fue de 39 ± 4 años, con mínima de 27 y máxima de 48. En la **Figura 1** se muestra la distribución de pacientes por grupo de edad materna.

Las indicaciones del estudio fueron: edad materna (definida como mayor de 38 años) en 86 pacientes y falla recurrente en la implantación o pérdida gestacional recurrente en 43 casos.

Para los fines de este análisis, los embriones generados a partir de óvulos de donante se analizaron conforme a la edad de la donante (28 óvulos).

En esta serie solo hubo un embrión sin desarrollo posterior a la biopsia de troflectodermo; como

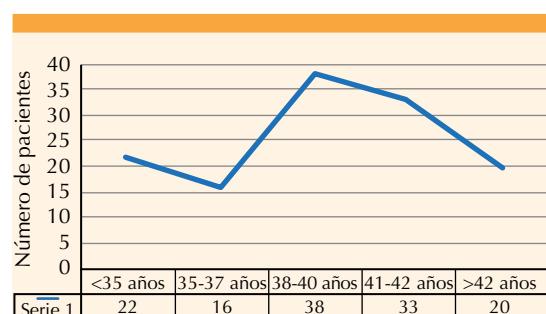


Figura 1. Distribución de las pacientes por grupo de edad.

las células no se analizaron, el caso se excluyó del estudio.

El promedio de blastocistos obtenidos por mujer fue de 3.1. El 33.1% de los blastocistos tuvieron un resultado normal, en 24 (5.9%) no se obtuvo suficiente cantidad de ADN para efectuar el análisis. En el **Cuadro 2** se exponen los resultados obtenidos del estudio genético preimplantación para aneuploidías con ambas técnicas.

Se observó una relación directa entre el número de embriones con aneuploidía y la edad materna. En el **Cuadro 3** se consigna el número de embriones analizados por grupo de edad y el porcentaje de embriones euploides, aneuploides y con ADN no detectado en relación con la edad materna. Las alteraciones cromosómicas observadas con más frecuencia fueron las anomalías numéricas, seguidas de las alteraciones combinadas (numéricas y segmentarias) y, por último, las aneuploidías segmentarias. En la **Figura 2** se muestra el tipo de aneuploidías en-

contradas en relación con la edad materna. Se excluyeron los embriones que no se analizaron por falta de amplificación del ADN. Las alteraciones cromosómicas numéricas más frecuentes fueron las trisomías seguidas de las monosomías. Las trisomías más comunes fueron las de los cromosomas 4, 15 y 22. Las monosomías más frecuentes fueron de los cromosomas 15, 16 y 22.

En 120 embriones se observó una sola aneuploidía, 126 embriones se clasificaron como complejos (≥ 2 aneuploidías).⁴²

En promedio, 10.8% ($n = 44$) de todos los embriones tuvieron una o más aneuploidías segmentarias. En pacientes menores de 35 años se observó mayor cantidad de embriones con estas alteraciones. Las duplicaciones fueron más frecuentes que las mutaciones con pérdidas. Las alteraciones en el brazo corto de los cromosomas fueron más comunes que las del brazo largo. No se encontró una relación de estas alteraciones con la edad materna.

Cuadro 2. Resultado de estudio de PGT-A

Resultado de PGT-A	Porcentaje/ No. Casos
Promedio de embriones por paciente	3.1
Embriones euploides	33.16% ($n=134$)
Embriones aneuploides	60.89% ($n=246$)
DNA no detectado	5.94% ($n=24$)
Total	100% ($n=404$)

Análisis cromosómico

En el grupo 1 se incluyeron 76 embriones analizados con a-CGH (edad: 39 ± 4 años). En el grupo 2 se incluyeron 328 embriones analizados con secuenciación de nueva generación (edad: 39 ± 3 años). En la **Figura 3** se observa la diferencia de edad materna de acuerdo con la tecnología utilizada.

Cuadro 3. Distribución por grupo de edad de embriones euploides, aneuploides y ADN no detectado

Edad (años)	Número de embriones	Euploides	Aneuploides	ADN no detectado
<35	65	43.83%	45.20%	10.97%
35-37	53	50.94%	49.06%	0%
38-40	119	36.50%	57.93%	5.57%
41-42	88	26.59%	67.02%	6.39%
>42	55	6.89%	87.93%	5.18%

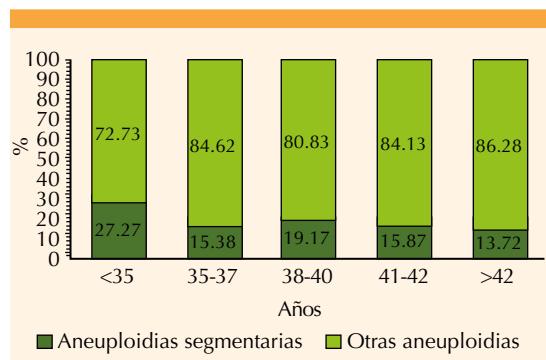


Figura 2. Alteraciones cromosómicas observadas en relación con la edad materna.

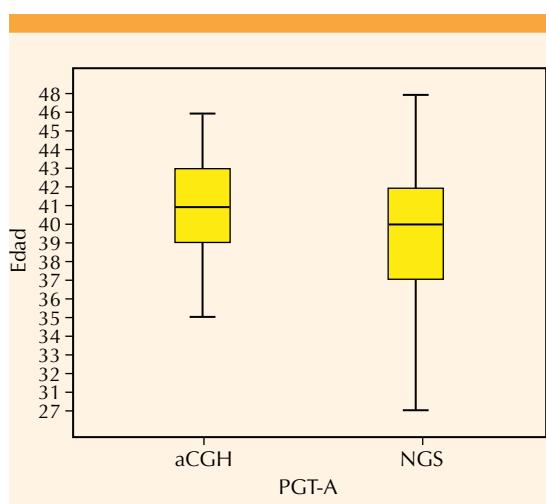


Figura 3. Diferencia de la edad materna según la tecnología utilizada.

El 75% de los embriones analizados por a-CGH y 57.62% de los analizados por secuenciación de nueva generación fueron aneuploides. En 24 (7.3%) casos analizados por secuenciación de nueva generación no se obtuvo suficiente cantidad de ADN para efectuar el análisis. En los **Cuadros 4a** y **4b** se muestran los resultados obtenidos con cada tecnología. El estudio de a-CGH detectó aneuploidías segmentarias

en 10/76 (13.15%) embriones analizados, mientras que el estudio de secuenciación de nueva generación detectó esta alteración en 34/328 (10.36%) embriones. En 32/76 (42.10%) embriones analizados por a-CGH y en 94/328 (28.65%) de los casos analizados por secuenciación de nueva generación se obtuvo un resultado complejo, con ≥ 2 alteraciones cromosómicas. El análisis estadístico mostró un valor de p no significativo con respecto a la diferencia de la edad materna entre ambos grupos.

A la fecha se han transferido 69 embriones euploides: de 14 embriones analizados por a-CGH, se obtuvieron 8 (57.14%) pruebas beta-hCG positivas. De los 55 embriones euploides indagados por secuenciación de nueva generación se obtuvieron 43 (78.1%) beta-hCG positivas (**Cuadros 5a** y **5b**).

Cuadro 4a. Número de embriones euploides, aneuploides y con ADN no detectado de a-CGH y secuenciación de nueva generación

	a-CGH	Secuenciación de nueva generación	
	Euploides	25%	Euploides
Aneuploides	75%	Aneuploides	57.62%
ADN no detectado	0%	ADN no detectado	7.31%
Total	100%	Total	100%

Cuadro 4b. Prueba de χ^2 para número de embriones euploides, aneuploides y con ADN no detectado de a-CGH y secuenciación de nueva generación

	Pruebas de χ^2		
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
χ^2 de Pearson	10.504 ^a	2	.005
Razón de verosimilitudes	14.922	2	.001
N de casos válidos	404		

a. 1 casillas (16.7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4.51.

Cuadro 5a. Número de beta-hCG positivas por grupo de a-CGH y secuenciación de nueva generación

a-CGH	Secuenciación de nueva generación
Beta-hCG positivas (N=8)	78.18% (N=43)

Cuadro 5b. Prueba χ^2 para número de beta-hCG positivas por grupo de a-CGH y secuenciación de nueva generación

Pruebas de χ^2		
Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
8.023 ^a	3	.046
8.625	3	.035
404		

a. Una casilla (12.5%) tiene una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3.39.

Los embriones euploides que no habían sido transferidos al momento de enviar a publicación este trabajo ($n = 56$) permanecen vitrificados. En el **Cuadro 6** se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Cuadro 6. Resumen de los resultados obtenidos

Número de parejas tratadas	129
Edad promedio de la mujer	39 ±4años
Media de embriones por mujer	3.1
Número de PGT-A realizados	404
Indicaciones	
- Edad materna ≥ 38 años	86
- Falla repetida de implantación/ PGR	43
Número de embriones biopsiados	404
Número de embriones con ADN no detectado	24 (5.94%)
Número de embriones diagnosticados	380 (94.05%)
Número de blastocistos euploides transferidos	69
Número de hGC positivas (global)*	51 (73.91%)

PGR: pérdida gestacional recurrente.

* Combinación de resultados de ambos grupos.

DISCUSIÓN

El éxito de la fertilización *in vitro* depende, en parte, de la adecuada selección del embrión. Durante mucho tiempo esta selección se basó en criterios morfológicos y muchas pacientes no lograban el embarazo a pesar de la transferencia del “mejor” embrión.⁴⁴ Una de las posibles causas es que los embriones morfológicamente normales pueden tener alguna alteración cromosómica que impide su implantación o desarrollo embrionario.⁴⁵ La pobre correlación entre la morfología y el complemento cromosómico llevó a la introducción del estudio genético previo a la implantación, que se ha propuesto como un método para mejorar la selección de los embriones en pacientes con algún factor de riesgo, como: edad materna avanzada, falla recurrente en la implantación o pérdida gestacional recurrente.⁴⁶

En nuestro ensayo encontramos que la indicación más común del estudio genético preimplantación para aneuploidías fue la edad materna avanzada. El promedio de edad fue de 39 años y se encontró que 36.5% de los embriones fueron euploides. Munné y su grupo refieren que entre los 38 y 40 años el porcentaje de embriones euploides es de 33%.³⁰ A mayor edad mayor porcentaje de embriones aneuploides, lo que concuerda con lo descrito. En nuestro país, el estudio de Sánchez-Usabiaga y colaboradores mostró que en 615 blastocistos analizados, 50.2% fueron aneuploides.³⁴ En este estudio se muestra que los blastocistos con aneuploidías numéricas aumentaron conforme mayor fue la edad materna. De las pacientes entre 38 y 40 años, 60% tuvieron algún tipo de alteración cromosómica.

Nuestros resultados muestran que 81.6% de las alteraciones cromosómicas fueron numéricas. Llama la atención que tanto en las trisomías como en las monosomías los cromosomas



participantes fueron 15,16 y 22, que son los encontrados con aneuploidias y mayor frecuencia en abortos del primer trimestre.

Alrededor de 5.8 a 15% de los blastocitos tiene mutación genética con pérdida o duplicaciones.^{31,32} Este tipo de alteraciones cromosómicas se encuentra en 6% de los abortos del primer trimestre.⁴⁷ En nuestro estudio 10.8% de los embriones tuvieron una o más mutaciones genéticas con pérdida o duplicaciones con o sin otras alteraciones numéricas. De acuerdo con lo reportado en la bibliografía se observa que el mayor número de embriones con estas alteraciones se encontró en el grupo de edad menor a 35 años. Sánchez-Usabiaga y su grupo encontraron que 6.8% de los embriones tuvieron algún tipo de aneuploidia segmentaria, y que estas alteraciones tenían una relación inversa con la edad materna.³⁴

Fiorentino y sus colaboradores reportaron, por primera vez, la aplicación de la tecnología de secuenciación de nueva generación como método para el estudio genético previo a la implantación en casos de aneuploidias. Ellos demostraron que este estudio podía detectar aneuploidias y desequilibrios segmentarios tan pequeños como de 14 Mb.²¹

En nuestro estudio observamos que un mayor porcentaje de embriones analizados por secuenciación de nueva generación tuvo falla en la amplificación del ADN. Esto puede deberse al cambio de criterios internos utilizados en la selección de embriones para biopsia. En el grupo 2 la biopsia se tomó a todos los embriones con masa celular interna, independiente de la clasificación del trofectodermo.

El 75% de los embriones analizados por a-CGH mostró una o más aneuploidias comparados con 62.1% de los embriones analizados por secuenciación de nueva generación. Esto en

contraste con lo reportado por Yang y su grupo en un estudio con asignación al azar, en el que no se encontró diferencia entre los resultados de los embriones con ambas tecnologías.³⁵ También se observó mayor tasa de implantación de embriones analizados por secuenciación de nueva generación (78.1%) en comparación con aCGH (57.1%). En ambos casos las diferencias observadas en nuestro estudio pueden deberse a la diferencia en el número de embriones incluido y a que el grupo a-CGH fue una muestra insuficiente para permitir comparaciones.

La indicación del estudio genético preimplantación para aneuploidias suscita controversia por el mosaicismo en etapas embrionarias tempranas, estimada entre 5 y 20% de los embriones analizados. En esta serie no encontramos embriones con mosaico cromosómico. La ausencia de mosaicos podría estar relacionada con el tipo de tecnología aplicada durante la secuenciación de nueva generación.

El número de embriones con aneuploidias segmentarias detectadas por ambas metodologías fue el mismo, con mayor cantidad de embriones con duplicaciones en comparación con mutaciones genéticas con pérdida. En un estudio reciente, Vera-Rodríguez y colaboradores reportaron una concordancia de 99.8% entre ambas técnicas.³³ Sin embargo, ellos reportan mayor frecuencia de embriones con mutaciones genéticas con pérdida. La relevancia de las aneuploidias segmentarias en el desarrollo embrionario no se ha definido en los programas de estudio genético preimplantación para aneuploidias. Estas alteraciones deben confirmarse con otra tecnología, como la hibridación fluorescente *in situ*.

El reto del estudio genético preimplantación para aneuploidias es el desarrollo de tecnologías más sensibles que permita la detección de mosaicos y mejores selecciones y tasas de implantación.

CONCLUSIÓN

El propósito de cualquier tratamiento de reproducción asistida se dirige a ofrecer la mejor oportunidad para que la mujer tenga un recién nacido sano. La cantidad de grupos que recomiendan la transferencia de un embrión único es cada vez mayor, siempre con la esperanza de ofrecer tratamientos más eficientes y reducir el riesgo de embarazos múltiples.^{36,37}

La tasa de implantación aquí reportada fue mayor con el análisis de estudio genético preimplantación para aneuploidías por secuenciación de nueva generación, con la limitante en la diferencia en el número de embriones analizados en cada grupo. La transición hacia nuevas tecnologías brinda confianza para efectuar, en el mismo tiempo, el triple de estudios con secuenciación de nueva generación, soportando nuestro principio de privilegiar la transferencia de embrión euploide único. En nuestro ensayo no encontramos algún embrión con mosaico cromosómico.

Los retos actuales se dirigen a conseguir mayor tasa de blastocitos, con una buena supervivencia posvitrificación y mejorar los resultados de las transferencias en fresco de blastocitos diagnosticados como euploides, todo esto acompañado siempre de la necesaria asesoría genética a las pacientes.

REFERENCIAS

1. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril* 2012; 98:675-680.
2. Scott R, Upham K, Forman E, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013; 100:697-703.
3. De Rycke M, Belva F, Goossens V, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Hum Reprod* 2015; 30:1763-1789.
4. Schiwe M. The Historic Development and Incorporation of Four Assisted Reproductive Technologies Shaping Today's IVF Industry. *FIV Reprod Med Genet* 2016; 4:173-180.
5. Schoolcraft W, Fragouli E, Stevens J, et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010; 94:1700-1706.
6. Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, et al. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril* 2011; 96:638-640.
7. Schoolcraft W, Katz-Jaffe M. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril* 2013; 100:615-619.
8. Harper JC. Preimplantation genetic diagnosis 2a ed. Cambridge: Cambridge University Press. United Kingdom; 2009. 274-285p.
9. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 244: 768-770.
10. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, et al. 1990. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990; 5:826-829.
11. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn* 2010; 30:682-695.
12. Griffin DK, Handyside AH, Penketh RJ, et al. Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod* 1991; 6:101-105.
13. Grifo JA, Boyle A, Tang YX, et al. Preimplantation genetic diagnosis. In situ hybridization as a tool for analysis. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116:393-397.
14. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, et al. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8:2185-2191.
15. Munne S, Fragouli E, Colls P, et al. Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test. *Reprod Biomed* 2010; 20:92-97.
16. Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:703-710.
17. Wells D, Fragouli E, Alfarawaty S, et al. Highly significant improvement in embryo implantation and increased live birth rate achieved after comprehensive chromosomal screening: Implications for single embryo transfer. *Fertil Steril* 2009;3: s268.
18. Handyside AH, Harton GL, Mariani B, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010; 10:651-658.
19. Treff N, Tao X, Su J, et al. Four-hour 24 chromosome aneuploidy screening using high throughput PCR SNP allele ratio analysis. *Fertil Steril* 2009;3: s169.



20. Rubio C, Rodrigo L, Mir P, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril* 2013; 99:1044-1048.
21. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod* 2014; 29:2802-2813.
22. Kung A, Munné S, Bankowski B, et al. Validation of next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of Embryos. *Reprod Biomed Online* 2015; 31:760-769.
23. Brezina PR, Benner A, Rechitsky S, et al. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: a novel approach in optimizing pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2011; 5:1786-1788.
24. Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5-8.
25. Zhang J. Luteal phase ovarian stimulation following oocyte retrieval: is it helpful for poor responders? *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13:76-80.
26. Mastenbroek S, Twisk M, Van Echten-Arends J, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007; 357:9-17.
27. Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:107.
28. Dahdouh E, Balayla J, Audibert F. Technical Update: Pre-implantation Genetic Diagnosis and Screening. *J Obstet Gynaecol Can* 2015; 5:451-463.
29. Harper J, Coonen E, De Rycke M, et al. What next for pre-implantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 2010; 4:821-823.
30. Munné S. Mosaicism: “survival of the fittest” versus “no embryo left behind”. *Fertil Steril*, 2016;105:5:1146-1149.
31. Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R, et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod* 2010; 16:944-949.
32. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 2013; 132:1001–1013.
33. Vera-Rodriguez M, Michel C, Mercader A. Distribution patterns of segmental aneuploidies in human blastocysts identified by next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2016; 105:1047-1055.
34. Sánchez Usabiaga R, Ramírez Rivera EG, et al. Frecuencia de aneuploidías segmentarias en biopsias de trofoblasto durante un ciclo de FIV y su relación con la edad materna. *Ginercol Obstet Mex* 2017; 8:510-518.
35. Yang Z, Lin J, Zhang J, et al. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study. *BMC Medical Genomics* 2015; 8:1-13.
36. White PM. One for Sorrow, Two for Joy? American embryo transfer guideline recommendations, practices, and outcomes for gestational surrogate patients. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:431-443.
37. Harbottle S, Hughes C, Cutting R, et al. Elective Single Embryo Transfer: an update to UK Best Practice Guidelines. *Hum Fertil* 2015; 18:165-183.
38. Hee J, Henderson S, Garcia E. Successful live birth after transfer of blastocyst and frozen blastocyst from rescue ICSI with application of polarized light microscopy for spindle examination on unfertilized eggs. *J Ovarian Res*. 2015; 8:22-26.
39. Gardner DK, Stevens J, Sheldon CB, et al. Analysis of blastocyst morphology. In: Elder K, Cohen J, editors. *Human preimplantation embryo selection*. London: Informa Healthcare; 2007. pp. 79-87
40. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11:307-311.
41. Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, et al. New tools for embryo selection: comprehensive chromosome screening by array comparative genomic hybridization. *Biomed Res Int* 2014; 2014:1-9.
42. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril* 2017; S0015-0282(17)30429-6. Article in press.
43. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67:73-80.
44. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9:251-262.
45. Macklon NS, Geraedts JP, Fauer BC. Conception to ongoing pregnancy: the ‘black box’ of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002; 8:333-343.
46. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 2002; 22:512-518.
47. Martinez MC, Mendez C, Ferro J, et al. Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. *Fertil Steril* 2010; 93:289-292.