



Trabajo Fin de Grado

Grado en Medicina

**Diagnóstico genético preimplantacional:
estudio retrospectivo de biopsia
embrionaria en día 3 versus biopsia en
blastocisto (día 5)**

Autora:Uxue Idiazabal Rodríguez

Directoras:

Amparo Villasante Morán

Zaloe Larreategui Laiseca

Leioa, 1 de abril de 2017

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.REVISIÓN HISTÓRICA.....	1
1.2.INDICACIONES DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL.....	2
1.3.TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	3
1.4.TIPOS DE BIOPSIA.....	5
1.5.ANÁLISIS GENÉTICO.....	8
1.6.TRANSFERENCIA.....	10
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1.DISEÑO DEL ESTUDIO.....	15
3.2.BIOPSIA EMBRIONARIA EN DÍA 3.....	15
3.3.BIOPSIA EMBRIONARIA EN DÍA 5.....	17
3.4.DEFINICIONES CLÍNICAS.....	19
4. RESULTADOS	21
4.1.TASA DE NORMALIDAD.....	21
4.2.TASA DE SUPERVIVENCIA TRAS DESVITRIFICACIÓN.....	21
4.3.TASA DE GESTACIÓN.....	21
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	31

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que la infertilidad o esterilidad afecta al 15% de las parejas que intentan concebir. Las alteraciones genéticas suponen una importante causa de esterilidad e infertilidad, pudiendo ser responsables de un gran porcentaje de los defectos congénitos que se observan en abortos espontáneos y recién nacidos (1). De hecho, la aneuploidia es probablemente la principal causa de detención del crecimiento preimplantacional, fallo de implantación y podría directamente conducir a casos de aborto precoz, aborto tardío o nacimiento de un niño afectado por una trisomía o monosomía (2).

Gracias a los avances en el conocimiento de las bases moleculares de diversas enfermedades y del desarrollo de nuevas tecnologías utilizadas en el estudio del DNA, se han podido establecer aproximaciones diagnósticas precoces y de mayor exactitud para un importante número de patologías congénitas además de identificar a pacientes con riesgo elevado de procrear descendencia afectada (1).

El objetivo principal del diagnóstico genético preimplantacional es el diagnóstico precoz de enfermedades genéticas para poder ofrecer a familias de alto riesgo de transmisión de patologías hereditarias una opción reproductiva (1). Durante más de 20 años, el *screening* genético preimplantacional (PGS) ha sido utilizado con el propósito de seleccionar embriones con el mayor potencial de desarrollo para mejorar los resultados de las técnicas de reproducción asistida (2).

1.1. REVISIÓN HISTÓRICA

El éxito de la fecundación *in vitro* (FIV) se basa, en parte, en la selección de embriones viables. Durante décadas, la selección de los embriones más competentes para transferir se ha realizado teniendo en cuenta únicamente criterios morfológicos. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados debido, probablemente, a que muchos de los embriones morfológicamente normales eran aneuploides, especialmente aquellos provenientes de mujeres de edad avanzada (3).

Esta pobre correlación entre la morfología del embrión y estatus cromosómico condujo a la introducción del PGS, técnica que podría asesorar sobre la constitución numérica de cromosomas de los embriones antes de la transferencia (3). Por esta razón, basándose en la hipótesis de que la selección de ovocitos y embriones euploides durante el proceso de reproducción asistida podría conducir a mejores resultados de las técnicas de reproducción asistida, se introdujo finalmente en 1993 el PGS (2).

Al contrario de lo esperado, después de 15 años se ha demostrado que la primera generación de PGS era inefectiva mejorando los porcentajes de embarazos y reduciendo los porcentajes de abortos. Estos resultados se podrían explicar por las siguientes causas: 1) el daño causado al embrión durante la biopsia en día 3, 2) la limitada información obtenida mediante la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y, 3) el alto porcentaje de mosaicismo, es decir, de la presencia de una mezcla de líneas celulares euploides y aneuploides en embriones de tres días.

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, se ha introducido un nuevo PGS, el denominado PGS 2.0., que se caracteriza por la biopsia del corpúsculo polar (PB) o biopsia del trofoectodermo, en vez de la biopsia en día 3, y evaluación completa de los 23 cromosomas, en vez de la limitada información proporcionada por la FISH de un solo conjunto de cromosomas (2).

1.2. INDICACIONES DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

Como se ha señalado previamente, para mejorar los resultados clínicos, el PGS ha sido propuesto a parejas infértiles que están en un tratamiento de reproducción asistida. Las principales indicaciones son las siguientes:

- Edad materna avanzada, generalmente definida como edad materna mayor de 38 años (1) (2) (4).
- Fallo repetido en la implantación, definido como tres o más transferencias de embriones morfológicamente de alta calidad sin que se haya producido embarazo (1) (2) (4).

- Aborto recurrente de causa desconocida en pacientes con cariotipos normales (más de dos abortos previos) (1) (2) (4).
- Factor masculino severo, es decir, parámetros anormales del semen (2) (4).

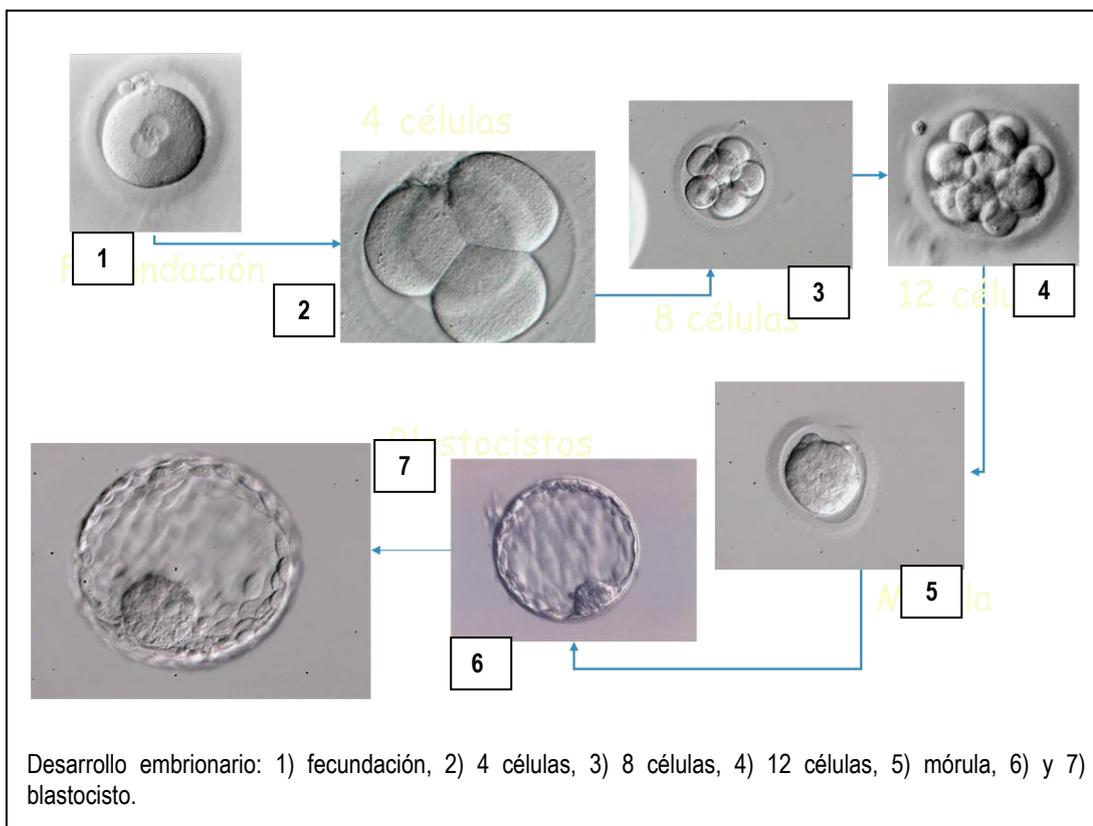
En todos estos grupos de pacientes se presume un aumento del porcentaje de aneuploidía, pero el beneficio del PGS 2.0 no ha sido todavía adecuadamente demostrado en ensayos clínicos controlados aleatorizados (2).

1.3. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La FIV se define como la unión de un óvulo con un espermatozoide fuera del organismo materno con el objetivo de obtener un embrión viable que se implante posteriormente y pueda dar lugar a una gestación a término, y cuyas técnicas principales son la fecundación in vitro tradicional y la inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) (1).

Una vez se ha realizado la fecundación, el cigoto suele cultivarse en la nueva tecnología denominada *Embryoscope*, que permite determinar los patrones embrionarios de consumo de oxígeno, que es el mejor indicador de actividad metabólica, junto con los patrones de desarrollo embrionario (1). De esta manera, se obtiene información adicional de los embriones durante su cultivo ordinario para la posterior selección del mejor momento para realizar la biopsia embrionaria.

Figura 1: Etapas desarrollo embrionario.



Es fundamental utilizar estrategias que mejoren las condiciones de cultivo embrionarias y con ello la calidad del embrión. Independientemente del sistema que se emplee para el cultivo, éste debe ser capaz de mantener estables los parámetros de pH, osmolaridad y temperatura (5). Una posible estrategia de interés es la utilización de sistemas de cultivo que permitan el continuo cambio del medio de cultivo, basada en la tecnología microfluídica. El Chip para el cultivo embrionario es uno de los sistemas que puede aplicar esta tecnología, de manera que el cambio del medio es automatizado, sometiendo al embrión a un menor estrés, y por tanto, aumentando las probabilidades de gestación (1).

1.4. TIPOS DE BIOPSIA

1.4.1. Biopsia embrionaria en día 3

La biopsia embrionaria (día 3) se realiza después de que la meiosis se haya completado, por lo que tanto los errores meióticos maternos como los paternos deberían ser detectados. Podría también detectar algunos errores mitóticos, pero teniendo en cuenta que solamente se realiza una biopsia normalmente, la detección de mosaicismo es altamente variable y dependerá de que porción del embrión esté afectada (6).

La biopsia embrionaria se realiza típicamente el día 3 del desarrollo *in vitro*, y permite al laboratorio de diagnóstico entre dos y tres días de estudio, aunque la mayoría de las técnicas genéticas proporcionan resultados en las primeras 24 horas. Teniendo en cuenta que la mayoría de laboratorios de IVF no tienen su propio laboratorio de genética, esto permite que el material de la biopsia sea trasladado al laboratorio de referencia, que se realice el análisis y que el resultado sea comunicado al centro a tiempo para la transferencia en fresco (6).

Como se ha mencionado previamente, el mosaicismo, que se caracteriza por la presencia de una mezcla de líneas celulares euploides y aneuploides, representa una limitación en el cribado de posibles aneuploidías en el embrión. Se estima que el 29% de todos los embriones están afectados por este fenómeno, y estos embriones se implantan infrecuentemente. Algunos autores defienden que el porcentaje de mosaicismo en embriones es similar al hallado en el estado de blastocisto. Otros, sin embargo, han observado diferencias en los resultados obtenidos en biopsias de blastocistos *versus* aquellas biopsias obtenidas del mismo embrión pero en día 3. Este último hallazgo podría tener muchas posibles explicaciones, incluyendo la falta de diagnóstico de mosaicismo por errores de laboratorio, pero también se ha planteado la existencia de una probable auto-corrección embrionaria (6).

1.4.2. Biopsia de blastocisto (día 5)

La biopsia de blastocisto está siendo muy empleada actualmente por sus evidentes ventajas: 1) menor daño al embrión, 2) mayor obtención de material genético para

analizar, ya que se obtienen 6-10 células por biopsia y 3) menor porcentaje de mosaicismo (2) (7). Además, parece que la transferencia en estado de blastocisto presenta mayores tasas de implantación (8). Sin embargo, no se deben olvidar las desventajas de esta técnica: 1) mayor tiempo de cultivo, 2) el riesgo de cancelar ciclos y 3) posibles efectos epigenéticos por cultivo *in vitro* prolongado (8).

El día de realización de la biopsia de blastocisto varía ampliamente, desde el comienzo del día 5 (115-116 horas) hasta el día 6 (142-150 horas), e incluso el día 7 (7), lo que podría resultar un problema en algunos casos por incompatibilidad horaria.

Para poder realizar este tipo de biopsia es necesario previamente realizar la rotura de la *zona pellucida* mediante láser el día 3 ó 4. Ésta es una técnica rápida que realiza agujeros en la *zona pellucida* de manera controlada y estandarizada, permitiendo la herniación del embrión a los dos días de haberse realizado la técnica. La herniación de la llamada masa interna no es considerada un problema ya que ocurre en menos del 10% de los blastocistos biopsiados y en todo caso podría resolverse realizando otro agujero en la parte opuesta al anterior (7).

La biopsia se realiza habitualmente en el medio de cultivo estándar, libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} ya que se considera que así se evita un posible estrés adicional al embrión (7).

Figura 2: Imagen de las biopsias embrionarias en día 3 y en día 5.

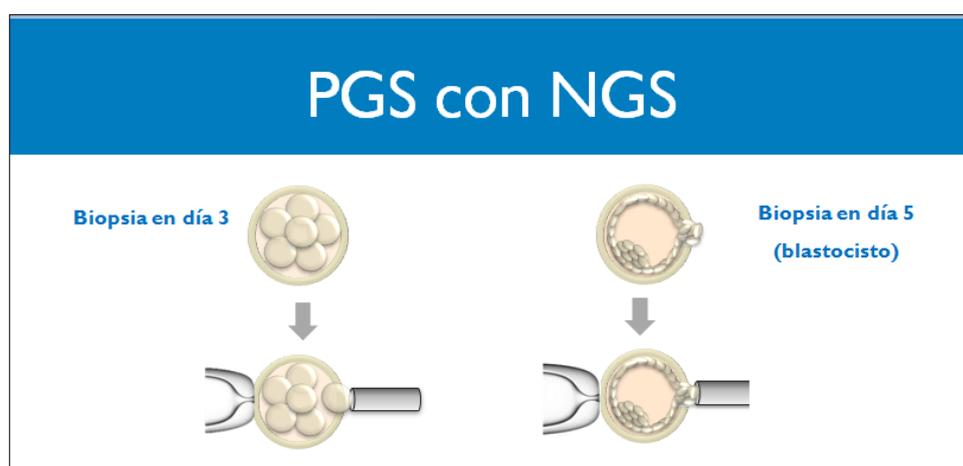


Tabla 1: Ventajas y desventajas de la biopsia embrionaria en día 3 y la biopsia de blastocisto (día 5).

Biopsia día 3		Biopsia día 5	
PROS	CONTRAS	PROS	CONTRAS
Posibilidad de transferir en fresco	Parece que menor tasa de embarazo	Trofoectodermo es extraembrionario	Cultivo prolongado (se desconocen las implicaciones)
Técnica más sencilla para los embriólogos	Mayor daño al embrión (se retira más material).	Se obtiene más material genético con una sola muestra	Formación de embriólogos para realizar la biopsia
No hay necesidad de usar el láser (supone un coste mayor)	Mosaicismo	Menor mosaicismo que en día 3	Láser
		Possible selección natural (mayor % de euploides), evita diagnóstico inútil	Necesidad de combinar la técnica de biopsia y la vitrificación

1.4.3. Biopsia de corpúsculo polar

Esta es una opción existente pero no bien estudiada, a pesar de que tiene un gran número de factores que la hacen atractiva. De los ocho embriólogos que participaron en el artículo *'The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists'* solo tres reportaron que la utilizaban (7).

El material se obtiene en un primer momento del proceso de FIV, lo que permite un mayor tiempo para el análisis de laboratorio. Además, este tipo de biopsia solo involucra al corpúsculo polar, no requiriendo la renovación de ninguna porción del embrión posteriormente, por lo que es considerada menos invasiva que el resto de biopsias (6).

A pesar de todas las posibles ventajas, no debemos olvidar la naturaleza de la información proporcionada por este tipo de biopsia. El principal inconveniente, es por tanto, que solo permite comprobar las aneuploidías meióticas de origen materno. Es decir, no se podrán identificar las anormalidades paternas ni los errores mitóticos post-cigóticos. Además, en ciertas ocasiones los corpúsculos polares se encuentran fragmentados, y esta situación podría inducir a información ambigua o errónea (2). El coste de esta técnica es otro gran inconveniente (7).

1.4.4. Aspiración del fluido de blastocisto

Es otra manera de obtener material genético del embrión pero su fiabilidad está todavía por evaluar (2), ya que no se ha establecido la correlación entre el DNA de fluido y el estatus cromosómico del embrión (7).

1.5. ANÁLISIS GENÉTICO

Una vez se ha obtenido el material genético, éste ha de ser analizado, para lo que se pueden utilizar diferentes técnicas: 1) la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la PCR cuantitativa (qPCR), que no requieren un paso de preamplificación y 2) hibridación genómica comparativa en metafase (mCGH), array CGH (aCGH), arrays de polimorfismos de un único nucleótido (SNP), *next generation sequencing* (NGS) y secuenciación masiva paralela (MPS), que requieren un primer paso de amplificación de todo el genoma (WGA) (2).

- a. **FISH:** es una técnica que permite el análisis de un número limitado de cromosomas, habitualmente de 9 cromosomas. Posibilita la detección de aproximadamente el 83% de aneuploidías en abortos espontáneos (1). Sin embargo, esta técnica tiene una sensibilidad escasa y las aneuploidías pueden ocurrir en cualquiera de los 24 cromosomas en los embriones preimplantados, razón por la cual esta técnica está quedando obsoleta (3).
- b. **qPCR:** se trata de una técnica rápida y barata ya que no requiere WGA. Otra posible ventaja es que se pueden introducir fácilmente primers adicionales que permiten estudiar alteraciones de un solo gen, deleciones y duplicaciones pequeñas, alteraciones mitocondriales o translocaciones no balanceadas (8).

- c. **Array CGH:** es una técnica diagnóstica accesible que permite el análisis de los 24 cromosomas en biopsias tanto de día 3 como de día 5. Además se puede emplear para identificar embriones no balanceados en portadores de translocaciones Robertsonianas y recíprocas, con una resolución de hasta 6MB en biopsias de trofoectodermo (9).
- d. **SNP:** al igual que la técnica anterior, tiene la desventaja de que es tiempo para obtener los resultados es largo y que tiene un alto coste (9).
- e. **NGS:** ofrece numerosas ventajas: 1) reduce el coste del análisis genético, 2) permite la detección de aneuploidías parciales o segmentarias como resultado de su potencial aumentado, 3) posibilidad de detección de mosaicismo en muestras multicelulares y 4) potencial de automatización para minimizar el error humano, reducir el tiempo de trabajo y aumentar la consistencia (3) (9). El NGS ha demostrado ser un método fiable para el *screening* de aneuploidias de embriones en estado de blastocisto, permitiendo la identificación y transferencia de embriones euploides, cuyo resultado es una gestación en evolución (3) (9). El *screening* basado en el NGS tiene una gran resolución y permite una detección precisa de desequilibrios tan pequeños como 14Mb (3).

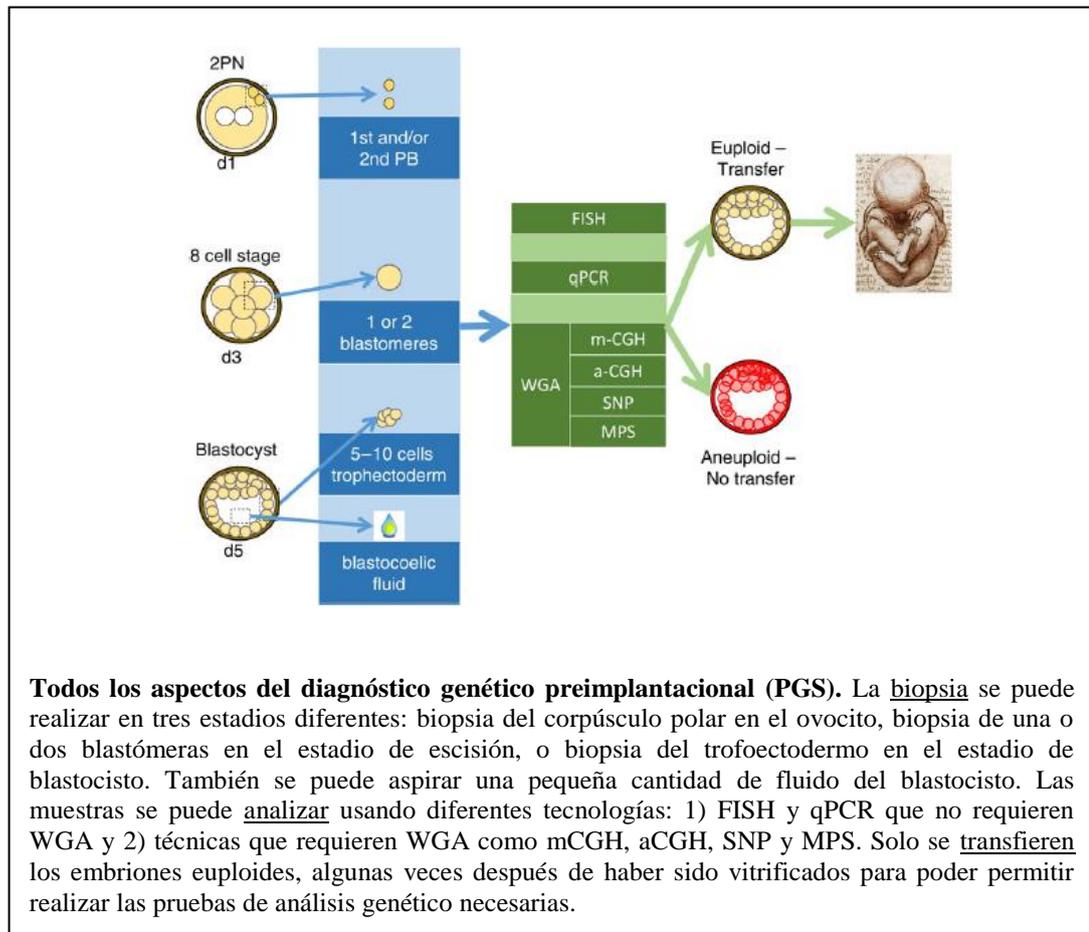
La reducción de los costes de secuenciación permite una mayor profundidad de lectura por muestra por el mismo precio, por lo que la aplicación del NGS también puede permitir la evaluación simultánea de trastornos de un solo gen y translocaciones de la misma biopsia sin la necesidad de múltiples plataformas tecnológicas (3).

Todas estas características proporcionan una oportunidad única de reducir los costes asociados al PGS y promover un mayor acceso a más pacientes (3).

Todos estos métodos se emplean para el estudio de aneuploidías completas o parciales de los cromosomas. La mínima detección para anomalías segmentarias no es la misma para todos los métodos, ni tampoco para la detección de mosaicismo en muestras multicelulares. Esto es realmente importante ya que es un tema de

debate si los porcentajes de aneuploidía en muestras de trofoectodermo son un reflejo verdadero de los porcentajes en la masa celular interna (2).

Figura 3: Todos los aspectos del diagnóstico genético preimplantacional.



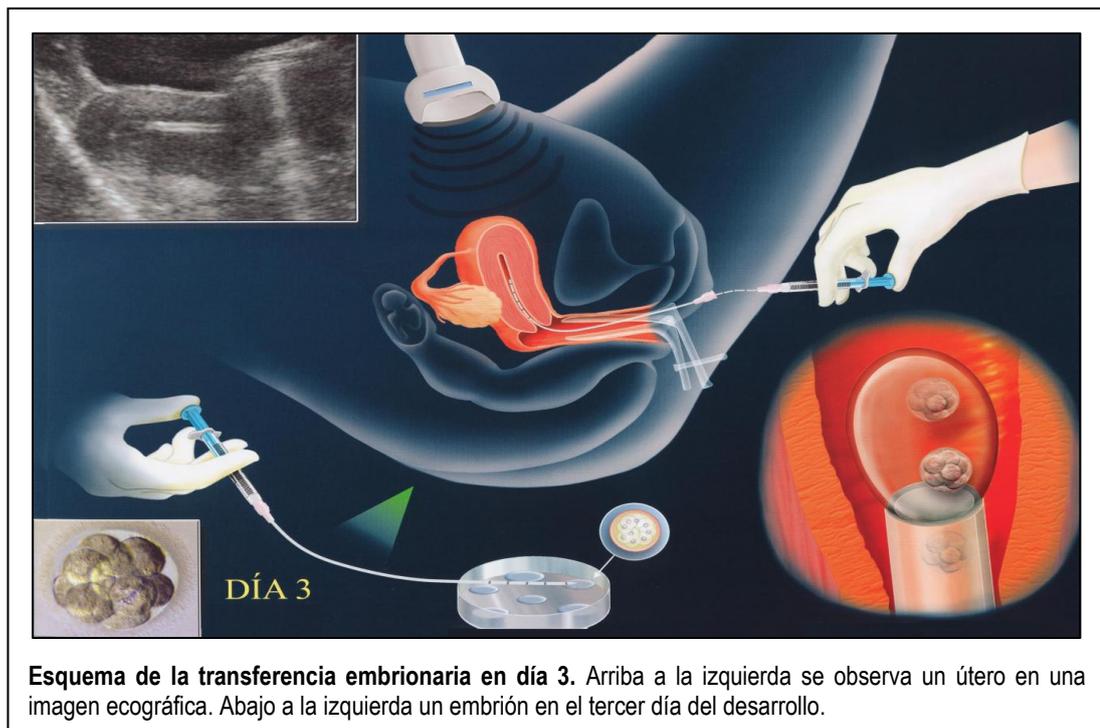
1.6. TRANSFERENCIA

La transferencia embrionaria (TE) intrauterina se define como el proceso mediante el cual se deposita en el útero los embriones generados mediante un proceso de fecundación in vitro (1).

Actualmente parece que el método más empleado está empezando a ser el *elective single embryo transfer*, en el cual se utilizan embriones vitrificados. La transferencia

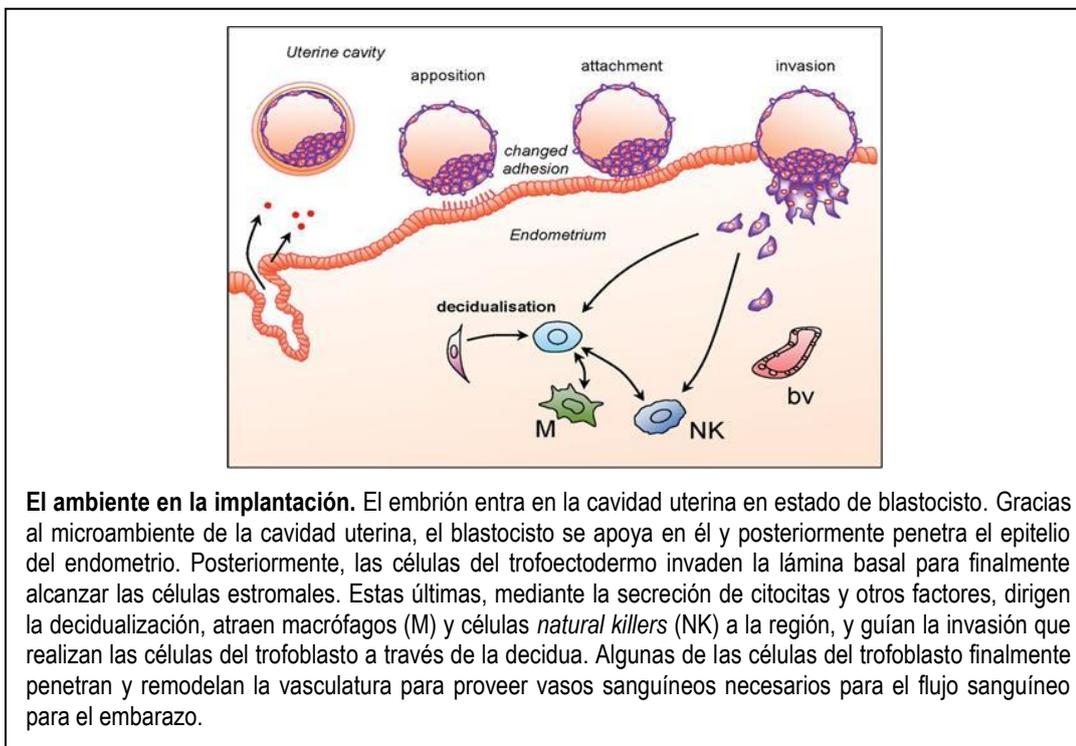
en día 3 está perdiendo importancia por el incremento de las biopsias de trofoectodermo, las cuales requieren transferencia en día 5 (2).

Figura 4: Esquema de la transferencia embrionaria en día 3.



El éxito de la implantación no solo depende de la calidad embrionaria, también depende de la receptividad endometrial y del microambiente en la cavidad uterina durante el periodo peri-implantacional. La ventana de implantación ó fase receptiva del ciclo menstrual ocurre entre los días 6 y 10 tras la ovulación, y cualquier alteración en el tiempo de desarrollo del endometrio en cada ciclo está altamente implicada en fallos de la FIV. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que en pacientes de buen pronóstico, el 30% de la transferencia de embriones euploides en fresco no resulta en embarazo (10), **probablemente debido a un mal estado del endometrio.**

Figura 5: El ambiente en la implantación.



El ambiente en la implantación. El embrión entra en la cavidad uterina en estado de blastocisto. Gracias al microambiente de la cavidad uterina, el blastocisto se apoya en él y posteriormente penetra el epitelio del endometrio. Posteriormente, las células del trofoectodermo invaden la lámina basal para finalmente alcanzar las células estromales. Estas últimas, mediante la secreción de citocinas y otros factores, dirigen la decidualización, atraen macrófagos (M) y células *natural killers* (NK) a la región, y guían la invasión que realizan las células del trofoblasto a través de la decidua. Algunas de las células del trofoblasto finalmente penetran y remodelan la vasculatura para proveer vasos sanguíneos necesarios para el flujo sanguíneo para el embarazo.

La vitrificación es una técnica de enfriamiento ultrarrápido y su reciente introducción como un método efectivo de criopreservar embriones se ha convertido en un importante avance en los laboratorios de reproducción asistida (9).

Actualmente parece que la transferencia de embriones vitrificados está cada vez desplazando más a la transferencia en fresco. Esto se debe principalmente a los avances en los métodos de vitrificación y al descenso de la morbilidad y mortalidad tanto materna como fetal, sobre todo por la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica (9).

Tabla 2: Resumen del proceso de diagnóstico genético preimplantacional.

Biopsia día 3	Biopsia día 5
1. Estimulación ovárica controlada	1. Estimulación ovárica controlada
2. Punción y extracción de ovocitos	2. Punción y extracción de ovocitos
3. ICSI	3. ICSI
4. Biopsia de una blastómera y envío de la célula para su análisis (día 3)	4. <i>Hatching</i> asistido (día 3)
5. Cultivo de laboratorio hasta día 5	5. Cultivo embrionario hasta día 5
6. Recepción de los resultados de análisis genético. Valoración de la evolución embrionaria (día 5)	6. Biopsia de trofoectodermo y envío de éste para su análisis cromosómico (día 5-6)
Requisitos para transferir:	Vitrificación embrionaria a espera del resultado
<ul style="list-style-type: none"> • Embrión normal cromosómicamente • Correcta evolución 	En caso de embriones normales preparación del endometrio para transferencia en diferido
Vitrificación de embriones normales sobrantes	

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

En este momento hay un gran debate entre los diferentes grupos que se dedican a Reproducción Asistida sobre cuál es el mejor momento para la realización de la biopsia embrionaria. En este tema, además de cuestiones puramente científicas, se unen intereses económicos y la mayor o menor dotación tanto humana como de material de las diferentes unidades.

Por esta razón, el principal objetivo de este trabajo es comparar los resultados clínicos de las biopsias embrionarias en día 3 *versus* biopsias en blastocistos (día 5) realizadas en la clínica IVI Bilbao desde enero de 2016 hasta diciembre de 2016. Con los resultados obtenidos se pretenden establecer las indicaciones clínicas de ambos procedimientos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Este trabajo se trata de un estudio retrospectivo en el que se comparan los resultados clínicos de las biopsias embrionarias en día 3 y de las biopsias embrionarias en día 5. Para su realización se recogieron los resultados obtenidos de biopsia embrionaria en día 3 y biopsia embrionaria en día 5 de la clínica IVI Bilbao desde enero de 2016 hasta diciembre de 2016.

La medida primaria de resultado fue la tasa de gestación, y las medidas secundarias de resultado incluían la tasa de normalidad y la tasa de supervivencia de los embriones estudiados.

La población de estudio estaba constituida por 255 pacientes que acudieron al centro IVI Bilbao desde enero de 2016 hasta diciembre de 2016 para realizar un tratamiento de FIV. En la consulta previa al tratamiento, todas las pacientes recibieron consejo genético sobre los riesgos y beneficios de realizar el *screening* genético preimplantacional (PGS).

3.2 BIOPSIA EMBRIONARIA EN DÍA 3

105 pacientes fueron candidatas para la realización de biopsia en día 3. Los **criterios de selección** fueron los siguientes: 1) edad materna avanzada, 2) fallo repetido de la implantación, 3) aborto recurrente de causa desconocida en pacientes con cariotipos normales, y 4) factor masculino severo. La media de edad de las pacientes fue de 37,5 años.

En primer lugar se realizó el tratamiento de **estimulación ovárica controlada**. Una vez el estado madurativo de los ovocitos era adecuado, se procedió a la punción y extracción de ovocitos asistida por control ecográfico. La fecundación *in vitro* se realizó mediante **inyección espermática intracitoplasmática (ICSI)**.

Figura 6: Inyección espermática intracitoplasmática.



El **día 3** del desarrollo se realizó la biopsia de 625 embriones de 105 pacientes. Los embriones fueron colocados en una placa de micromanipulación calefactada (37°C). Mediante el empleo de una pipeta de sujeción, el embrión fue girado de modo que la blastómera con el núcleo claro y diferenciado quedaba en la posición de las 3 en punto. Utilizando un láser infrarrojo se realizó un orificio de 20-25µm en la *zona pellucida* adyacente a la blastómera que se iba a retirar. La blastómera deseada se aspiró suavemente con una pipeta de biopsia mientras se evitaba el contacto o la interrupción de las células restantes del embrión, y después se colocó en un tubo de PCR de 0,2ml tras haber sido lavada en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS).

Figura 7: Fotografía de biopsia embrionaria en día 3.



El material se envió para su análisis cromosómico mediante *Next Generation Sequencing*. Los embriones fueron cultivados hasta el **día 5** a una temperatura de 37°C, 6,0% de CO₂, 5% de O₂ y 89% de N₂, en gotas de cultivo secuencial bajo aceite y se evaluaron diariamente hasta el estado de blastocisto. Posteriormente fueron vitrificados. De los 625 embriones biopsiados en día 3, 100 resultaron normales (**tasa de normalidad** de 16,00%).

Una vez recibidos los resultados del análisis genético se seleccionaron para transferir un máximo de dos embriones euploides que hubieran presentado una correcta evolución embrionaria y se desvitrificaron (la **tasa de supervivencia tras la desvitrificación** fue del 87,00%). La **tasa de gestación** fue del 60,60% y la **tasa de implantación** del 50,00%.

3.3 BIOPSIA DE BLASTOCISTO EN DÍA 5

150 pacientes fueron candidatas para la realización de biopsia en blastocisto. Los **criterios de selección** para realizar la biopsia en día 5 fueron: 1) indicación (edad materna avanzada, fallo repetido de la implantación, aborto recurrente de causa desconocida en pacientes con cariotipos normales y factor masculino severo) y 2) rebiopsia por biopsias de embriones que se obtuvieron en día 3 y no tuvieron

información concluyente para dar un resultado. De las 150 pacientes, 113 se seleccionaron por indicación y 37 se eligieron para rebiopsiar. La media edad de las pacientes fue de 38 años.

En primer lugar, al igual que en el proceso para posteriormente realizar la biopsia embrionaria en día 3, se realizó el tratamiento de **estimulación ovárica controlada**. Una vez el estado madurativo de los ovocitos era adecuado, se procedió a la punción y extracción de ovocitos asistida por control ecográfica. La fecundación *in vitro* se realizó mediante **inyección espermática intracitoplasmática (ICSI)**.

El **día 3** del desarrollo se realizó el *hatching* asistido mediante láser, y se procedió al cultivo de los embriones a una temperatura de 37°C, 6,0% de CO₂, 5% de O₂ y 89% de N₂, en gotas de cultivo secuencial bajo aceite y se evaluaron diariamente hasta el estado de blastocisto.

Figura 8: Fotografía de embrión en el tercer día del desarrollo con un agujero en la *zona pellucida* (flecha) tras la realización del *hatching* asistido mediante láser.



El **día 5 ó 6** se realizó la biopsia de trofoectodermo de 548 blastocitos (de los cuales, 153 fueron desvitrificados) de las 150 pacientes. La muestra de 6-10 células fue aspirada mediante una pipeta de biopsia y separada del resto de células usando un láser. Todos los procesos de biopsia se realizaron en gotas de medio tamponado

superpuestas con aceite mineral en la placa calefactada de un microscopio, equipado con herramientas de micromanipulación. Tras la biopsia, las células de trofoectodermo biopsiadas fueron lavadas en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) y colocadas en tubos de PCR de 0,2ml.

Figura 9: Fotografía de biopsia de blastocisto en día 5



El material se envió para su análisis cromosómico mediante *Next Generation Sequencing*, y se vitrificaron los blastocistos a la espera de los resultados. De los 548 blastocistos biopsiados, 291 resultaron normales (**tasa de normalidad** de 53,10%). Se seleccionaron para transferir un máximo de dos blastocistos euploides basándose en criterios morfológicos y se desvitrificaron previos a la transferencia.

La **tasa de supervivencia** de embriones tras la desvitrificación fue del 90,20% y la **tasa de gestación** de 67,24%.

3.4 DEFINICIONES CLÍNCIAS

El término **gestación** se definió como la presencia de un saco intrauterino gestacional con actividad cardíaca fetal documentada mediante ultrasonidos. La ausencia de un embarazo identificable en el examen de ultrasonidos a pesar de un test de embarazo positivo se denominó **pérdida bioquímica del embarazo**.

La **tasa de gestación** se definió como el número de gestaciones entre el número de embriones transferidos, y la **tasa de gestación evolutiva** como la resta entre tasa de gestación y la tasa de aborto. La **tasa de supervivencia** se calculó basándose en el número de embriones que sobrevivieron a la desvitrificación entre el total de embriones vitrificados, y la **tasa de normalidad** basándose en el número de embriones biopsiados que resultaron genéticamente normales entre el número de embriones biopsiados en total.

4. RESULTADOS

Se biopsiaron y analizaron un total de 1173 embriones (625 biopsiados en día 3 y 548 biopsiados en 5) de 255 pacientes procedentes de la clínica IVI Bilbao. La media de edad de las 105 pacientes cuyos embriones fueron biopsiados en día 3 fue de 37,5 años. La media de edad de las 250 pacientes cuyos embriones fueron biopsiados en estado de blastocisto (día 5) fue de 38 años.

4.1. TASA DE NORMALIDAD

De los 645 embriones biopsiados el día 3 del desarrollo 100 resultaron euploides (tasa de normalidad del 16,00%). En el grupo de embriones biopsiados el día 5 del desarrollo se encontró una mayor proporción de embriones euploides (291 embriones euploides de los 548 embriones analizados, tasa de normalidad del 53,10%).

Como se puede observar, el número de embriones biopsiados el quinto día es menor que el de los embriones biopsiados el tercer día del desarrollo, a pesar de que el número de pacientes a cuyos embriones se les realizó esta última técnica eran menos de la mitad que las pacientes candidatas a la primera. Esto sugiere que no todos los embriones alcanzan el estado de blastocisto, debido, probablemente, a una posible selección natural, lo que se traduce en una importante reducción del trabajo de los embriólogos, evitando así el diagnóstico inútil. Además, la tasa de normalidad es mayor en los blastocistos biopsiados, es decir, la aneuploidía es menor, lo que sustenta la teoría de la posible selección natural.

4.2. TASA DE SUPERVIVENCIA TRAS LA DESVITRIFICACIÓN

La tasa de supervivencia tras la desvitrificación de la biopsia embrionaria en día 3 fue del 87,00%, y la de la biopsia embrionaria en día 5 del 90,00%. La diferencia en la supervivencia tras la desvitrificación es mínima ya que se han producido grandes avances en los métodos de criopreservación de embriones, convirtiéndose en un método efectivo y seguro para conservarlos.

4.3. TASA DE GESTACIÓN

La tasa de gestación de la biopsia embrionaria en día 3 fue del 60,60%, y la de la biopsia de blastocisto en día 5 del 67,24%. La mejora de los resultados de la tasa de gestación puede deberse a: 1) la disminución de los fallos de la amplificación genética gracias a una mayor cantidad de material para analizar (6-10 células), 2) compensación del mosaicismo al extraer un mayor número de células, y 3) la extracción de células extraembrionarias, siendo menos perjudicial para el embrión que la biopsia embrionaria en día 3.

Tabla 3: Resumen de los resultados.

	Biopsia embrionaria día 3		Biopsia embrionaria día 5	
Número de pacientes	105	250	255	
Edad media de las pacientes	37,5 años	38 años		
Número de embriones biopsiados	625	548	1173	
Tasa de normalidad	16,00%	53,10%		p<0,05
Tasa de supervivencia	87,00%	90,20%		p>0,05
Tasa de gestación	60,60%	67,24%		p>0,05

5. DISCUSIÓN

En el ámbito del diagnóstico genético preimplantacional (PGS) hay un continuo debate sobre el momento óptimo para la realización de la biopsia embrionaria como consecuencia de la falta de la comprensión completa de la génesis de embriones aneuploides humanos, que son los causantes de una gran parte de la falta de éxito de los tratamientos de FIV (11). La habilidad para prevenir gestaciones con embriones aneuploides permite a muchas pacientes evitar la carga física y emocional que conlleva un aborto involuntario, a pesar que de la aneuploidía no es la única causa de aborto y esta estrategia de selección no eliminaría por completo los abortos (12).

Sin embargo, es importante mencionar que la mayor parte de los datos citogenéticos obtenidos durante las investigaciones del PGS se obtienen a través del análisis de células en puntos concretos del periodo de preimplantación, por lo que suele existir una de falta información fundamental previa o posterior del análisis (11).

Como se puede observar en los resultados, este estudio retrospectivo demuestra que la **tasa de gestación** tras la realización de biopsia embrionaria en día 5 es mayor que tras la realización de la biopsia embrionaria en día 3.

Estos resultados son compatibles con los resultados de un ensayo clínico aleatorizado y apareado, cuyo objetivo era determinar si la biopsia embrionaria en día 3 y la realizada en día 5 afectaban a la competencia reproductiva. Para ello, seleccionan dos embriones para transferir, uno era aleatorizado para la realización de la biopsia y el otro para control, y posteriormente ambos eran transferidos. Los resultados demostraron que la biopsia de blastómeras en el tercer día del desarrollo resulta en una reducción significativa de la implantación mantenida. La tasa de implantación mantenida tras la biopsia de blastocisto, sin embargo, fue equivalente a la de los blastocistos control (13). Es importante remarcar que este estudio no comparaba el impacto de la biopsia embrionaria en día 3 versus la biopsia de trofoectodermo en día 5. Los embriones a los que se les había realizado la biopsia en día 3 se comparaban con su embrión control del día 3 y los embriones a los que se les había realizado la biopsia en día 5 con su control respectivo.

En otro estudio clínico aleatorizado sobre la FIV con la transferencia de un único blastocisto euploide, se concluyó que, en mujeres menores de 42 años, transferir un solo blastocisto euploide proporcionaba tasas de gestación evolutiva equivalentes a las proporcionadas por haber transferido dos blastocistos no analizados previamente, además de reducir considerablemente el riesgo de un embarazo gemelar. Mejorando la selección del embrión para la primera transferencia, se obtienen excelentes tasas de embarazo en curso. Parece que la mejor manera de obtener el material para el análisis y posterior selección es la biopsia en el quinto día del desarrollo embrionario, que implica la extracción de células extraembrionarias destinadas a formar la placenta y las membranas, siendo más segura y precisa que la biopsia embrionaria en el tercer día (12).

Estos dos ensayos clínicos apoyan los resultados de un estudio observacional retrospectivo publicado en 2016, en el que se concluyó que transferir blastocistos euploides aumentaba significativamente las tasas de implantación, y consecuentemente, el éxito de nacimientos vivos en pacientes de hasta 42 años de edad. Estos resultados sostienen la creencia de que el momento ideal para la biopsia es el estadio de blastocisto, y que el PGS junto con la transferencia de embriones euploides desvitrificados son una opción ideal para el éxito de la transferencia de un único embrión. De esta manera se ofrece a los pacientes un recorrido hasta la gestación justificado, rápido y emocionalmente más equilibrado (14).

Un metaanálisis que analizó si el diagnóstico genético preimplantacional (PGS) mediante *screening* cromosómico completo (*comprehensive chromosome screening*, CCS) mejoraba los porcentajes de implantación, concluyó que el PGS-CCS sobre biopsia de blastocisto aumentaba la tasa de implantación clínica y mantenida, mejorando así la selección de embriones, particularmente en pacientes con reserva ovárica normal. En este metaanálisis, todos los CCS realizados en las células de trofoectodermo reportaron una alta tasa de implantación clínica (>50%) y una alta tasa de implantación mantenida (>45%), confirmando otra vez más su favorable potencial reproductivo mediante la transferencia, generalmente *elective single embryo transfer*, de blastocistos euploides (15).

La biopsia de trofoectodermo en día 5 también parece mostrar una clara ventaja respecto a la biopsia embrionaria en día 3 a la hora de valorar los efectos beneficiosos del diagnóstico genético preimplantacional para pacientes con aborto recurrente idiopático. La biopsia embrionaria en día 5 parece no tener ningún efecto perjudicial en la implantación embrionaria, y combinada con el análisis completo de los cromosomas, puede incrementar significativamente las tasas de embarazo (16).

Se desconoce cuál es exactamente el momento óptimo, desde el ovocito hasta el final del desarrollo embrionario preimplantacional, para proceder a la biopsia y al análisis genético con el objetivo de detectar patrones anormales de segregación cromosómica en ovocitos o embriones provenientes de mujeres de edad avanzada. A pesar de este gran debate sobre el momento adecuado para la realización de la biopsia embrionaria, parece que posponer la biopsia hasta el estado de blastocisto podría proporcionar los resultados más fiables para el PGS (11).

Hasta en el 70% de los abortos espontáneos se ha reportado aneuploidía, y los datos hasta ahora obtenidos sugieren que la dramática disminución del éxito de los tratamientos de la FIV se debe principalmente a la aneuploidía. La tasa de aneuploidía aumenta con la edad materna de un 53% a un 93% en las biopsias embrionarias practicadas el tercer día del desarrollo, y de un 32% a un 85% en las biopsias de blastocisto. De ahí la importancia de la transferencia selectiva de embriones euploides, que no muestra diferencias en las tasas de implantación y gestación en pacientes de hasta 42 años. Sin embargo, a pesar de que con el PGS-CCS se ha podido mitigar el efecto de la edad materna avanzada, esto no ha sido posible en el grupo de pacientes mayores de 42 años (17).

Al igual que en este estudio, en otros estudios se ha observado que es más probable que los embriones biopsiados en día 5 sean euploides que los biopsiados en día 3, es decir, que la **tasa de normalidad** sea mayor (16) (18) (19). Esto podría deberse a que algunos embriones se bloquean por falta de potencial. De estos, la mayoría presentan DNA degradado y/o son aneuploides por lo que, el cultivo prolongado hasta el quinto día del desarrollo, permite la selección de embriones con mayores probabilidades de implantarse (18). Así, el proceso de selección, que sucede en la

placa de Petri, elimina la necesidad de biopsiar los embriones que no avanzarán más allá del tercer día de desarrollo. Biopsiar en el estado de blastocisto identifica los embriones con mayor probabilidad para ser cromosómicamente normales, además de más competentes para desarrollarse (18).

En algunos estudios se ha evidenciado que, en pacientes infértiles con una reserva ovárica disminuida, el porcentaje de blastocistos aneuploides es significativamente mayor (57% *versus* 49%) y una mayor incidencia de ausencia de embriones euploides para transferir (25% vs 13%) (20). Esa mayor tasa de aneuploidía era más significativa en pacientes menores de 38 años. Sin embargo, a pesar de esta menor tasa de normalidad, una vez identificado un blastocisto euploide, el potencial de implantación tras la transferencia era independiente de los parámetros de reserva ovárica (21). Al compararse dos grupos de pacientes, uno con abortos recurrentes, y el otro con abortos recurrentes y reserva ovárica disminuida (lo que condiciona una mayor tasa de aneuploidía), se observó que en los pacientes que obtuvieron embriones euploides, el potencial de implantación fue similar en ambos grupos (61% *versus* 59%) y la tasa de aborto baja en ambos a pesar de la diferencia en la reserva ovárica (20).

De todas formas, los clínicos que ofrecen la posibilidad de realizar un test cromosómico deberían advertir a sus pacientes que la transferencia embrionaria podría no ser posible en todos los ciclos, incluso en pacientes jóvenes. A pesar de que los nuevos procesos de selección embrionaria mediante PGS-CCS pueden implementar las tasas de implantación en todos los grupos de edad, podrían no aumentar las tasas de gestación en pacientes que no producen ningún embrión euploide. Desgraciadamente, este tipo de pacientes son relativamente frecuentes cuando aumenta la edad materna o cuando se trata de pacientes con una reserva ovárica disminuida, cuya única opción sería la donación de ovocitos (17).

Por último, mencionar los resultados de una revisión sistemática de *Cochrane*, en la que se remarca que actualmente no existe evidencia de alta calidad que demuestre que la tasa de nacimientos vivos ni que el embarazo clínico sean mayores tras la transferencia en fresco en estadio de blastocisto, en vez de tras la transferencia en

fresco en estadio de escisión. Estos resultados sugieren que si el 29% de las mujeres alcanzan el nacimiento de recién nacido vivo tras la transferencia en fresco en estadio de escisión, entre el 32% y el 42% lo harán tras la transferencia en fresco en estadio de blastocisto. Por tanto, aunque parece que existe un beneficio en la transferencia de blastocistos en fresco, no está claro si el día de la transferencia repercute en las tasas acumuladas de parto vivo y embarazo (22). Pero se debe tener en cuenta que estos resultados son de embriones no biopsiados, y por tanto, no caracterizados cromosómicamente.

Este estudio presenta diversas **limitaciones**. Se trata de un estudio observacional retrospectivo, y no de un estudio ni prospectivo ni experimental aleatorizado, además de solamente contener un limitado número de pacientes, pero sus resultados podrían ser utilizados para realizar en un futuro estudios más sofisticados.

6. CONCLUSIONES

Con la evidencia científica publicada hasta el momento, a pesar de que se desconoce exactamente cuál es momento óptimo para la realización de la biopsia embrionaria, parece que **posponer la biopsia hasta el estado de blastocisto podría proporcionar los resultados más favorables (una mayor de tasa de gestación, tasa de normalidad de los embriones biopsiados y tasa de supervivencia tras la desvitrificación)**. De hecho, debido a los buenos resultados que se estaban obteniendo con la biopsia embrionaria en día 5, a lo largo del 2016 ésta sustituyó casi totalmente a la biopsia embrionaria en día 3.

Es cierto que la biopsia embrionaria en día 3 ofrece la posibilidad de transferencia en fresco sin necesidad de diferirla, pero la biopsia de trofoectodermo en día 5 ha demostrado muchas otras ventajas.

Las principales ventajas de este tipo de biopsia son: 1) obtención de una mayor cantidad de material genético que disminuye los fallos de amplificación, 2) mayor tasa de normalidad, en parte debida al menor número de embriones biopsiados, 3) compensación del mosaicismo al extraer un mayor número de células, 4) extracción de células extraembrionarias destinadas a formar la placenta y las membranas, siendo más segura y precisa que la biopsia embrionaria en el tercer día, 5) posibilidad de analizar los embriones por dos técnicas de análisis diferente debido a la mayor cantidad de material genético, y 6) posibilidad de rebiopsiar embriones previamente biopsiados en el día tres del desarrollo sin resultado concluyente.

Si bien es cierto que, generalmente tras la realización de la biopsia de trofoectodermo se realizará una transferencia electiva, gracias a los avances en las técnicas de vitrificación y la mejor receptibilidad endometrial, ésta está desplazando a la transferencia en fresco.

Por tanto, gracias a la **biopsia de trofoectodermo en día 5, el posterior PGS-CCS junto con la transferencia de embriones desvitrificados** se obtiene la posibilidad de prevenir gestaciones con embriones aneuploides, lo que permite a muchas pacientes evitar la carga física y emocional que conlleva un aborto involuntario.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado previamente, las recomendaciones generales para el diagnóstico genético preimplantacional son, en conclusión, las siguientes (23):

1. Antes de realizar el diagnóstico genético preimplantacional, se debe ofrecer a todos los pacientes consejo genético para asegurarse de que comprenden los riesgos de tener un hijo afectado, y los beneficios y limitaciones de las opciones disponibles para el diagnóstico preimplantacional y prenatal.
2. Las parejas deben ser informadas de que el diagnóstico genético preimplantacional puede reducir el riesgo de concebir un descendiente con una anomalía genética identificada en tests realizados en una única célula o en múltiples células del trofoectodermo.
3. Se recomienda la realización de tests prenatales o postnatales para confirmar los resultados del diagnóstico genético preimplantacional, ya que los métodos utilizados tienen limitaciones técnicas.
4. La biopsia de trofoectodermo no tiene impacto en el desarrollo del embrión, por lo que, siempre que sea posible, y bajo manos expertas, ésta deberá ser la técnica de biopsia de elección.
5. El diagnóstico genético preimplantacional de los trastornos de un solo gen debería realizarse idealmente con la reacción en cadena de la polimerasa junto con la biopsia trofoectodermo siempre que esté disponible.
6. Se recomienda el empleo del *screening* cromosómico completo junto con la biopsia de trofoectodermo en el diagnóstico genético preimplantacional de parejas con translocaciones cromosómicas porque se asocia a mejores resultados clínicos.
7. Antes de realizar el *screening* genético preimplantacional se debe asegurar que los pacientes comprenden completamente las limitaciones de las técnicas, el riesgo de error y el debate que aun existe sobre si el diagnóstico genético preimplantacional es necesario para mejorar los resultados de la fecundación *in vitro*.

8. El *screening* genético preimplantacional con hibridación fluorescente *in situ* y biopsia embrionaria en día 3 se asocia con una disminución de las tasas de gestación.
9. El *screening* genético preimplantacional con el *screening* cromosómico completo sobre la biopsia de blastocisto aumenta las tasas de implantación y mejora la selección de embriones en ciclos de FIV en pacientes con buen pronóstico.

Desde siempre me ha interesado mucho la investigación que se realiza en un laboratorio, y el campo de la Ginecología y la Reproducción Asistida me empezó a gustar después haber cursado la asignatura. El año pasado tuve la oportunidad de ir a un laboratorio de FIV donde aprendí la importancia del trabajo en equipo entre biólogos y médicos especialistas y cómo ese trabajo conjunto promueve una mejoría asistencial, lo que me impulsó a decidir realizar mi trabajo de fin de grado sobre este tema.

Gracias a haber realizado este trabajo y haber tenido la oportunidad de volver a acudir al laboratorio de FIV me he dado cuenta de que las decisiones médicas no solo se deben basar en criterios clínicos, sino que han de tener un nivel suficiente de evidencia científica. Además he reflexionado sobre las diferencias entre la Medicina Pública y la Medicina Privada, y la desventaja que supone no poder acceder a esta última para algunas pacientes ya que las técnicas que se ofrecen en ella, aunque más caras, ofrecen una mejor oportunidad reproductiva. ¿No sería mejor, en casos concretos, plantear ofrecer estas técnicas a pacientes sin posibilidad de acceder a la Medicina Privada con el objetivo de obtener resultados satisfactorios y no someter a las pacientes a ciclos de tratamiento innecesarios? Y habiendo observado los resultados obtenidos hasta el momento, ¿no deberían plantearse la mayoría de los centros introducir la biopsia de blastocisto en día 5-6 en el diagnóstico genético preimplantacional?

7. BIBLIOGRAFIA

1. Remohí, Bellver, Matorras, Ballesteros, Pellicer. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 4ª edición. Madrid: Panamericana; 2012
2. Geraedts J, Sermon K. Preimplantation genetic screening 2.0: the theory. Mol. Hum. Reprod. [Internet]. 2016 (citado 2017). Disponible en: <http://molehr.oxfordjournals.org/content/22/8/839.long>
3. Florentino F, Bono S, Bricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Kokocinski F. Application of next generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation screening cycles. Human Reproduction. 2014. 29: 2802-2813
4. Dahdouh EM, Balayla J, Garcia-Velasco JA. Impact of blastocysts biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. Reproductive BioMedicine Online. 2015. 30: 281-289
5. Das M, Holzer H. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. Fertility and Sterility. 2012. 97 (5): 1021-1027
6. Scott KL, Hong KH, Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. 2013. 100 (3): 608-614
7. Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, De Rycke M, De Vos A. The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. Mol. Hum. Reprod. [Internet]. 2016 (citado 2017). Disponible en: <http://molehr.oxfordjournals.org/content/22/8/845.long>
8. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. Human Reproduction Update. 2015; 21: 727-747
9. Martin J, Cervero A, Mir P, Conejero Martinez JA, Pellicer A, Simon C. The impact of next generation sequencing technology on preimplantational genetic diagnosis and screening. Fertility and Sterility. 2013. 99: 1054-1061

10. Evans J, Hannan NJ, Edgell TA, Vollenhoven BJ, Lutjen PJ, Osianlis T. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Human Reproduction Update*. 2014; 20: 808-821
11. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S. 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. *Human Reproduction*. 2013; 28: 509-518.
12. Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*. 2013; 100: 100-107.
13. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy, significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility*. 2013; 100: 624-630.
14. Withney JB, Schiewe MC, Anderson RE. Single center validation of routine blastocyst biopsy implementation. *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33: 1507-1513.
15. Dahdouh EM, Balayla J, Garcia-Velasco JA. Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*. 2015; 104: 1503-1512.
16. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin A, Glassner M. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertility and Sterility*. 2012; 98: 675-680
17. Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertility and Sterility*. 2013; 100: 1695-1703.
18. Adler A, Lee HL, McCulloh DH, Ampeloquio E, Clarke-Williams M, Wertz BH. Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of

- blastomere and trophoectoderm biopsies. *Reproductive BioMedicine Online* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.018>
19. Huang J, Zhao N, Wang X, Qiao J, Liu P. Chromosomal characteristics at cleavage and blastocyst stages from the same embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32: 781-787.
 20. Shahine LK, Marshall L, Lamb JD, Hickok LR. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility.* 2016; 106: 1124-1128.
 21. Katz-Jaffe MG, Surrey ES, Minjarez DA, Gustofson RL, Stevens JM, Schoolcrafts WB. Association of abnormal ovarian reserve parameters with a higher incidence of aneuploid blastocysts. *Obstetrics & Gynecology.* 2013; 121: 71-77.
 22. Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2016, Issue 6. Art No: CD002118.
 23. Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *J Obstet Gynaecol Can.* 2015; 37(5): 451-463.