

**CERPO**

**Centro de Referencia Perinatal Oriente**  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



# Diagnóstico genético preimplantacional.

Dr. Javier Gálvez Herrera

PFE Medicina Materno Fetal

Dra. Susana Aguilera- Dra. Catherine Diaz.

18/06/2024

# Hoja de Ruta



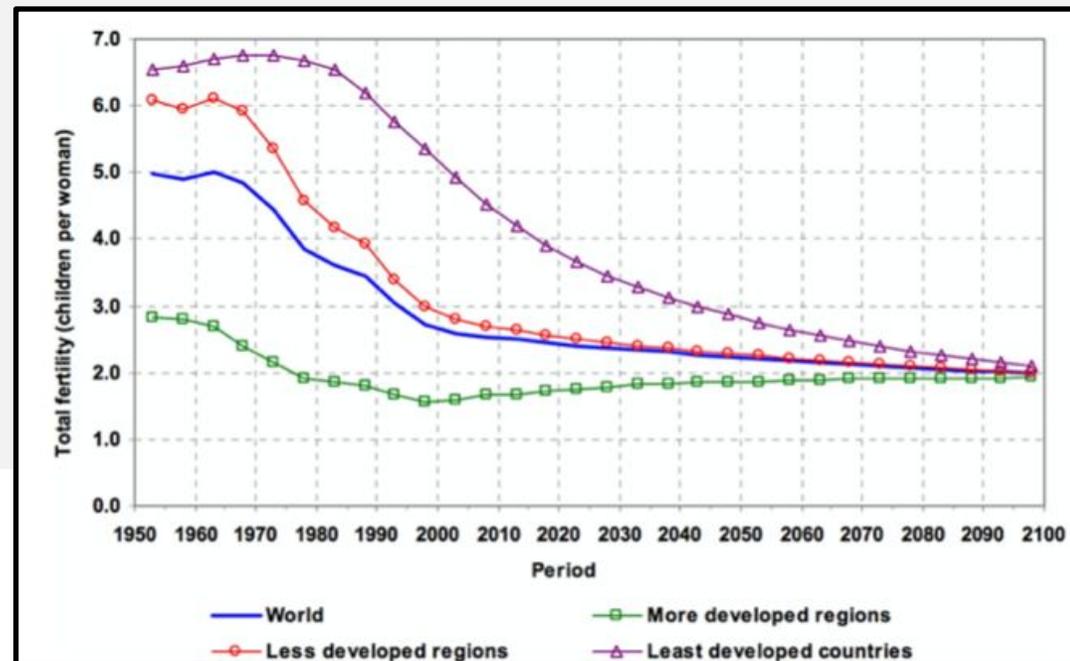
- Introducción: Infertilidad.
- Diagnostico preimplantacional.
- ✓ Generalidades
- ✓ Utilidad
- ✓ Indicaciones
- ✓ Biopsias
- ✓ Tipo de PGT.
  - Futuro: PGT no invasivo.
- Conclusiones



# Introducción.

- Infertilidad:

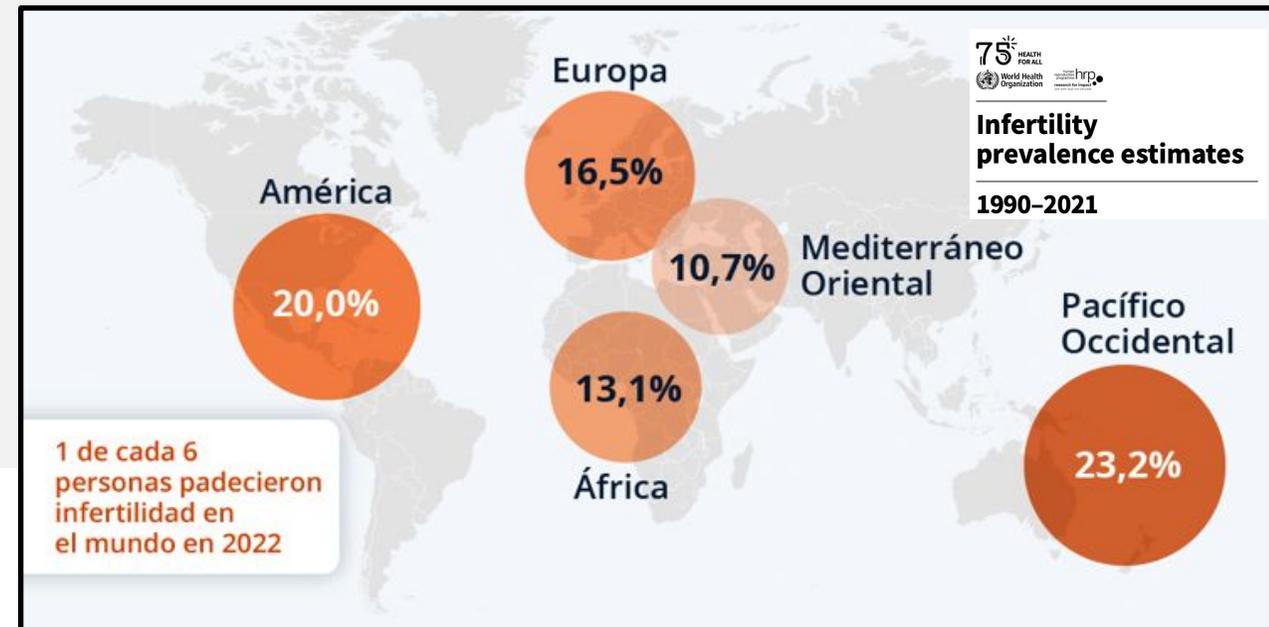
“Enfermedad caracterizada por la imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares y sin protección o por un deterioro de la capacidad de reproducción de una persona, ya sea como de forma individual o con su pareja”.



# Introducción.

- Epidemiología:
- ❖ Prevalencia: 17, 8% países de altos ingresos y 16,5 % países de ingresos medios y bajos.

Factor masculino	26%
Disfunción ovárica	21%
Lesiones Tuba uterina	14%
Endometriosis	6%
Problemas del coito	6%
Factor cervical	3%
Inexplicada	28%



# Introducción.



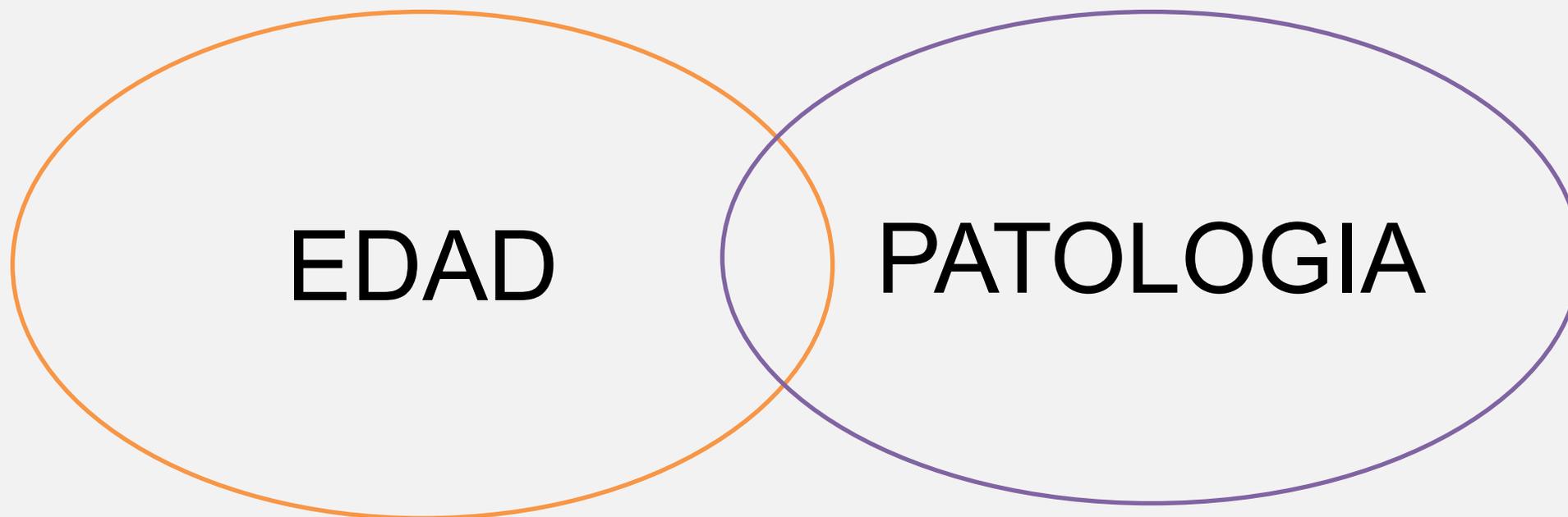
ETIOLOGIA

EDAD

PATOLOGIA

# CERPO

Centro de Referencia Perinatal Oriente  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



# Introducción.

## EDAD

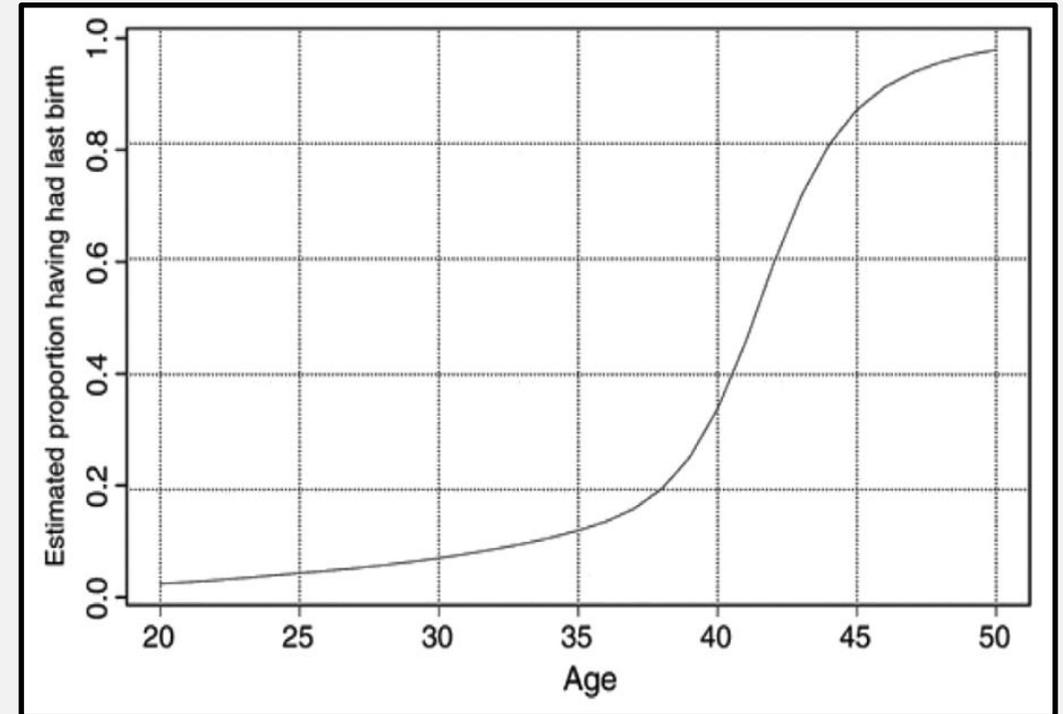
human  
reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Reproductive epidemiology*

### Too old to have children? Lessons from natural fertility populations

Marinus J.C. Eijkemans<sup>1</sup>, Frans van Poppel<sup>2,3</sup>, Dik F. Habbema<sup>4</sup>,  
Ken R. Smith<sup>5</sup>, Henri Leridon<sup>6</sup>, and Egbert R. te Velde<sup>4,7,\*</sup>

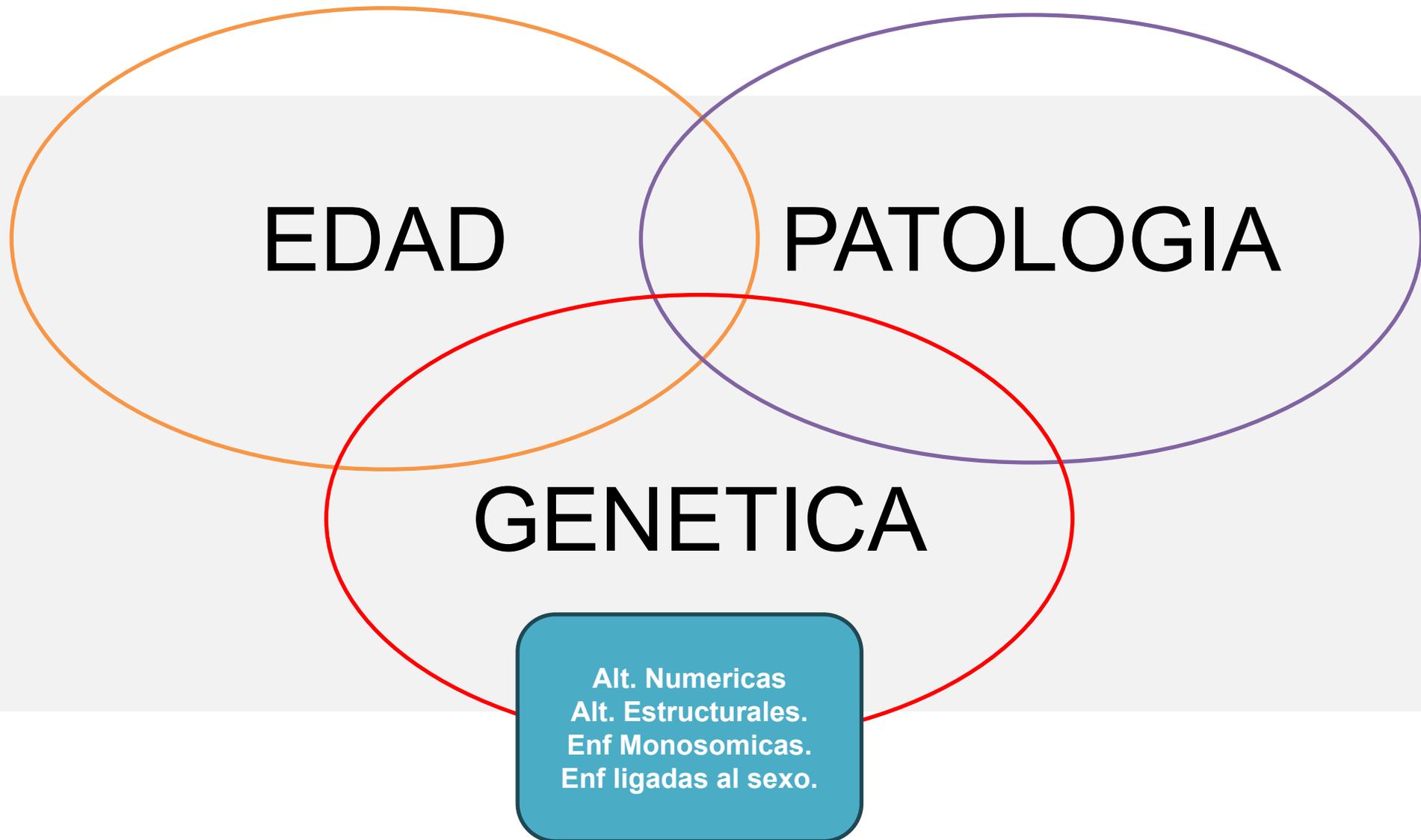
- 4,5% a los 25 años
- 12% a los 35 años
- 20% a los 38 años.
- 50% a los 41 años
- 90% a los 45 años
- 100% a los 50 años.



# Introducción.

## PATOLOGIA

Infertilidad		
Ambos sexos	Femenina	Masculina
<p>Alteraciones estructurales o lesiones del aparato genital</p> <p>Hipogonadismo hipogonadotrofo</p> <p>Hiperprolactinemia</p> <p>Trastornos de la función ciliar</p> <p>Fibrosis quística</p> <p>Infecciones</p> <p>Enfermedades sistémicas</p> <p>Enfermedades relacionadas con el estilo de vida</p>	<p>Insuficiencia ovárica prematura</p> <p>Síndrome de ovario poliquístico</p> <p>Endometriosis</p> <p>Fibromas uterinos</p> <p>Pólipos endometriales</p>	<p>Deficiencia testicular</p> <p>Deterioro post-testicular</p> <p>Dificultad en la erección</p>



# Diagnostico pre implantacional.

- Prueba que permite analizar el estatus genético y/o cromosómico de los embriones antes de su implantación en el útero.



# Historia PGT



Year	Landmark
1944	Harvard physician John Rock published the first report claiming successful IVF and cleavage of a human oocyte
1955	Shettles repeated Rock's work and reported successful culture to the morula stage in vitro of a human embryo
1976	Achievement of first pregnancy but ectopic pregnancy
1978	Delivery of the first IVF baby
1983	First pregnancy which used embryo cryopreservation
1984	Egg donation became publicly available
1986	First pregnancy which used oocyte cryopreservation
1989	PGD was pioneered by American embryologist to test for the presence of the gene defects that cause cystic fibrosis, and PCR was carried out to detect X-linked diseases
1990	Use of the first polar body biopsy to check for a maternal unaffected gene
1992	First baby was created using ICSI
1993	Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in PGD
1999	Researchers demonstrated the use of Comparative Genomic Hybridization (CGH) technology on human blastomeres to check for aneuploidies of all chromosomes
2001	First successful PGD with human leukocyte antigen matching for a sib with Fanconi anemia by haplotype analysis was introduced
2007	First controlled trial to compare three cycles of IVF with and without Preimplantation Genetic Screening (PGS) in women in the age group of 35–41 years
2008	Use of microarray and CGH platforms for the detection of aneuploidy of all 23 chromosome pairs
2010	Concept of Karyomapping was introduced
2011	First births reported after Preimplantation Genetic Diagnosis of structural chromosome abnormalities using array CGH (aCGH)
2013	Successful use of NGS technology for PGT-A
2017	Recommendations by the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) and the Practice Committee of the Society for ART (SART) issued for transferring single euploid cleavage stage or blastocyst embryo irrespective of the age group
2018	Comparison of aCGH versus NGS for PGT-A showed marginally improved results with NGS with eSET
2018	Researchers showed that the extent of mosaicism influences the success rate of IVF
2020	Use of scRNA-seq to look into the factors that might affect the development of 8-cell human embryos

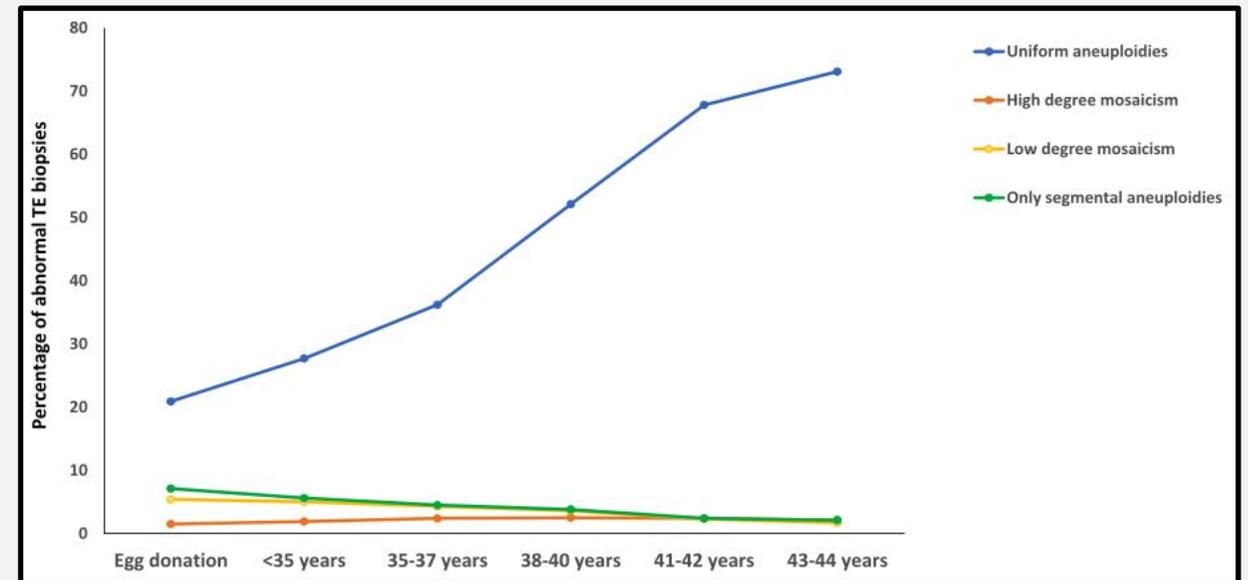
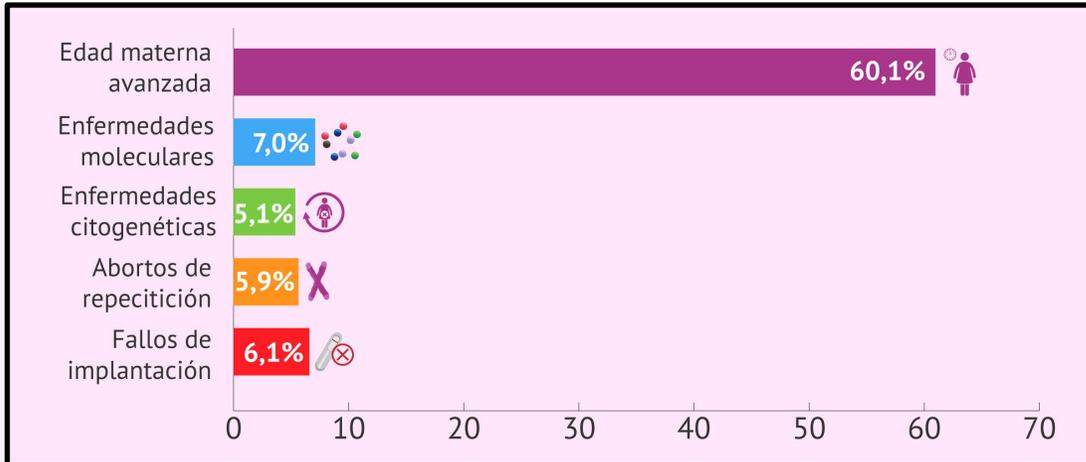
# Diagnóstico Pre implantacional.



- Objetivos:
- ✓ Identificar embriones sanos en una cohorte de la pareja de riesgo de transmisión.
- ✓ Evitar nacimientos cromosómicamente anormales.
- ✓ Reducir el riesgo de aborto espontáneo.
- ✓ Incrementar las tasas de éxito en TRA.
- ✓ Reducir el tiempo en conseguir un nacimiento de un niño sano.
- ✓ Mejorar la razón costo-eficiencia

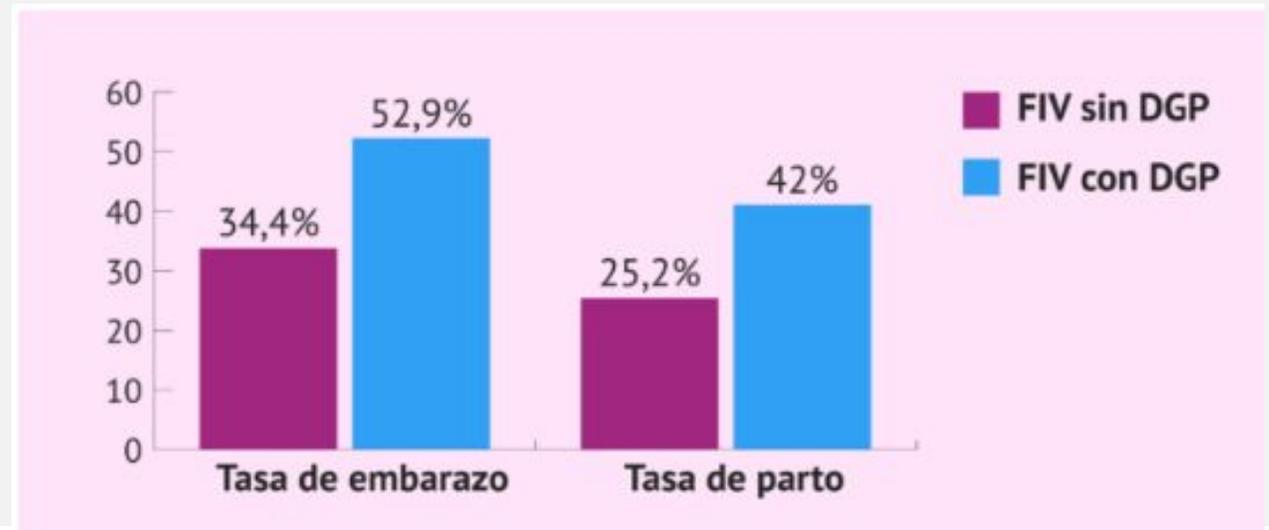
- Permite identificar:
- ✓ Embriones con trastornos monogénicos, anomalías cromosómicas numéricas y estructurales o trastornos mitocondriales.
- ✓ Embriones no afectados de una enfermedad previa en hermano para eventualmente servir de donante de células madre.
- ✓ Género del embrión
- ✓ Prevenir la transmisión de genes asociados a enfermedades de aparición tardía.

# Indicaciones

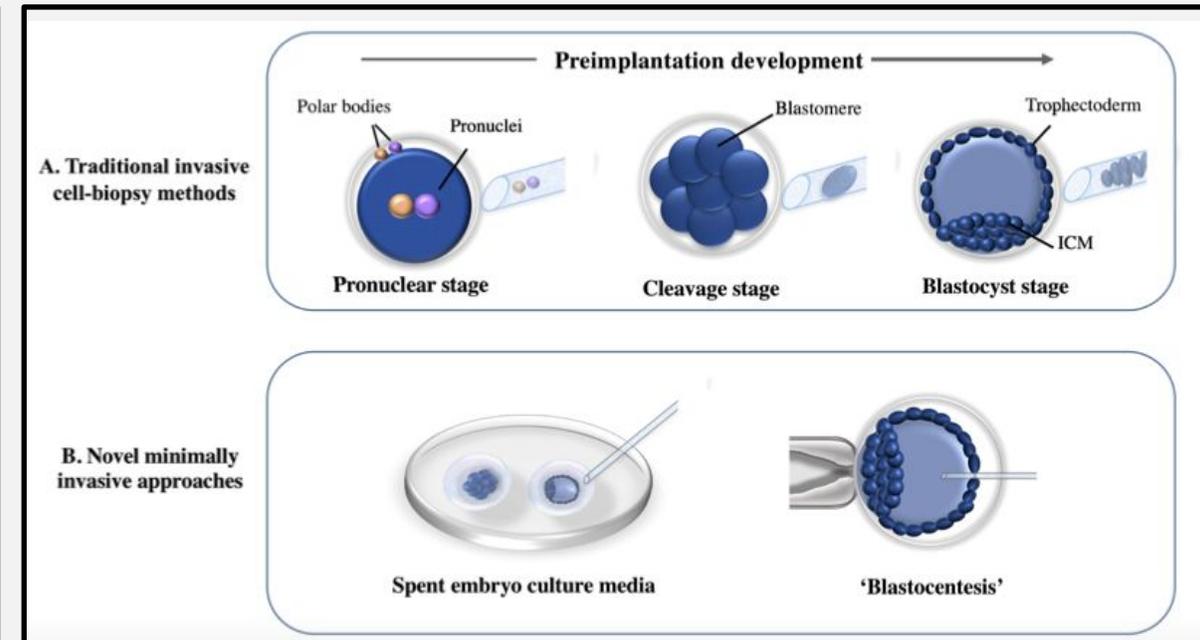
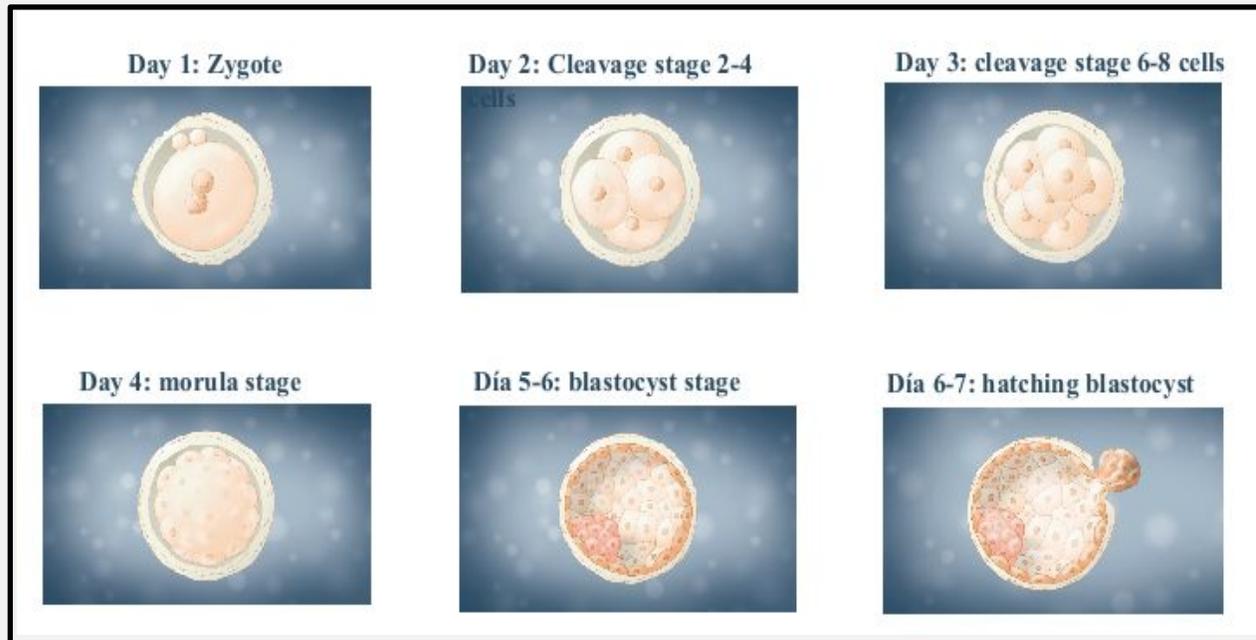


# Tasas de éxito

Tasa de embarazo.	☐	52,9%
Tasa de parto.	☐	42%
Tasa de parto único	☐	97,35%
Tasa de parto gemelar	☐	2,5%
Tasa de aborto	☐	16%



# ¿Cómo se obtienen las muestras?



# Biopsias.

- Obtención de ADN para análisis genético.
- Ovocito (corpúsculos polares)
- Directamente células del embrión.
  
- Comienzan con una abertura de la zona pelúcida:
  - ✓ Ruptura mecánica.
  - ✓ Ruptura química mediante ácido Tyrodes.
  - ✓ Láser.

Bp en fase  
de escisión

Bp de  
Blastocisto

Bp de  
Corpúsculo  
polar.

Bp en  
estadio de  
mórula

# Biopsias.

## En fase de escisión

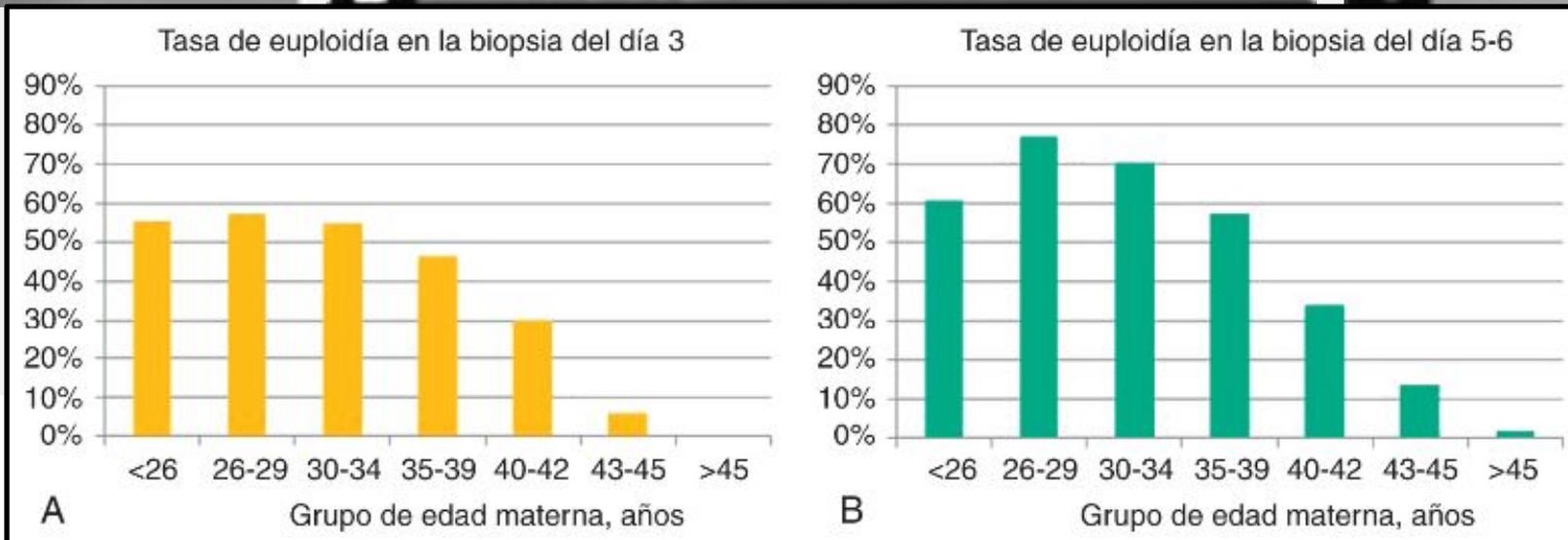
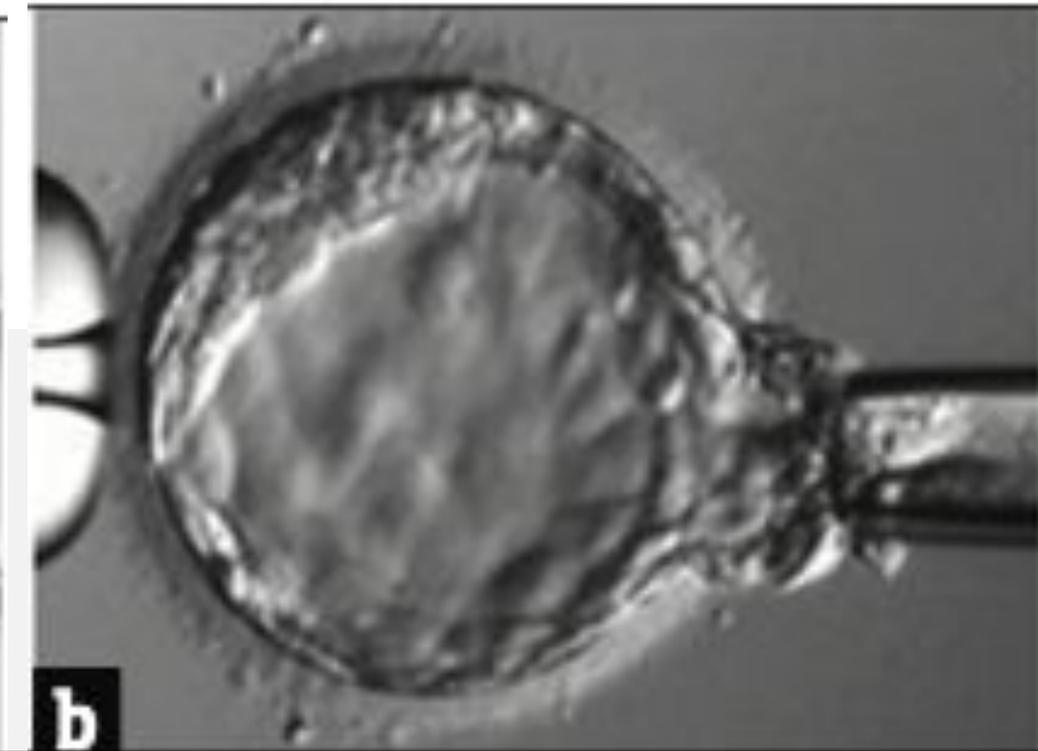
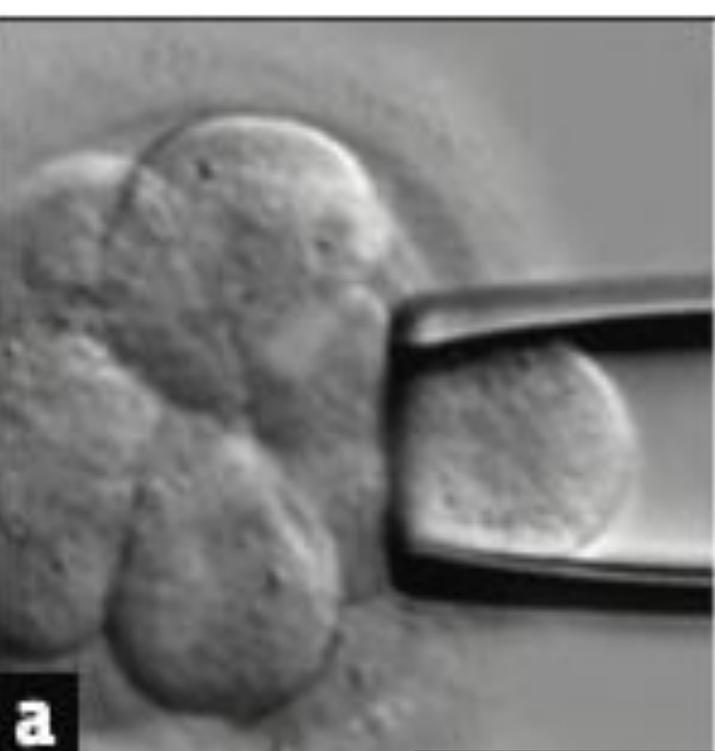
- Embriones de día 3 de desarrollo con al menos 6 blastómeras.
- Ventaja : No es necesario vitrificar los embriones.
- Desventajas:
  - Fallo de amplificación del material genético.
  - Material genético puede no ser representativo.
  - Reducción de la masa del embrión.

## Blastocisto

- Obtención de 5 a 10 células de TE.
- Día 5-6 de desarrollo embrionario
- Ventajas:
  - Reducción mínima de la masa total del embrión.
  - Extracción de células que no darán lugar al feto.
  - Bajo riesgo de fallo de amplificación del material genético.
  - Disminuye la cantidad de embriones a analizar.
- Desventaja: Tiempo

## Corpúsculo polar.

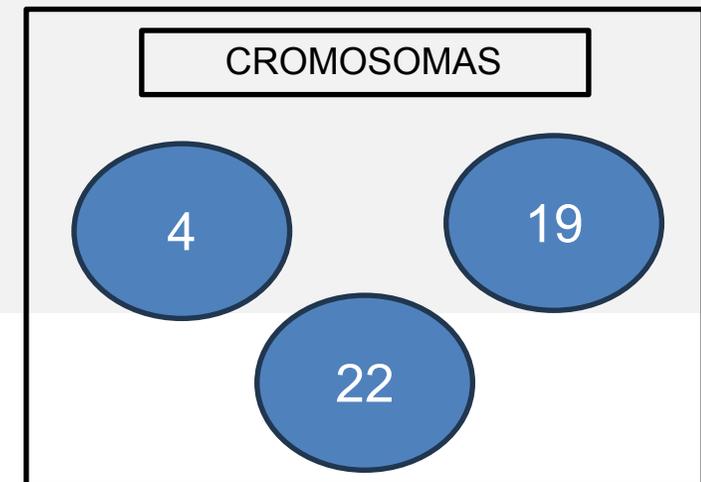
- Primer corpúsculo polar que acompaña al ovocito en metafase II.
- Segundo corpúsculo polar cuando se produce la fecundación
- Ambos para el análisis genético.
- Desventajas: analiza solo 1 o 2 células.



# Mosaicismo embrionario

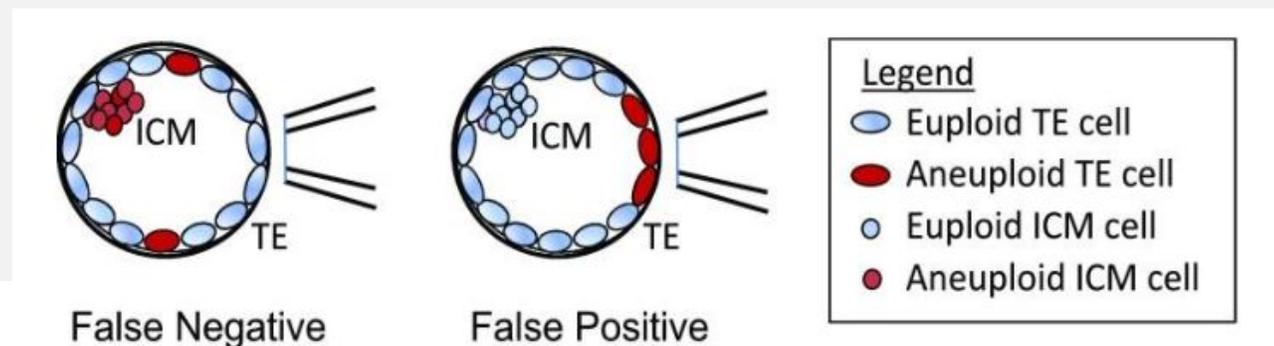


- Presencia de distintas líneas celulares en un mismo embrión, principalmente a errores en la mitosis tras la fecundación.
- La prevalencia de mosaicismo oscila entre el 2 % y el 13 % por blastocisto.
- No disyunción mitótica □ Anomalías cromosómicas complementarias (ganancias y pérdidas recíprocas)
- Retraso en la anafase □ Monosomías.
- Roturas cromosómicas □ Anomalías estructurales.
- Imprinting □ DUP



# Mosaicismo embrionario.

- Estudios surgieron que la transferencia de embriones mosaico pueden dar lugar a RNV sanos, aunque con tasas de embarazo más bajas.
- Transferencia de blastocistos mosaicos requiere una consideración cuidadosa con un buen asesoramiento genético.



Chromosomal mosaicism in human blastocysts: The ultimate diagnostic dilemma. Hum Reprod Update. 2020;26(3):313–34.

Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. c Natl Acad Sci U S A . 2019 Jul 9;116(28):14105-14112.



# ESHRE survey results and good practice recommendations on managing chromosomal mosaicism<sup>†</sup>

ESHRE Working Group on Chromosomal Mosaicism,  
Martine De Rycke <sup>1,\*</sup>, Antonio Capalbo<sup>2</sup>, Edith Coonen<sup>3,4</sup>,  
Giovanni Coticchio <sup>5</sup>, Francesco Fiorentino <sup>6</sup>,  
Veerle Goossens <sup>7</sup>, Saria Mcheik <sup>7</sup>, Carmen Rubio<sup>8</sup>,  
Karen Sermon <sup>9</sup>, Ioannis Sfontouris <sup>10</sup>, Claudia Spits <sup>9</sup>,  
Joris Robert Vermeesch <sup>11</sup>, Nathalie Vermeulen <sup>7</sup>,  
Dagan Wells<sup>12,13</sup>, Filippo Zambelli,<sup>14</sup> and Georgia Kakourou<sup>15</sup>

## Specific recommendations for embryo transfer

- When selecting embryos for transfer among euploid and low-range mosaics, the TE biopsy PGT-A result should be co-evaluated with embryo morphology and preferably not be assessed on its own.
- A new stimulation cycle is not recommended when embryos with 'low-range' mosaicism in their associated TE biopsy specimen are available for transfer.
- It is not acceptable to discard low-range mosaic embryos.
- Re-biopsy of embryos with a mosaic TE biopsy result for the purpose of confirming chromosomal/ploidy status is not recommended since there is no evidence that this has diagnostic value, and it may have a possible negative impact on further embryonic development and implantation.
- Specific recommendations relevant to the potential transfer of high-range mosaic embryos could not be formulated, due to insufficient data from currently available studies. In the absence of conclusive data, thorough genetic counselling is a prerequisite for transfer of a high-range mosaic embryo, whether in a research setting or routine clinical practice.

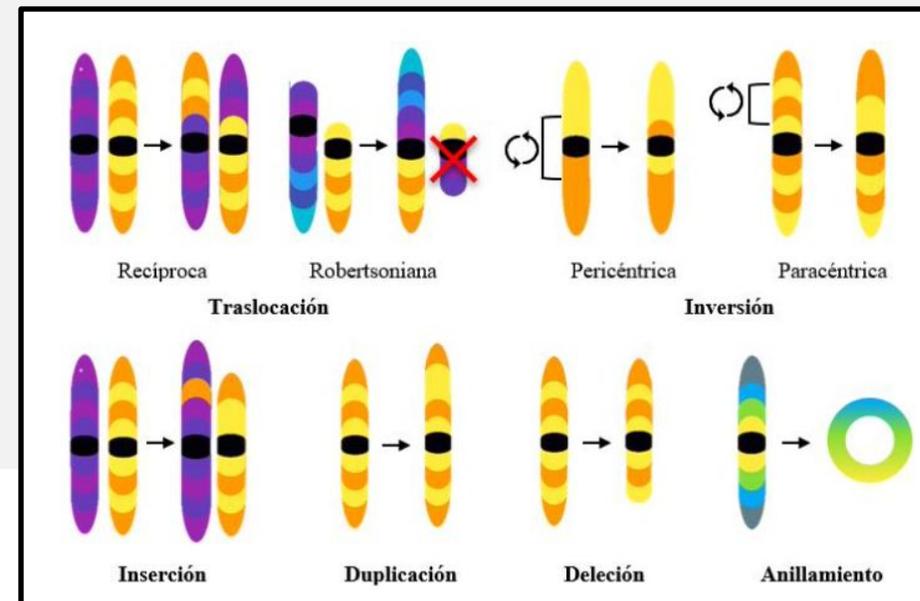
# PGT-SR

- Detección de alteraciones estructurales.
- Parejas portadoras de alguna alteración cromosómica estructural.
- Indicación: Cariotipo anormal previamente diagnosticado.
- Identifica embriones con reordenamiento cromosómico estructural, antes de su implantación y evitando su transferencia al útero.



# PGT-SR

- Tipos de reordenamientos cromosómicos estructurales:
- ✓ Translocaciones recíprocas y robertsonianas.
- ✓ Inversiones paracéntricas y pericéntricas.
- ✓ Inserciones.
- ✓ Deleciones.
- ✓ Duplicaciones.
- ✓ Anillamientos .



# PGT-SR mediante NGS.

- Lectura directa de fragmentos de ADN secuenciados y su cuantificación.
  - Detecta reordenamientos cromosómicos.
  - Automatizado (disminución de errores y costos).
  - Discrimina fragmentos más pequeños que otras técnicas.
  - Puede evaluar el mosaicismo embrionario cuando está por encima del 20%.
- 
- Limitaciones:
    - ✓ NGS estándar sin genotipo no puede detectar cambios de ploidía.
    - ✓ No discrimina embriones normales de los que tienen reordenamiento equilibrado
    - ✓ No detecta mosaicismo cromosómico por debajo del 20%
    - ✓ No detecta anomalías estructurales por debajo de su resolución definida.

# PGT-A

- Test genético preimplantacional para la detección de aneuploidías.
- Parejas con problemas reproductivos y cariotipo normal.
- Busca seleccionar embriones con un complemento cromosómico normal (euploide) y descartar los embriones anormales (aneuploides).

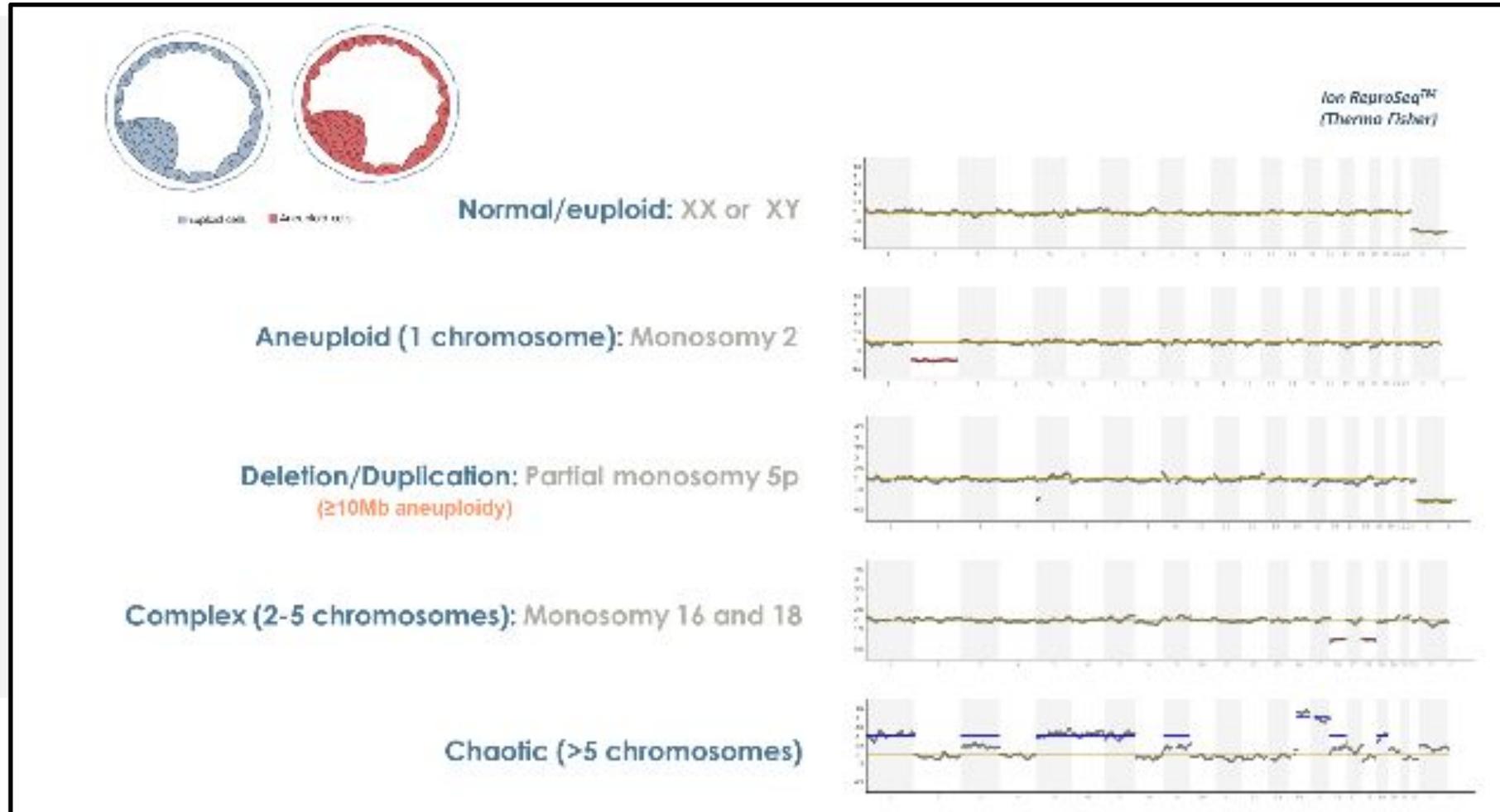
	25-34 años		35-37 años		38-40 años	
	PGT-A	Control	PGT-A	Control	PGT-A	Control
<b>Resultados</b>	<b>N=152</b>	<b>N=168</b>	<b>N=80</b>	<b>N=89</b>	<b>N=42</b>	<b>N=56</b>
β-HCG Negativo, n (%)	46 (30,3)	53 (31,5)	22 (27,5)	37 (41,6)	12 (28,6)	22 (39,3)
β-HCG Positivo, n (%)	106 (69,7)	115 (68,5)	58 (72,5)	52 (58,4)	30 (71,4)	34 (60,7)
Aborto bioquímico, n (%)	14 (9,2)	10 (6,0)	11 (13,8)	9 (10,1)	4 (9,5)	7 (12,5)
Aborto espontáneo, n (%)	17 (11,2)	14 (8,3)	5 (6,3)	10 (11,2)	5 (11,9)	6 (10,7)
Embarazo en curso a las 20 semanas de gestación, n (%)	75 (49,3)	89 (53,0)	42 (52,5)	33 (37,1)	20 (47,6)	21 (37,5)

# PGT-A mediante NGS.



- Mas utilizada
- Puede realizar PGT-A y PGT-M simultáneamente.
- Alto rendimiento.
- Alta resolución.
- Detecta mosaicismo cromosómico de bajo grado.
- Detecta aneuploidías parciales.

# PGT-A mediante NGS.



# PGT-M



- Detección de anomalías monogénicas.
- Riesgo de descendencia con enfermedades causadas por cambios en la secuencia de un gen.
- Objetivo: Seleccionar embriones sin variante génica patológicas.
- Puede analizar variantes patogénicas en ADN nuclear y mitocondrial.
- Se usa para tipificar el HLA o a pruebas de exclusión para enfermedades de aparición tardía.

# PGT-M



<b>Table 4. Monogenic diseases diagnosed by PGT-M</b>		
<b>Dominant Autosomal Diseases</b>	<b>Recessive Autosomal Diseases</b>	<b>X-Linked Diseases</b>
Familial adenomatous polyposis	Sickle-cell anemia	Duchenne muscular dystrophy
Huntington's disease	Spinal muscular atrophy	Becker muscular dystrophy
Breast cancer (BRCA1/BRCA2) mutations	Joubert syndrome	Chronic granulomatous disease
Retinoblastoma	Osteogenesis imperfecta	Fragile X syndrome
Kell antigen system	Gaucher disease	X-linked adrenoleukodystrophy
Myotonic dystrophy	Fanconi syndrome	
Peutz-Jeghers syndrome	Propionic acidemia	
Dilated cardiomyopathy	Cystic fibrosis	
Lynch syndrome	Homocystinuria	
Crouzon syndrome	Usher syndrome	
Polycystic kidney disease	Familial dysautonomia	
Brugada syndrome	Methylmalonic acidemia	
Multiple endocrine neoplasia	Alpha-1 antitrypsin deficiency	
Hereditary multiple osteochondromas		

# PGT-M

- Mínima cantidad de ADN de la muestra
- Se necesitan técnicas muy sensibles de amplificación del ADN.
- Basado en haplotipado.



# PGT-M



- Limitaciones:
  - ✓ Mayor riesgo de fallo de amplificación del ADN.
  - ✓ Mayor riesgo de contaminaciones externas.
  - ✓ Pérdida de uno de los dos alelos .
  - ✓ Enfermedades poligénicas.

Type of PGT	Indications
PGT-A (Aneuploidy screening)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Advanced maternal age (typically over 35 years)</li> <li>Repeated implantation failure</li> <li>History of recurrent miscarriages</li> <li>Previous pregnancy with chromosomal abnormalities</li> <li>Severe male-factor infertility</li> <li>Couples desiring to increase the chance of a successful pregnancy</li> </ul>
PGT-M (Monogenic/Single gene disorders)	<ul style="list-style-type: none"> <li>One or both partners are known carriers of a genetic disorder</li> <li>Family history of a specific genetic disorder</li> <li>Previous child with a genetic disorder</li> <li>Couples at risk of transmitting a heritable genetic condition</li> </ul>
PGT-SR (Structural rearrangements)	<ul style="list-style-type: none"> <li>One or both partners have a known chromosomal rearrangement (e.g., translocations, inversions)</li> <li>Previous pregnancy with structural chromosome anomalies</li> <li>Recurrent miscarriages with suspected chromosomal cause</li> <li>Infertility with suspected chromosomal cause</li> </ul>



# Perspectivas futuras para el PGT

- El PGT ha evolucionado significativamente a lo largo del siglo XXI.
- Plataformas de análisis más sensibles.
  
- Dificultades:
  - ✓ Biopsia requiere de equipos especializados y personal muy cualificado (costos).
  - ✓ La biopsia es invasiva que puede producir un posible daño afectando a la viabilidad del embrión.
  - ✓ El mosaicismo y su impacto en la precisión del diagnóstico al analizar únicamente 5-10 células de TE.

# Perspectivas futuras para el PGT



- Métodos no invasivos:
  - ADN libre de célula (ADNlc):
    - ✓ Medios de cultivo de embriones.
    - ✓ Líquido del blastocele.

# Análisis de ADN libre de células en medio de cultivo embrionario



- Secretoma.
- Medios de cultivo albergan ADN, incluso más que el secretado en el interior del blastocelo.
- ADNn y ADNm a partir del día 2-3 de desarrollo.



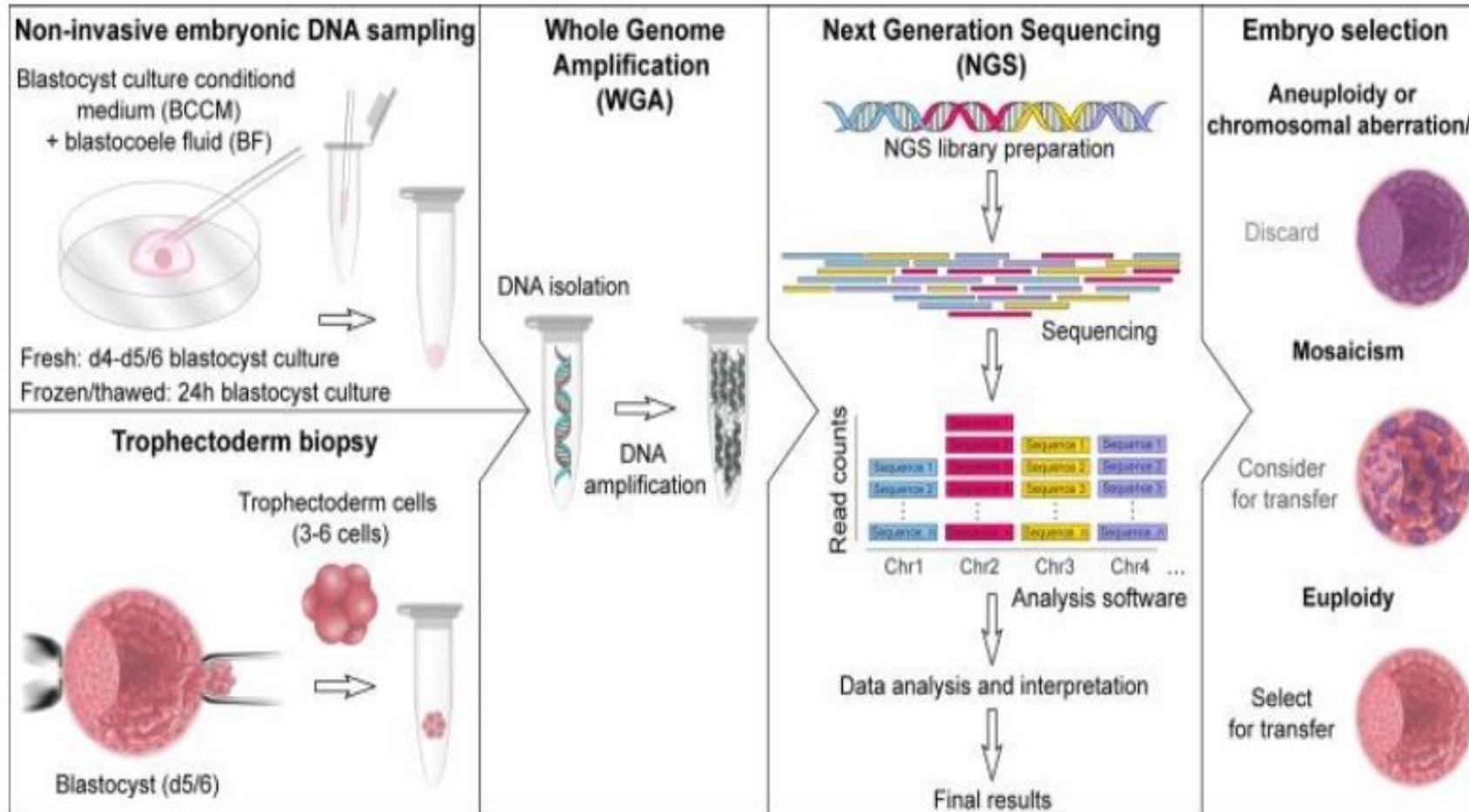
# Blastocentesis



- Extracción de líquido del blastocele
- Se perfora el TE y se aspira el máximo líquido del blastocele.
- Sin perjuicio para blastocisto.
- Ventajoso en vitrificación(menor formación de cristales de hielo)



# Resumen procedimiento



# Conclusiones



- Ha habido un incremento exponencial en el desarrollo y la evolución de las técnicas PGT.
- La biopsia de TE y NGS, son los enfoques que mayores ventajas aportan siendo los más usados en la actualidad para la realización de PGT.
- PGT no invasivo □ Futuro PGT.
- Se necesita una extensa estandarización de los procesos y regulación legal para su uso responsable.

# Referencias.



- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem. 2018;62(February):2–10.
- Parikh FR, Athalye AS, Naik NJ, Naik DJ, Sanap RR, Madon PF. Preimplantation genetic testing: Its evolution, where are we today? J Hum Reprod Sci. 2018;11(4):306–14.
- ESHRE survey results and good practice recommendations on managing chromosomal mosaicism. Human Reproduction Open, pp. 1–18, 2022
- Chen HF, Chen M, Ho HN. An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs. Taiwan J Obstet Gynecol. 2020;59(4):489–95.
- Coonen E, Rubio C, Christopikou D, Dimitriadou E, Gontar J, Goossens V, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations†. Hum Reprod Open. 2020 Mar 1;2020(3):1–20.
- Preimplantation genetic testing in the current era, a review . Archives of Gynecology and Obstetrics (2024) 309:1787–1799
- Genetics en human reproduction. Vivian de Oliveira Rodrigues, Fernanda Polisseni, Gabriel Duque Pannain, Miralva Aurora Galvão Carvalho. JBRA Assisted Reproduction 2020;24(4):480-491
- Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. RBMO VOLUME 44 ISSUE 5 2022.
- Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? Human Reproduction Update, Vol.26, No.1, pp. 16–42, 2020
- Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): The next revolution in reproductive genetics? Hum Reprod Update. 2020;26(1):16–42.
- Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. Biomed Res Int. 2016;2016.
- Bonovic M, Dhaenens L, Boel A, Menten B, Heindryckx B. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: The ultimate diagnostic dilemma. Hum Reprod Update

**CERPO**

**Centro de Referencia Perinatal Oriente**  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile



# Diagnóstico genético preimplantacional.

Dr. Javier Gálvez Herrera

PFE Medicina Materno Fetal

Dra. Susana Aguilera- Dra. Catherine Diaz.

18/06/2024