

Estudio del efecto inter cromosómico en portadores de anomalías cromosómicas estructurales equilibradas mediante PGT-SR

Study of the interchromosomal effect in carriers of balanced structural chromosomal rearrangements by PGT-SR

Pedro Mirete Martínez¹, Ramiro Quiroga², Juan Vicente Martínez Sanchís³, Sandra Monfort Membrado⁴, Marina de la Orden Rodríguez⁵, Trinidad García Gimeno⁶, Ana Monzó Miralles⁷

¹Universidad de Valencia

²Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Universitari i Politècnic La Fe

³Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Universitari i Politècnic La Fe

⁴Unidad de Genética. Hospital Universitari i Politècnic La Fe

⁵Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Universitari i Politècnic La Fe

⁶Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Universitari i Politècnic La Fe

⁷Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Universitari i Politècnic La Fe

RESUMEN

Introducción: Los portadores de anomalías estructurales cromosómicas equilibradas, a pesar de ser fenotípicamente normales, tienen una competencia reproductiva disminuida de manera significativa con respecto a la población general. Esto se debe a que, durante la gametogénesis, dependiendo de cómo se segregue la alteración cromosómica en la meiosis I, se generarán gametos normales, equilibrados o desequilibrados en mayor proporción que en portadores de cariotipos normales. Esta es la causa principal

Correspondencia: Ana Monzó Miralles
e-mail: amonzo2000@yahoo.com
SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: fertilidad@editorialmedica.com

de la mayor tasa de abortos y descendencia con alteraciones que presentan los individuos portadores de inversiones y translocaciones recíprocas o robertsonianas. Otra posible fuente de gametos y/o embriones aneuploides, es el denominado efecto inter cromosómico (EIC), que consiste en una interferencia producida por una alteración cromosómica estructural sobre la adecuada disyunción y segregación de otros cromosomas no involucrados en dicha alteración.

Material y Métodos: Un total de 40 parejas fueron incluidas en el estudio, de las cuales 31 pertenecieron al grupo de estudio: catorce translocaciones robertsonianas, trece translocaciones recíprocas y cuatro de inversiones pericéntricas. En diecinueve casos la mujer era portadora y en los doce restantes era el hombre el afecto. Nueve parejas con cariotipo normal, portadoras de una mutación responsable de enfermedad monogénica fueron incluidas en el grupo control. Se realizaron 57 ciclos de PGT-SR y PGT-M+PGT-A, mediante técnicas basadas en NGS y fueron analizados 180 embriones.

Resultados: Se observó que tanto la tasa como el número de embriones aneuploides fue mayor en el grupo estudio que en el grupo control (62,76 % frente a 31,43 %, $p = 0,011$). Entre los diferentes tipos de reordenamientos equilibrados, el porcentaje de embriones aneuploides fue mayor en translocaciones recíprocas, el porcentaje de embriones euploides fue mayor en translocaciones robertsonianas y el número y la tasa de embriones sin diagnóstico fue mayor en inversiones pericéntricas. Estas diferencias alcanzaron significación estadística. No se encontraron diferencias significativas en el efecto inter cromosómico entre portadores de reordenamientos ni comparados con el grupo control. Y los cromosomas más frecuentemente implicados en aneuploidías fueron el 16, el 22 y el 21.

Palabras clave: *Fecundación in vitro, test genético preimplantacional, reordenamientos cromosómicos estructurales, efecto inter cromosómico, aneuploidías.*

SUMMARY

Introduction: Carriers of balanced structural rearrangements, despite being phenotypically normal, they have a significantly decreased reproductive competence compared to the general population. The reason is because, during gametogenesis, depending on how the chromosomal alteration is segregated in meiosis I, normal, balanced, or unbalanced gametes will be generated in greater proportion than in carriers of normal karyotypes. This is the main cause of the higher rate of abortions and offspring with alterations that carriers of inversions, reciprocal translocations or Robertsonian translocations present. Another possible source of aneuploid gametes and/or embryos is the so-called interchromosomal effect (ICE), which consists of an interference produced by a structural chromosomal alteration on the proper disjunction and segregation of other chromosomes not involved in the rearrangement.

Material and methods: A total of 40 couples were included in the study, of which 31 belonged to the study group: fourteen Robertsonian translocations, thirteen reciprocal translocations and four pericentric inversions. As for the affected parent, in nineteen of the cases the woman was the carrier of the chromosomal alteration and in the remaining twelve it was the man who was affected. Nine couples with a normal karyotype, carriers of a mutation responsible for monogenic disease, were included in the control group. 57 cycles of PGT-SR and PGT-M+PGT-A were performed using NGS-based techniques, and 180 embryos were analyzed.

Results: It was observed that the rate and the number of aneuploid embryos were higher in the study group than in the control group (62.76% vs. 31.43%, $p = 0.011$). Among the different types of balanced rearrangements, the percentage of aneuploid embryos was higher in reciprocal translocations, the percentage of euploid embryos was higher in Robertsonian translocations, and the number and rate of undiagnosed embryos was higher in pericentric inversions. These differences reached statistical significance. No significant differences were found in the interchromosomal effect between rearrangement carriers or compared to the control group. The chromosomes most frequently involved in aneuploidies were 16, 22 and 21.

Key words: *In vitro fertilization, preimplantational genetic testing, chromosomal structural rearrangement, inter-chromosomal effect, aneuploidy*

INTRODUCCIÓN

Las anomalías estructurales cromosómicas (translocaciones recíprocas o robertsonianas e inversiones), son alteraciones en la estructura de los cromosomas causadas por la ruptura o la unión incorrecta de segmentos cromosómicos y que pueden producir o no pérdida de material genético. Si no hay pérdida de material cromosómico, hablamos de reordenamientos equilibrados, sin efectos fenotípicos en los portadores, ya que todo el material genético está presente, aunque organizado de manera diferente.

Las inversiones se producen cuando un cromosoma se fragmenta en dos puntos y se vuelve a reconstituir con el segmento entre las dos roturas invertido. Si en el fragmento invertido no se incluye en el centrómero se denominan inversiones paracéntricas y si se incluye inversiones pericéntricas. En estos casos, cuando en la meiosis I los cromosomas se aparean, se forma un asa cromosómica, lo cual puede dar lugar a gametos desequilibrados. Cuando la inversión es paracéntrica, los cromosomas recombinantes desequilibrados son típicamente acéntricos o dicéntricos, es decir, inviábiles, aunque existen excepciones (6).

Las translocaciones recíprocas son relativamente frecuentes y se dan cuando hay un intercambio recíproco de segmentos entre dos cromosomas no homólogos (en este caso el número de cromosomas no cambia). En la meiosis I, los cromosomas de un portador de esta anomalía se aparean formando un cuatrivalente, para más tarde segregarse en la anafase. Lo más frecuente es que los cromosomas se segreguen de una de estas tres formas: segregación alternante, adyacente-1 y adyacente-2. Las segregaciones adyacentes dan lugar a gametos desequilibrados y la segregación alternante, que es la habitual, produce gametos equilibrados. Estos tres tipos de segregación son 2:2, es decir, se van dos cromosomas a cada polo de la célula. Sin embargo, las translocaciones recíprocas también se pueden segregar en 3:1, dando lugar a gametos con 22 cromosomas y a gametos con 24 (7,8).

Las translocaciones Robertsonianas ocurren cuando dos cromosomas acrocéntricos se fusionan cerca de sus regiones centroméricas, perdiendo los brazos cortos y dando lugar a un cariotipo con 45 cromosomas en vez de 46. En estos casos, en la meiosis I, los cromosomas se aparean formando un trivalente y durante la anafase se segregan de tres formas diferentes: segregación alterante, segregación adyacente o segregación 3.0, siendo la segregación alternante la más frecuente y la única que produce gametos normales o equilibrados de los cromosomas implicados (6).

En resumen, los individuos portadores de inversiones o translocaciones, recíprocas o robertsonianas, a pesar de que

su fenotipo es normal, presentan un riesgo mayor que la población general de aborto o descendencia con alteraciones. Esto es así porque estas alteraciones cromosómicas producen una alteración de la meiosis, dando lugar a gametos desequilibrados de dos formas diferentes (9):

- La forma en la que la alteración cromosómica estructural se segregue en la meiosis I será la que determinará, para los cromosomas implicados, la proporción de gametos normales, equilibrados o desequilibrados generados.
- Por otra parte, en portadores de alteraciones cromosómicas estructurales puede producirse el denominado efecto intercromosómico (EIC), que consiste en una interferencia producida por una alteración cromosómica estructural sobre la adecuada disyunción y segregación de otros cromosomas no involucrados en dicha alteración, dando lugar a gametos aneuploides.

El término efecto intercromosómico (EIC) fue descrito por primera vez en la década de 1920 en *Drosophila*, y se utilizaba para describir un cambio en la distribución del material genético en presencia de una inversión (la frecuencia de entrecruzamiento era menor entre dos cromosomas homólogos si uno de ellos tenía una inversión, y paradójicamente había un aumento de entrecruzamiento en otros pares de cromosomas normales) (10).

Este efecto se ha observado en múltiples organismos, y no fue hasta 1963, cuando dicho término apareció en la literatura sobre genética humana de la mano de Lejeune. Sin embargo, en este caso se utilizó para describir la hipótesis de que una anomalía cromosómica estructural de un conjunto de cromosomas concreto podría inducir la no disyunción de cromosomas de secuencia normal que no participan en dicha anomalía (11).

En la actualidad, el EIC se atribuye a una alteración de la meiosis I por la formación de apareamientos heterosinápticos entre los cromosomas implicados en el reordenamiento, que interrumpen la alineación cromosómica en el huso y alteran la correcta segregación del resto de cromosomas (12).

Es un hecho que los portadores de reordenamientos equilibrados presentan el riesgo de generar gametos aneuploides para los cromosomas involucrados en la alteración. Sin embargo, no está clara la implicación del EIC como fuente adicional de riesgo, pues se han hecho diferentes estudios para observar si existe o no un efecto intercromosómico en los embriones de portadores de anomalías estructurales cromosómicas equilibradas pero los resultados no son homogéneos. Tampoco se ha descrito un efecto intercromosómico diferencial en función del sexo del portador o de la anomalía cromosómica, ni si este fenómeno implica a determinados cromosomas.

Las técnicas de PGT-SR basadas en secuenciación genómica de última generación (NGS de sus siglas en inglés *Next Generation Sequencing*) permiten detectar en embriones pérdidas o ganancias cromosómicas totales o parciales y estudiar posibles aneuploidías en los 23 pares de cromosomas y, de esta manera, contribuir a aumentar el conocimiento sobre el efecto intercromosómico en pacientes portadores de reordenamientos cromosómicos estructurales.

El objetivo principal de este estudio es analizar el porcentaje de embriones aneuploides en parejas portadoras de reordenamientos estructurales cromosómicos, comparados con un grupo control de parejas con cariotipos normales y estudiar posibles diferencias en función del tipo de reordenamiento, en función del sexo del progenitor afecto, valorando el efecto intercromosómico en estos casos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Se realizó un estudio retrospectivo de casos y controles.

Pacientes

Entre 2018 y 2021 se llevaron a cabo 57 ciclos de PGT-SR y PGT-M+PGT-A en 40 parejas, mediante técnicas basadas en NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*) en la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. El grupo de estudio estuvo formado por 31 parejas, de las cuales, 12 hombres y 19 mujeres eran portadoras de una anomalía estructural cromosómica equilibrada. Dentro este grupo, catorce eran portadores de translocaciones robertsonianas, trece de translocaciones recíprocas y cuatro de inversiones pericéntricas. El grupo control estuvo constituido por nueve parejas en las cuales uno de los miembros era portador de una mutación monogénica. En la Tabla 1 se muestra la distribución de las parejas en función del grupo y sexo.

Se analizó un total de 180 embriones y se realizaron un total de 26 transferencias embrionarias.

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión y exclusión en este estudio fueron los generales para cualquier caso de pareja portadora de una alteración genética susceptibles de PGT en el Sistema Nacional de Salud.

Criterios de inclusión:

- Cumplir los criterios y requisitos recogidos en la legislación sobre técnicas de reproducción humana aislada y firmar el consentimiento informado.

TABLA 1

Distribución de los pacientes por sexo en los grupos de estudio y control

	TOTAL	HOMBRES	MUJERES
Control (PGT-M + PGT-A)	9	3	6
Estudio (PGT-SR)	31	12	19
Translocación Robertsoniana	14	5	9
translocación recíproca	13	5	8
Inversión pericéntrica	4	2	2
	40	15	25

- Ajustarse a los principios éticos fundamentales y a la legislación vigente.
- Algún miembro de la pareja portador de una anomalía genética definida que implique un riesgo relevante de transmisión de una enfermedad grave a su descendencia, en lo que se refiere a severidad de la enfermedad, precocidad en la edad de comienzo de los síntomas y efectos sobre la calidad de vida en el futuro, que no disponga de tratamiento curativo postnatal.
- Disponer del correspondiente consejo genético y estudios de informatividad.

Criterios de exclusión:

- Diagnóstico genético no posible o incierto mediante técnicas habituales en uso para PGT.
- Posibilidades de éxito no aceptables o contraindicación para la aplicación de las técnicas de reproducción asistida.
- Edad de la mujer superior a 40 años.
- Enfermedad grave en la mujer (genética o no) que contraindique embarazo.

Estudios clínicos

- Historia clínica, personal y familiar, y comprobación del informe de análisis genético para determinar la factibilidad de la realización del tratamiento.
- Estudio básico de esterilidad (EBE): analítica general y serologías de hepatitis B, C, VIH y sífilis a ambos miembros de la pareja, estudio hormonal del ciclo, AMH y ecografía vaginal con recuento de folículos antrales (RFA) a la mujer y espermiograma al hombre.
- Asesoramiento genético y reproductivo, donde se informó de las posibilidades de éxito de tratamiento y los plazos para su realización, riesgos y complicaciones, así como de las alternativas.

- Estudio de informatividad, específico para la optimización del protocolo del análisis genético en cada caso. Para cada una de las parejas, se llevó a cabo la extracción de un tubo de sangre de 5mL con EDTA a cada uno de los miembros de la pareja.

En el grupo de estudio, el estado de portador de reordenamiento equilibrado se confirmó con el análisis molecular que se realizó en los linfocitos obtenidos de la extracción de sangre periférica de la pareja a estudio.

En el grupo control, se realizó estudio de haplotipos SNP a partir de muestra de ADN de ambos miembros de la pareja y de los familiares de primer grado del progenitor afecto de la alteración genética.

Estimulación ovárica y recuperación de ovocitos

En todos los casos se utilizó el protocolo corto con antagonistas de GnRH, individualizando la dosis diaria de gonadotrofinas (FSH o hMG) en función de la edad de las pacientes, de su reserva ovárica, valorada según los niveles de hormona antimülleriana (AMH), el recuento de folículos antrales (RFA) y la respuesta ovárica a ciclos previos, si los hubo.

La estimulación se inició en fase folicular temprana de un ciclo menstrual espontáneo o tras anticonceptivos orales. La monitorización de la estimulación se realizó mediante ecografía transvaginal y determinación de estradiol sérico.

Cuando se observó que los folículos tenían un diámetro mayor o igual a 14 mm, se inició la administración de antagonistas de GnRH (ganirelix, Orgalutran®, Organon o cetrotrelis, Cetrotide®, Merck) a dosis de 0,25 mg/día. Cuando los folículos alcanzaron un diámetro medio de 16-18 mm, se indujo la maduración final de los ovocitos administrando 650 mcg de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (Ovitrelle, Merck, Madrid), programando la punción folicular 36 horas después. En caso de detectar riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica por niveles de estradiol superiores a 3.500 pg/mL o más de 20 folículos de diámetro mayor de 14 mm, la hCG fue sustituida por 0,2 mg de acetato de triptorelina (Decapeptyl, Ipsen Pharma, Barcelona).

La punción folicular se realizó mediante una aguja de aspiración acoplada a una sonda transvaginal de 6'5 MHz, en el quirófano y con anestesia.

Los líquidos foliculares aspirados de cada una de las pacientes fueron trasladados en tubos estériles de aspiración atemperados a 37°C en bloques térmicos, al laboratorio de FIV contiguo al quirófano. Se procedió a la identificación y recuperación de los complejos cúmulo-ovocito (CCO) presentes en el líquido folicular en una cabina de flujo la-

minar con superficie calefactora a 39°C y bajo condiciones estrictas de asepsia.

Los CCO fueron identificados bajo un estereomicroscopio binocular y depositados con una pipeta Pasteur en una primera placa de lavado. A continuación, los CCO fueron transferidos a una segunda placa de lavado para eliminar restos hemáticos y células de la granulosa. Tras lo cual los CCO se colocaron en una placa diferente y se dejaron en incubación (37°C, 6% CO₂) entre 2 y 4 horas.

ICSI

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la denudación ovocitaria, a través de un método enzimático y otro mecánico. Tras la denudación, los ovocitos fueron clasificados según su estadio madurativo y los Metafase II (MII) fueron microinyectados.

En todos los casos, el proceso de fecundación se llevó a cabo mediante ICSI.

A las 16-18 horas de la microinyección se evaluaron los ovocitos y se seleccionaron solo aquellos que presentaron signos de una fecundación normal, es decir, aquellos que mostraban dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Los ovocitos que presentaban uno, tres o más pronúcleos fueron clasificados como ovocitos con fecundación anómala y por tanto fueron descartados junto con aquellos que no mostraban signos de fecundación, ya que no presentaban ningún pronúcleo.

Los cigotos de fecundación normal fueron guardados en el incubador a 37°C y 6% de CO₂ hasta la evaluación de la calidad embrionaria en día +5.

Entre las 114-118 horas postinseminación, se evaluó de nuevo la morfología embrionaria. Los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto fueron clasificados según la caracterización tanto de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TE) según los criterios morfológicos establecidos por ASEBIR 2015.

Aquellos embriones que eran blastocistos expandidos de calidad A, B o C, fueron seleccionados para biopsiarlos.

Biopsia embrionaria

Los embriones que eran blastocistos expandidos o cavitados con MCI visible fueron biopsiados. Los embriones que estaban menos evolucionados de dejaron un día más en cultivo para valorar su posible biopsia al día siguiente. Para la biopsia embrionaria se utilizó un láser RI Saturn 5 Active™ montado en un microscopio invertido Olympus IX70. Para la manipulación de los embriones se utilizó una pipeta de sujeción y una pipeta de biopsia.

Cada uno de los embriones se dispuso en una placa previamente preparada y rotulada. Para realizar la biopsia, con la ayuda de la pipeta de sujeción se orientó el embrión de forma que la MCI estuviese cerca de dicha pipeta. Se realizaron de 2 a 4 pulsos laser en la zona pelúcida más alejada de la MCI del embrión y con la ayuda de la pipeta de biopsia se biopsiaron de 4 a 8 células del trofoectodermo.

Una vez realizada la biopsia embrionaria, se realizó el tubbing de las células biopsiadas que fueron remitidas para el estudio genético.

Diagnóstico genético en células de trofoectodermo

El material obtenido tras la biopsia embrionaria fue utilizado para llevar a cabo el PGT mediante NGS para la detección de alteraciones estructurales desequilibradas (PGT-SR) o numéricas (PGT-A) y, en caso de PGT-M, el estudio de los haplotipos basados en SNPs. Para realizar el estudio genético se amplificó el material siguiendo el protocolo de SurePlex (Illumina, CA, USA), y se congeló el material amplificado. Posteriormente, se realizaron las librerías para NGS con el kit VeriSeq PGS (Illumina) y se secuenciaron en el equipo MiSeq (Illumina), siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Este kit permite detectar aneuploidías de cromosomas enteros y también deleciones y duplicaciones parciales de gran tamaño (mayores de 30 Mb en condiciones óptimas).

El programa de análisis utilizado ha sido el BlueFuse Multi con algoritmos recomendados por la casa comercial (Illumina).

Crioconservación y transferencia de embriones

Cada uno de los embriones biopsiados fueron vitrificados siguiendo el Método Cryotop® hasta conocer el resultado del estudio genético. Una vez conocido el resultado, únicamente los embriones euploides equilibrados fueron considerados para la transferencia. En el grupo control, además, estos embriones no eran portadores de la mutación analizada. Para cada uno de los casos se transfirieron un máximo dos embriones según la disponibilidad de embriones sanos y los deseos de las parejas. El porcentaje de transferencias de un único embrión fue de 92,31 %. En el caso de tener embriones sanos sobrantes se mantuvieron vitrificados para intentos posteriores.

Para programar la desvitrificación y transferencia embrionaria, las pacientes recibieron tratamiento con estradiol oral (Meriestra, Sandoz, Madrid o Progynova, Bayer, Barcelona hasta 6 mg/día) o transdérmico (Oestraclin, SEID, Barcelona, 5 mg/día) a partir de una menstruación durante al

menos 10-12 días. Cuando se comprobó ecográficamente que el grosor endometrial era de al menos 8 mm y tenía aspecto trilaminar, se inició la administración de 200 mg/8 horas de progesterona por vía vaginal, se desvitrificaron los embriones y se realizó su transferencia 5 días completos después de iniciado el tratamiento con progesterona. Ambos tratamientos se mantuvieron hasta la determinación de beta-hCG, 15 días después de la transferencia o hasta la semana 10-12 de gestación, en caso de resultar positiva.

Dos semanas después del resultado de beta-hCG positiva se realizó una ecografía para el diagnóstico clínico de gestación.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó a través del programa estadístico SPSS v.27.

Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov comprobándose que la población se ajustaba a una distribución normal para todas las variables del estudio.

La comparación de medias entre dos grupos se realizó mediante el test t-Student o el test ANOVA para comparaciones entre más de dos grupos. Para comparaciones múltiples cuando el test de ANOVA mostró diferencias significativas, se aplicó el test de Bonferroni.

Las diferencias entre variables cualitativas fueron analizadas mediante el test de Chi cuadrado.

En todas las pruebas estadísticas de las variables analizadas se consideró un nivel de significación estadística para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

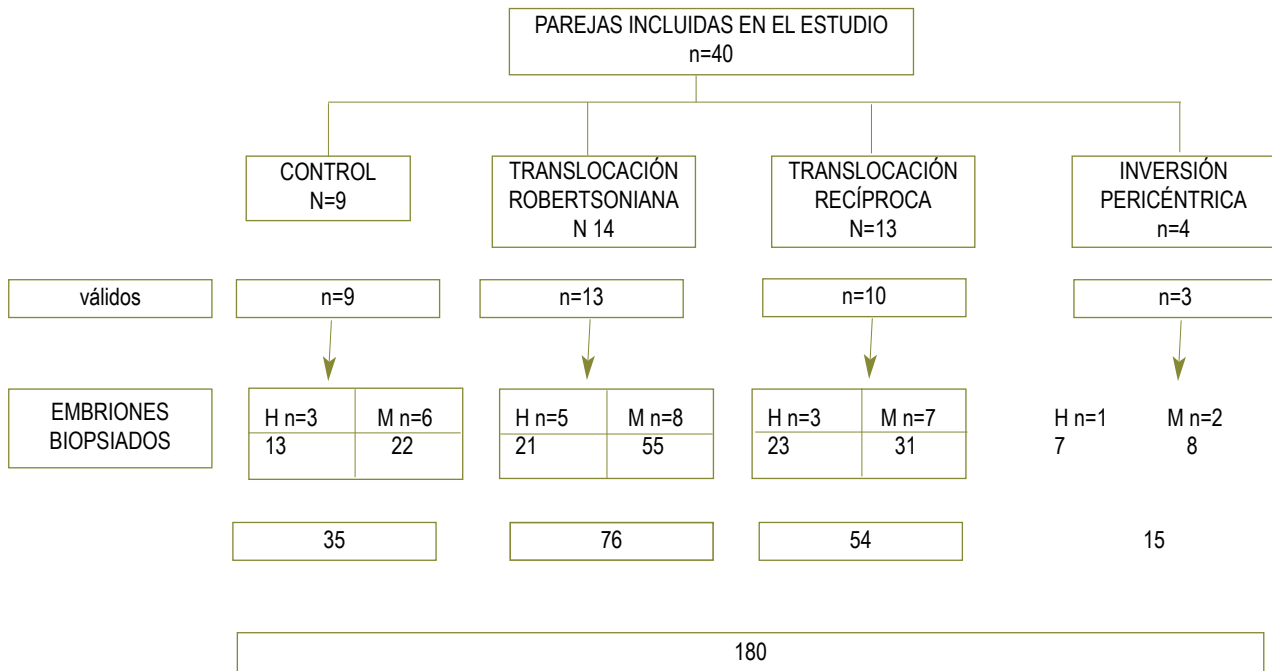
La edad de las mujeres fue de $34,20 \pm 4,03$ años y el IMC fue de $23,43 \pm 4$. En cuanto a los hombres, la edad media fue de $35,92$ años $\pm 4,70$ años.

De las 31 parejas incluidas en el grupo de estudio, el subgrupo de translocaciones robertsonianas estuvo compuesto por catorce parejas, habiendo un caso en el que no se llegaron a biopsiar embriones. El subgrupo de translocaciones recíprocas estuvo formado por trece parejas, habiendo tres casos en los que no se biopsiaron embriones. Y el subgrupo de inversiones pericéntricas estuvo compuesto por cuatro parejas, habiendo un caso en el que no se biopsió ningún embrión.

De este grupo se biopsió un total de 145 embriones, concretamente 76 del subgrupo de translocaciones robertsonianas, 54 del subgrupo de translocaciones recíprocas y 15 del subgrupo de inversiones pericéntricas (Figura 1).

FIGURA 1

Diagrama de flujo con la distribución del total de los embriones biopsiados



En cuanto al grupo control, de las nueve parejas incluidas en el estudio se biopsió un total de 35 embriones (Figura 1).

En un total de 145 embriones analizados del grupo de portadores de un reordenamiento equilibrado, se obtuvieron 39 embriones euploides, 91 embriones aneuploides y 15 sin diagnóstico; mientras que en los 35 embriones analizados de las parejas del grupo control, 18 eran euploides, 11 aneuploides y 6 sin diagnóstico. La fragmentación de la muestra amplificada y el fallo de amplificación fueron las causas principales de embriones sin diagnóstico.

Con el fin de obtener unas cifras más representativas en los análisis estadísticos, se calculó, a partir de estos datos: tasa de embriones euploides (definida como: número de embriones euploides/número de embriones biopsiados, expresado en porcentaje), tasa de embriones aneuploides (definida como: número de embriones aneuploides/número de embriones biopsiados, expresado en porcentaje) y tasa de embriones sin diagnóstico (definida como: número de embriones sin diagnóstico/número de embriones biopsiados, expresado en porcentaje) para cada grupo.

De este modo se obtuvo en el grupo control, una tasa de embriones euploides del 51,43 %, una tasa de embriones aneu-

ploides del 31,43 % y una tasa de embriones sin diagnóstico del 17,14 % (Figura 2).

Por otra parte, en el grupo de casos, la tasa de embriones euploides fue 26,90 %, la de embriones aneuploides 62,76 % y la de sin diagnóstico 10,34 % (Figura 3).

FIGURA 2

Tasas de embriones euploides, aneuploides y sin diagnóstico en el grupo control

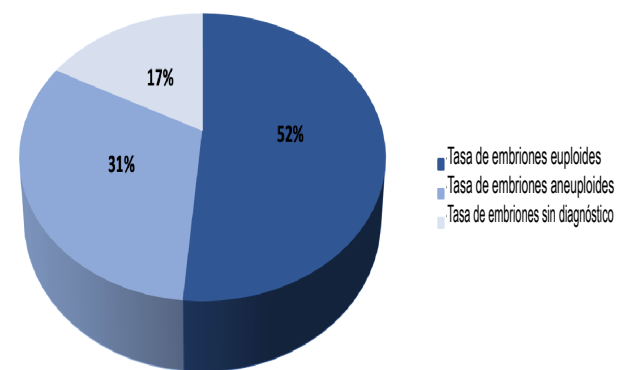
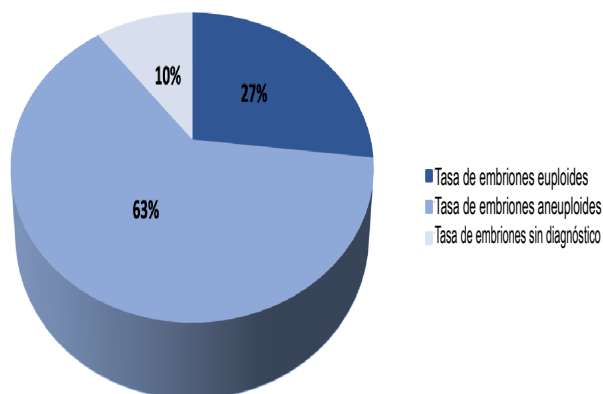


FIGURA 3

Tasas de embriones euploides, aneuploides y sin diagnóstico en el grupo de estudio



Tanto el número como la tasa de embriones aneuploides fueron significativamente mayores en parejas portadoras de una anomalía estructural cromosómica equilibrada comparada con el grupo control ($p = 0,003$ y $p = 0,011$, respectivamente). En cuanto a la tasa de embriones euploides, fue significativamente mayor en el grupo control que en el grupo de estudio ($p = 0,033$). Para el resto de los parámetros, los resultados no mostraron diferencias significativas. (Tabla 2)

Resultados en el grupo de estudio según el sexo del progenitor portador

Para las 39 parejas del grupo de estudio, se realizaron comparaciones dependiendo del sexo del progenitor portador del reordenamiento equilibrado para todas las variables de interés. Al igual que en el caso anterior, se realizó el t-Student para las variables cuantitativas. Únicamente se obser-

TABLA 2

Prueba T-Student para las características clínicas y resultados de las pacientes sometidas a diagnóstico genético preimplantacional. SD, desviación estándar

VARIABLE	GRUPO	n	MEDIA (SD)	p
Edad mujer (años)	ESTUDIO	31	34,03 (4,48)	0.632
	CONTROL	9	34,78 (1,92)	
Edad hombre (años)	ESTUDIO	30	35,60 (5,14)	0.441
	CONTROL	9	37,00 (2,74)	
IMC mujer (kg/m2)	ESTUDIO	31	23,61 (4,39)	0.611
	CONTROL	9	22,82 (2,22)	
REM (millones de espermatozoides)	ESTUDIO	31	35,27 (26,58)	0.125
	CONTROL	9	19,42 (27,10)	
Nº ovocitos en Metafase II (MII)	ESTUDIO	31	15,39 (10,16)	0.747
	CONTROL	9	14,11 (11,05)	
Nº ovocitos MII fecundados	ESTUDIO	31	11,74 (8,84)	0.126
	CONTROL	9	7,00 (3,39)	
Nº embriones biopsiados	ESTUDIO	31	4,68 (4,38)	0.602
	CONTROL	9	3,89 (1,62)	
Nº embriones euploides	ESTUDIO	26	1,50 (1,58)	0.396
	CONTROL	9	2,00 (1,22)	
Nº embriones aneuploides	ESTUDIO	26	3,50 (3,01)	0.003
	CONTROL	9	1,22 (1,20)	
Nº embriones sin diagnóstico	ESTUDIO	26	0,58 (0,70)	0.744
	CONTROL	9	0,67 (0,71)	
Tasa de embriones euploides (%)	ESTUDIO	26	30,02 (27,87)	0.033
	CONTROL	9	53,33 (24,89)	
Tasa de embriones aneuploides (%)	ESTUDIO	26	58,30 (28,91)	0.011
	CONTROL	9	29,26 (25,26)	
Tasa de embriones sin diagnóstico (%)	ESTUDIO	26	11,68 (21,92)	0.49
	CONTROL	9	17,40 (18,69)	

varon diferencias significativas en el recuento de espermatozoides móviles (REM), que fue significativamente menor cuando el hombre era el portador ($p = 0,039$) (Tabla 3).

Resultados según el tipo de reordenamiento equilibrado

Se realizó un test ANOVA para analizar si existían diferencias significativas entre el tipo de anomalía estructural cromosómica equilibrada (translocación robertsoniana, translocación recíproca, inversión pericéntrica) y el número y tasa de embriones euploides, aneuploides y sin diagnóstico (Figura 4). Los resultados obtenidos para estas variables mostraron que la tasa y el número de embriones sin diagnóstico fueron significativamente mayores en las parejas portadoras de inversiones pericéntricas que en las portadoras de translocaciones robertsonianas y recíprocas ($p = 0,001$ y $p = 0,010$, respectivamente). También se encontró que la tasa de embriones euploides fue significativamente mayor en los portadores de translocaciones robertsonianas que en los portadores de translocaciones recíprocas o inversiones pericéntricas ($p = 0,013$). Y, para finalizar, que la tasa de embriones aneuploides fue significativamente mayor en

los portadores de translocaciones recíprocas comparado con translocaciones robertsonianas e inversiones pericéntricas ($p = 0,010$) (Tabla 4).

Los resultados obtenidos no mostraron ninguna asociación metiera a los cromosomas 8 y 12.

DISCUSIÓN

Los portadores de reordenamientos equilibrados tienen significativamente reducida la competencia reproductiva y esto se debe principalmente a la producción de gametos aneuploides (13, 14). Los resultados de este estudio apoyarían esta teoría, pues tanto el número como la tasa de embriones aneuploides resultó ser significativamente mayor en el grupo de estudio que en el grupo control y, por el contrario, la tasa de embriones euploides fue significativamente mayor en el grupo control que el grupo de estudio.

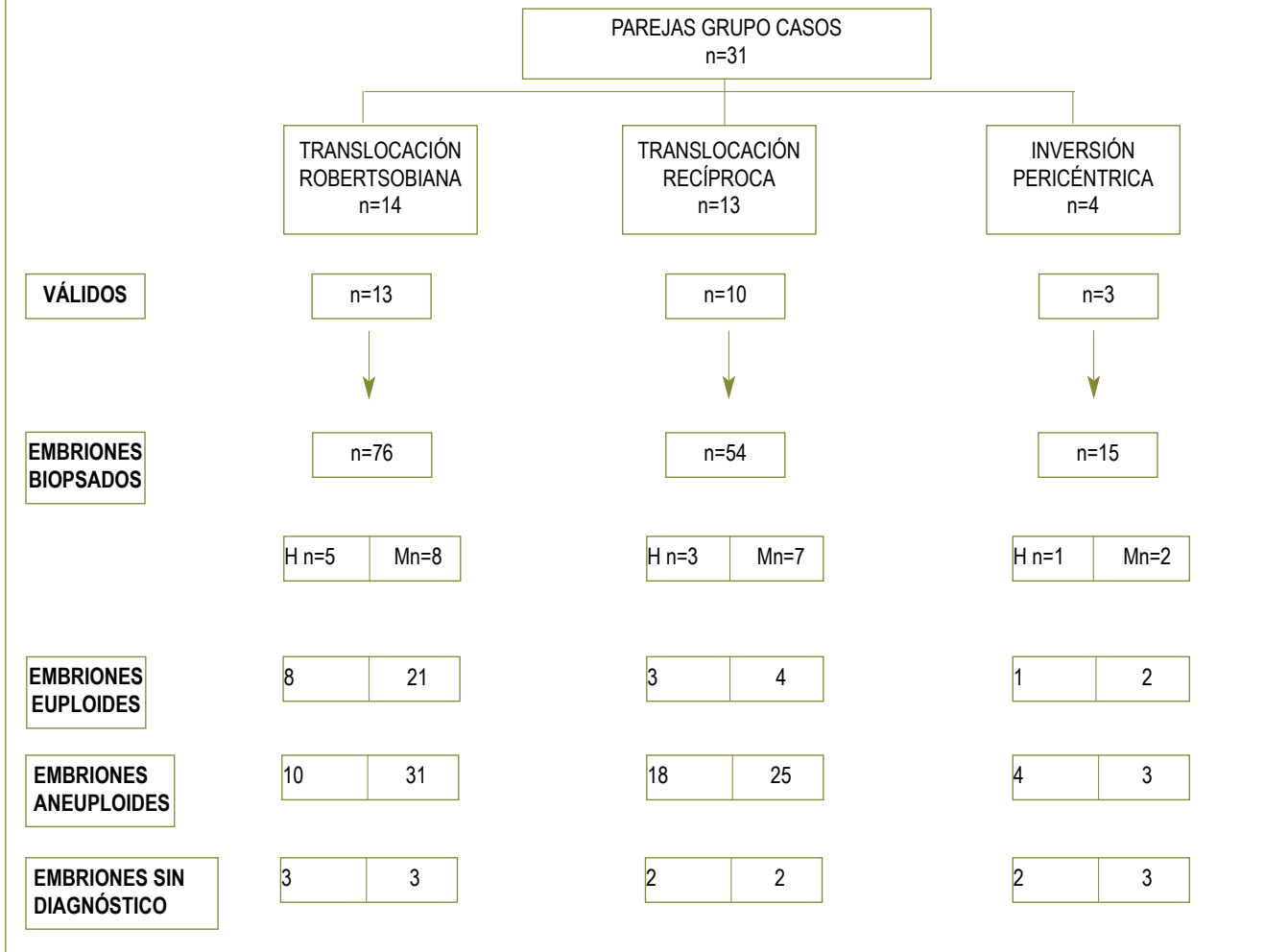
Se estudió la posible relación entre el tipo de anomalía cromosómica estructural equilibrada y la probabilidad de conseguir embriones euploides, aneuploides o sin diagnóstico. Se encontró que la tasa de embriones aneuploides fue sig-

tabla 3

Prueba T-Student para los resultados del diagnóstico genético preimplantacional del grupo estudio en función del sexo del portador. SD, desviación estándar				
VARIABLE	SEXO PROGENITOR PORTADOR	n	MEDIA (SD)	p
REM (millones de espermatozoides)	HOMBRE	12	23,67 (20,68)	0.039
	MUJER	19	42,59 (27,75)	
Nº ovocitos en metafase II (mII)	HOMBRE	12	15,83 (10,06)	0.85
	MUJER	19	15,11 (10,48)	
Nº ovocitos mII fecundados	HOMBRE	12	11,42 (8,40)	0.874
	MUJER	19	11,95 (9,33)	
Nº embriones biopsiados	HOMBRE	12	4,25 (4,22)	0.673
	MUJER	19	4,95 (4,56)	
Nº embriones euploides	HOMBRE	9	1,33 (0,71)	0.704
	MUJER	17	1,59 (1,91)	
Nº embriones aneuploides	HOMBRE	9	3,56 (3,58)	0.947
	MUJER	17	3,47 (2,79)	
Nº embriones sin diagnóstico	HOMBRE	9	0,78 (0,67)	0.298
	MUJER	17	0,47 (0,72)	
Tasa de embriones euploides (%)	HOMBRE	9	37,14 (29,07)	0.353
	MUJER	17	37,14 (29,07)	
Tasa de embriones aneuploides (%)	HOMBRE	9	51,64 (24,21)	0.404
	MUJER	17	61,82 (31,22)	
Tasa de embriones sin diagnóstico (%)	HOMBRE	9	11,22 (10,13)	0.939
	MUJER	17	11,93 (26,45)	

FIGURA 4

Diagrama de flujo de los resultados obtenidos en el grupo de estudio



nificativamente mayor en los portadores de translocaciones recíprocas que en el resto de los reordenamientos equilibrados, dicho resultado ya se ha observado en otros estudios (15). Por otro lado, se halló que la tasa de embriones euploides fue mayor de manera significativa en los portadores de translocaciones robertsonianas que en los portadores de translocaciones recíprocas o inversiones pericéntricas. Y, por último, tanto el número como la tasa de embriones sin diagnóstico fue significativamente mayor en los portadores de inversiones pericéntricas que en los demás tipos de reordenamientos equilibrados, sin encontrar una explicación a este hallazgo. El elevado porcentaje de embriones sin diagnóstico se atribuyó a la fragmentación de la muestra y al fallo de amplificación del ADN. Esto puede ser debido a que se biopsiaron no solo embriones de buena

calidad morfológica (A o B), sino también embriones de peor calidad (C).

Por otra parte, se intentó determinar si existía alguna relación entre el sexo del progenitor portador del reordenamiento equilibrado y las características clínicas y resultados del DGP. Solo se pudo observar una relación estadísticamente significativa: el recuento de espermatozoides móviles (REM) fue significativamente menor cuando el hombre era el portador, siendo muchos los estudios publicados a favor de dicha asociación (16, 17).

En este estudio, la tasa de embriones aneuploides no mostró diferencias entre el sexo del progenitor portador del reordenamiento cromosómico, aunque sí una tendencia a mayor tasa de embriones anormales en mujer, que fue de 61,82 %

TABLA 4				
Prueba ANOVA para los resultados del diagnóstico genético preimplantacional del grupo estudio en función del reordenamiento equilibrado. SD, desviación estándar				
VARIABLE	TIPO DE REORDENAMIENTO EQUILIBRADO	n	MEDIA (SD)	p
Nº embriones euploides	Translocación robertsoniana	13	2,23 (1,88)	0.053
	Translocación recíproca	10	0,70 (0,68)	
	Inversión pericéntrica	3	1,00 (1,00)	
Nº embriones aneuploides	Translocación robertsoniana	13	3,15 (2,85)	0.534
	Translocación recíproca	10	4,30 (3,47)	
	Inversión pericéntrica	3	2,33 (2,08)	
Nº embriones sin diagnóstico	Translocación robertsoniana	13	0,46 (0,66)	0.01
	Translocación recíproca	10	0,40 (0,52)	
	Inversión pericéntrica	3	1,67 (0,58)	
Tasa de embriones euploides (%)	Translocación robertsoniana	13	45,39 (29,10)	0.013
	Translocación recíproca	10	14,76 (17,34)	
	Inversión pericéntrica	3	14,29 (14,29)	
Tasa de embriones aneuploides (%)	Translocación robertsoniana	13	48,83 (27,10)	0.01
	Translocación recíproca	10	78,09 (19,30)	
	Inversión pericéntrica	3	33,33 (29,74)	
Tasa de embriones sin diagnóstico (%)	Translocación robertsoniana	13	5,79 (7,86)	<0,001
	Translocación recíproca	10	7,14 (15,79)	
	Inversión pericéntrica	3	52,38 (41,24)	

TABLA 5				
Prueba Chi-cuadrado para la variable efecto intercromosómico				
EFFECTO INTERCROMOSÓMICO	GRUPO	n	% dentro de la clasificación	p
SÍ	ESTUDIO	21	84.00%	0.27
	CONTROL	6	66.70%	
NO	ESTUDIO	4	16.00%	
	CONTROL	3	33.30%	

TABLA 6

Frecuencias observadas de aneuploidías por cromosoma en ambos grupos, excluyendo los cromosomas implicados en la translocación o inversión en el grupo de estudio

CROMOSOMA AFECTO	GRUPO CONTROL	GRUPO ESTUDIO	TOTAL
16	2	9	11 (13,41%)
22	2	6	8 (9,75%)
21	1	6	7 (8,53%)
4	2	4	6 (7,31%)
7	0	5	5 (6,10%)
X	0	5	5 (6,10%)
3	0	4	4 (4,88%)
5	0	4	4 (4,88%)
9	2	2	4 (4,88%)
11	1	3	4 (4,88%)
15	1	3	4 (4,88%)
2	1	2	3 (3,66%)
10	0	3	3 (3,66%)
20	0	3	3 (3,66%)
14	1	1	2 (2,44%)
17	0	2	2 (2,44%)
18	0	2	2 (2,44%)
19	1	1	2 (2,44%)
1	0	1	1 (1,22%)
6	0	1	1 (1,22%)
13	0	1	1 (1,22%)
			82 (100%)

frente al 51,64 % observado en hombres. Estos resultados concuerdan con los observados por Mateu-Brull y cols., que reportan un aumento en el porcentaje de embriones aneuploides en mujeres portadoras de translocaciones, aunque esto no ocurre en inversiones. Para la gametogénesis, es necesario que se lleven a cabo dos divisiones celulares secuenciales: la meiosis I y la meiosis II. En la meiosis I, los cromosomas homólogos (formados por dos cromátides) se segregan en diferentes células hijas y en la meiosis II las cromátides hermanas se separan. Aunque en un principio este proceso es idéntico en hombres y mujeres, el marco de tiempo y la susceptibilidad a los defectos cromosómicos no lo son. Esto se debe principalmente a que el punto de control del huso mitótico, encargado de comprobar la correcta segregación cromosómica, es menos sensible detectando las

aberraciones cromosómicas en mujeres que en hombres (18–20). Esto podría justificar la tendencia a una mayor tasa de embriones aneuploides en mujeres que en hombres.

En cuanto al efecto intercromosómico, los resultados obtenidos en otros estudios son heterogéneos, observando este fenómeno en algunos casos (21–23) y en otros no (24–26). Es posible que el día de la realización de la biopsia tenga relevancia a la hora de estudiar este fenómeno, ya que Mateu-Brull y cols. Observaron un aumento significativo de aneuploidías en los embriones biopsiados el día 3 de portadores de translocaciones robertsonianas cuando se comparan con translocaciones recíprocas e inversiones, que no se reprodujo cuando los embriones se biopsiaban en día 5/6. En este estudio, en el que todas las biopsias embrionarias se realizaron en día 5/6, el efecto intercromosómico observado no mostró diferencias significativas entre los distintos tipos de reordenamientos analizados ni cuando se comparó con el grupo control. Tampoco se observaron diferencias cuando se analizó el efecto intercromosómico en función del sexo del progenitor portador del reordenamiento. Fueron los cromosomas 16, 22 y 21 (en ese orden) los más frecuentemente implicados en aneuploidías; esto también se ha observado en otros estudios (27, 28).

La técnica de PGT-SR es un buen método para conseguir una competencia reproductiva en portadores de reordenamientos equilibrados (29–31) similar a parejas portadoras de enfermedades monogénicas con cariotipos normales, que podrían extrapolarse a la población general. Estos resultados han podido comprobarse al analizar los embriones mediante Secuenciación de Nueva Generación (NGS) que permite detectar no solo las aneuploidías para los cromosomas implicados en la alteración, sino para todos los cromosomas.

A pesar de que uno de los factores que favorecen la generación de aneuploidías en el ser humano es la edad materna avanzada (32–34), en este estudio, no debería ser la causa principal de las aneuploidías observadas pues la edad media de las mujeres incluidas en la muestra analizada fue de 34,20 años.

Entre los puntos fuertes de este estudio cabe destacar que todos los diagnósticos genéticos fueron realizados en el mismo laboratorio del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y con la misma metodología. Además, todos los embriones fueron biopsiados el día 5/6 en estadio de blastocisto mediante NGS, en un periodo de 3 años, por tanto, la variabilidad fue mínima.

Otro de los puntos fuertes ha sido incluir un grupo control de parejas en las que los cariotipos tanto de la mujer como del hombre eran normales, por lo que las aneuploidías observadas no fueron atribuibles a reordenamientos ni a la edad de los progenitores.

No obstante, este estudio también tiene importantes limitaciones: el reducido tamaño muestral y el elevado porcentaje de embriones sin diagnóstico. En cuanto al tamaño muestral, solo fueron incluidas 31 parejas en el grupo de estudio y 9 en el grupo control. Sin embargo, se analizó un total de 180 embriones, con lo que se considera que el número es adecuado para obtener conclusiones. El elevado porcentaje de embriones sin diagnóstico puede atribuirse a que se biopsiaron también los embriones de peor calidad morfológica, con mayor porcentaje de fallo de amplificación en el ADN de estas células.

En conclusión, la tasa de embriones aneuploides en parejas con una persona portadora de un reordenamiento cromosómico estructural equilibrado duplica la de las parejas con cariotipos normales que realizan tratamientos mediante test genético preimplantacional y es significativamente mayor en portadores de translocaciones recíprocas comparada con portadores de translocaciones robertsonianas o inversiones pericéntricas. El sexo del progenitor portador no evidenció diferencias en la tasa de embriones aneuploides. No se observó diferencias significativas en el efecto inter cromosómico en el grupo control y la tasa de embriones aneuploides que presentó el grupo de estudio, siendo los cromosomas más frecuentemente implicados en aneuploidías el 16, el 22 y el 21.

BIBLIOGRAFÍA

- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.** Evidence-based treatments for couples with unexplained infertility: a guideline. *Fertil Steril.* 2020;113(2):305–22.
- Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P.** Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12).
- Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM.** Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2020 May 1;49(5).
- Simpson JL, Kuliev A, Rechitsky S.** Overview of preimplantation genetic diagnosis (PGD): Historical perspective and future direction. *Methods Mol Biol.* 2019;1885:23–43.
- Morin SJ, Eccles J, Iturriaga A, Zimmerman RS.** Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. *Fertil Steril.* 2017;107(1):19–26.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson y Thompson.** *Genética en medicina* (8a. ed.). Barcelona: Elsevier Health Sciences Spain - T; 2016.
- Sung Ko D, Won Cho J, Yeon Park S, Young Kim J, Kyoung Koong M, Ok Song I, et al.** Clinical Outcomes of Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) and Analysis of Meiotic Segregation Modes in Reciprocal Translocation Carriers. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(6):1428–33.
- Anton E, Vidal F, Blanco J.** Reciprocal translocations: Tracing their meiotic behavior. *Genet Med.* 2008 Oct;10(10):730–8.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Abad C, Guitart M, Egozcue J, et al.** From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod.* 2004;19(11):2515–22.
- Miller DE.** The Interchromosomal Effect: Different Meanings for Different Organisms. *Genetics.* 2020;216(3): 621–31.
- Lejeune J.** The meiotic consequences of chromosome modifications. *Ann Genet.* 1965;8(1):9–10.
- Guichaoua MR, Speed RM, Luciani JM, Delafontaine D, Candler AC.** Infertility in human males with autosomal translocations. II. Meiotic studies in three reciprocal rearrangements, one showing tertiary monosomy in a 45-chromosome individual and his father. *Cytogenet Cell Genet.* 1992 May 14;60(2):96–101.
- Neri G, Serra A, Campana M, Tedeschi B.** Reproductive risks for translocation carriers: cytogenetic study and analysis of pregnancy outcome in 58 families. *Am J Med Genet.* 1983;16(4):535–61.
- Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM.** Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 1998;18(13):1437–49.
- Mateu-Brull E, Rodrigo L, Peinado V, Mercader A, Campos-Galindo I, Bronet F, et al.** Interchromosomal effect in carriers of translocations and inversions assessed by preimplantation genetic testing for structural rearrangements (PGT-SR). *J Assist Reprod Genet.* 2019 Dec 1;36(12):2547–55.
- Sarrate Z, Vidal F, Blanco J.** Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertility and Sterility.* 2010;93(6):1892–902.
- Sarrate Z, Blanco J, Marina-Rugero F, Moreno-García JM, Ruiz-Jorro M, Lafuente-Varea R, et al.** The use of fluorescence in situ hybridization analysis on sperm: indications to perform and assisted reproduction technology outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(10):1975–87.
- Lane S, Kauppi L.** Meiotic spindle assembly checkpoint and aneuploidy in males versus females. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(6):1135–50.
- Clark FE, Akera T.** Unravelling the mystery of female meiotic drive: Where we are. *Open Biol.* 2021 Sep 1;11(9).
- Wang W-H, Sun Q-Y.** Meiotic spindle, spindle checkpoint and embryonic aneuploidy. *Front Biosci.* 2006;11:620–36.
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J.** Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril.* 2006;85(3):661–6.
- Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S.** Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect. *Fertil Steril.* 2005 Aug;84(2):365–73.
- Mahjoub M, Mehdi M, Brahem S, Elghezal H, Ibala S, Saad A.** Chromosomal segregation in spermatozoa of five Robertsonian translocation carriers t(13;14). *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(7):607–13.
- Ferfour F, Clement P, Gomes DM, Minz M, Amar E, Selva J, et al.** Is classic pericentric inversion of chromosome 2 inv(2)(p11q13) associated with an increased risk of unbalanced chromosomes? *Fertil Steril.* 2009;92(4):1497.e1-1497.e4.
- Codina-Pascual M, Navarro J, Oliver-Bonet M, Kraus J, Speicher MR, Arango O, et al.** Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum Reprod.* 2006;21(6):1490–7.
- Chen Y, Huang J, Liu P, Qiao J.** Analysis of meiotic segregation patterns and interchromosomal effects in sperm from six males with Robertsonian translocations. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(9):406–11.
- Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB.** Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genetics in Medicine.* 2005 Apr;7(4):251–63.
- Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J.** Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res.* 2004;30(3):237–41.

-
29. **Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J.** Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril.* 2000 Jun;73(6):1209–18.
30. **Fischer J, Colls P, Escudero T, Munné S.** Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. *Fertil Steril.* 2010 Jun;94(1):283–9.
31. **Otani T, Roche M, Mizuike M, Colls P, Escudero T, Munné S.** Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and unsuccessful pregnancies. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(6):869–74.
32. **Plachot M, Veiga A, Montagut J, de Grouchy J, Calderon G, Lepretre S, et al.** Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early Life: a multicentric study. *Hum Reprod.* 1988 Jul 1;3(5):627–35.
33. **Dailey T, Dale B, Cohen J, Munne & S.** Association between Non-disjunction and Maternal Age in Meiosis-II Human Oocytes. *Am J Hum Genet.* 1996;59(1):176–84.
34. **Angell RR, Xian J, Keith J.** Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Hum Reprod.* 1993;8(7):1047–54.

LOS AUTORES NO DECLARAN NINGUN CONFLICTO DE INTERESES