

27. Recomendaciones sobre diagnóstico genético preimplantacional

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los avances en reproducción y en genética han propiciado el desarrollo del Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP). En nuestro país, el DGP está contemplado en la legislación vigente y su rápida incorporación en el ámbito de la Reproducción Humana Asistida hace necesario establecer unas pautas y recomendaciones de uso para profesionales y pacientes.

ORGANIZACIÓN DE UN PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

Unidades implicadas

La organización de un programa de DGP requiere la implicación de un centro de reproducción asistida, una unidad de asesoramiento genético, un laboratorio de FIV y un laboratorio de diagnóstico genético.

En un programa de DGP están implicadas las siguientes unidades: medicina reproductiva, genética, laboratorio de FIV y laboratorio de diagnóstico genético.	RSAA
La comunicación entre las unidades implicadas en la organización de un programa de DGP debe ser clara y comprensible y debe mantenerse bajo estricto control de calidad.	RSAA
Se recomienda que cada centro nombre un Comité encargado de establecer medidas orientadas a garantizar que el DGP cumpla los requerimientos de las leyes vigentes y que, en casos dudosos, sea el encargado de elevar la consulta a la Comisión Nacional de Reproducción Asistida Humana.	RSAA

Consejo genético y consentimiento informado

La comunicación con los pacientes durante el consejo genético debe ser clara, concisa y comprensible y en el idioma propio de la pareja consultante.

En el consejo genético se deberá informar a los pacientes de:

- Las consecuencias de la anomalía cromosómica o la enfermedad genética de la que son portadores.
- Las probabilidades de transmitir la anomalía cromosómica o enfermedad genética.
- Las posibilidades de prevenirla, evitarla o mejorarla.
- Los posibles beneficios del DGP.

Son requisitos previos al DGP la evaluación de la historia reproductiva, así como un asesoramiento genético adecuado de los pacientes que se someten al programa.	RSAA
Se recomienda que el consejo genético en el DGP sea realizado por un profesional con amplia experiencia en genética y conocimientos de embriología, así como de las técnicas de diagnóstico genético preimplantacional.	RSAA
Se recomienda que los centros pongan a disposición de los pacientes suficiente información para que estos decidan si quieren someterse al DGP.	RSAA

Se recomienda que el consentimiento informado contenga, como mínimo, la siguiente información:

- Objetivo del DGP.
- Procedimiento del proceso de FIV-DGP, especificando la unidad donde se realizan cada uno de los procesos.
- En qué consiste la biopsia embrionaria.
- En qué consiste la técnica diagnóstica a utilizar.
- Limitaciones de la técnica.
- Riesgos de la metodología: biopsia embrionaria, fijación celular, análisis genético.
- Posibles beneficios.
- Alternativas al DGP.
- Aspectos legales relacionados con el DGP.
- Firma.

Es necesario que los pacientes que se someten a un ciclo de FIV-DGP firmen un consentimiento informado específico para el tipo de técnica y diagnóstico a realizar, además de los relativos a las técnicas de reproducción asistida.	RSAA
--	-------------

INDICACIONES DGP/DGS

Las indicaciones y criterios de inclusión/exclusión pueden variar en cada centro:

Es necesario que los centros que ofrecen DGP tengan establecidos criterios de inclusión/exclusión de los pacientes candidatos a DGP.

RSAA

No obstante, serían recomendaciones generales:

Criterios de inclusión/exclusión

Criterio general de inclusión en DGP

El DGP está indicado cuando el diagnóstico genético sea técnicamente posible, su fiabilidad sea elevada, las posibilidades de éxito sean aceptables y las técnicas de reproducción asistida sean factibles.

RSAA

Criterio general de exclusión en DGP

El DGP está contraindicado cuando el diagnóstico genético no es posible o incierto, cuando las posibilidades de éxito no sean aceptables o si las técnicas de reproducción asistida están contraindicadas.

RSAA

Indicaciones

Son indicaciones de DGP las enfermedades monogénicas de las que existe diagnóstico fiable, las anomalías cromosómicas estructurales o la existencia de abortos de repetición.

B

Puede realizarse DGP en los fallos de repetidos de implantación, en las pacientes en ciclo de FIV mayores de 35 años, en los factores masculinos severos y en pacientes con embarazos previos trisómicos.

RSAA

CICLOS DE FIV-DGP

Un requisito que impone el DGP es el origen de los embriones que van a ser objeto de diagnóstico, ya que estos deben obtenerse a partir de FIV, con los consiguientes tratamientos y limitaciones que el procedimiento implica.

Protocolos de estimulación

La respuesta ovárica a la estimulación hormonal es un requisito importante para conseguir el éxito en un ciclo de DGP, ya que se trata de realizar una FIV con selección embrionaria.

Diagnóstico genético preimplantacional

Antes de iniciar la estimulación de la paciente, es necesario, especialmente en casos de anomalías cromosómicas estructurales o de enfermedades monogénicas, disponer del correspondiente consejo genético y de los estudios de informatividad de la pareja.	RSAA
Las parejas que se encuentran a la espera de un ciclo de DGP deben usar un método contraceptivo para evitar una gestación espontánea.	RSAA
Durante el ciclo de DGP no deben mantenerse relaciones sexuales no protegidas, para evitar el riesgo de embarazo natural en dicho ciclo.	RSAA

Se ha considerado que deben conseguirse un mínimo de 6 ovocitos pero no hay un consenso claro, por lo que cada centro debería tener sus límites de folículos, ovocitos y embriones para cancelar un ciclo.

En los ciclos de DGP se requiere la obtención de un razonable número de ovocitos.	RSAA
La paciente baja respondedora tiene escasas posibilidades de que el ciclo de DGP tenga éxito.	RSAA

En los protocolos de estimulación de fecundación *in vitro* estándar se recomienda utilizar agonistas de la GnRH ya que facilitan el control del ciclo y aumentan la eficacia, en comparación con el empleo de gonadotropinas solas.

En los protocolos de estimulación de fecundación <i>in vitro</i> estándar se recomienda utilizar agonistas de la GnRH.	RSAA
En los casos que por criterio clínico o de laboratorio no fuera posible el DGP, se puede cancelar el ciclo antes del inicio de la estimulación con gonadotropinas, congelar todos los embriones para después descongelarlos, biopsiarlos y transferirlos, o bien interrumpir momentáneamente la administración de gonadotropinas manteniendo los agonistas de la GnRH hasta que se puedan realizar los diagnósticos en el laboratorio.	RSAA

Laboratorio de FIV

Se recomienda seguir las indicaciones generales redactadas por la ponencia correspondiente para la organización del laboratorio de FIV.

Se debe utilizar necesariamente ICSI en los casos de DGP basados en la utilización de protocolos de PCR.	RSAA
Es aceptable la utilización de FIV convencional o de ICSI en los casos de DGP basados en la utilización de protocolos de FISH.	B

BIOPSIAS EMBRIONARIAS

Actualmente las únicas posibilidades diagnósticas fiables en DGP se basan en el estudio del material biológico obtenido de biopsias celulares, ya sea de los corpúsculos polares o de células embrionarias. Las biopsias embrionarias se obtienen mediante micromanipulación, y se han descrito diferentes aproximaciones metodológicas para su realización. Independientemente de la metodología utilizada debemos ser extremadamente cuidadosos para obtener células aptas para llevar a cabo el diagnóstico genético y para evitar los efectos negativos sobre el desarrollo posterior del embrión.

Se recomienda retirar las células del cúmulo antes de realizar la biopsia embrionaria.	RSAA
Siempre que el análisis genético se base en la utilización de protocolos de PCR, se debe realizar una decumulación exhaustiva antes de proceder a la obtención de las biopsias embrionarias.	RSAA

Estadio embrionario

La mayoría de centros realizan el diagnóstico a partir de biopsias de blastómeros.

Para el DGP se recomienda biopsiar los embriones en día +3.	RSAA
También se pueden obtener biopsias embrionarias en estadio de blastocistos, en cuyo caso es recomendable realizarla en día +5 o +6 cuando el blastocisto está expandido.	RSAA

Es aceptable obtener biopsias de primer y segundo corpúsculo polar. Se recomienda biopsiar el primer corpúsculo el mismo día de la recuperación de los ovocitos; el segundo corpúsculo polar puede biopsiarse a las 18-22 h postinseminación. Ambos corpúsculos pueden ser biopsiados al mismo tiempo, pero no es recomendable porque el primero puede haber degenerado en día +1.	RSAA
--	-------------

Apertura de la zona pelúcida

Son aceptables tres métodos de obertura de la zona pelúcida: mecánica, mediante láser y mediante solución acidificada de Tyrode. Este último no es recomendable para las biopsias de corpúsculo ya que afecta al huso acromático.

Se recomienda que la obertura realizada en la zona pelúcida no sea superior a 30 micras.	C
No se recomienda la utilización de solución acidificada de Tyrode para las biopsias de corpúsculo ya que afecta al huso acromático.	C

Obtención de la biopsia

Se recomienda obtener las biopsias de corpúsculo y de blastómeros por aspiración.	C
Para la obtención de biopsias de blastocistos, se recomienda la herniación seguida de láser o la rotura mecánica.	C
Siempre que sea posible, deben aspirarse blastómeros con un único núcleo bien visible.	C
No hay consenso en cuanto al número de células a biopsiar (una célula o dos células) aunque se recomienda retirar dos blastómeros tan sólo en embriones con al menos 6 células.	RSAA
En los casos en que sea necesario biopsiar de nuevo un embrión, se debe utilizar el mismo orificio para evitar la pérdida de blastómeros y facilitar el <i>hatching</i> del embrión.	RSAA
Se recomienda utilizar medios sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} durante la biopsia y, como en cualquier procedimiento de micromanipulación, medios tamponados cubiertos con aceite para mantener el pH, osmolaridad y temperatura y minimizar los efectos de la exposición al aire sobre el embrión.	RSAA
Se recomienda que el proceso de manipulación se lleve a cabo en el mínimo tiempo posible para no afectar al futuro desarrollo del embrión.	RSAA
Se debe utilizar un sistema claro e inequívoco para la identificación de las biopsias obtenidas, que asegure su correspondencia con el embrión del que derivan.	RSAA
Se recomienda la validación de todo el proceso por dos personas.	RSAA

Riesgo en la biopsia embrionaria

<p>Si un embrión es dañado durante el proceso de biopsia detendrá su crecimiento y no será apto para su transferencia. Las metodologías de biopsia utilizadas deben presentar un riesgo de dañar al embrión inferior al 1%.</p>	<p>RSAA</p>
---	--------------------

CULTIVO EMBRIONARIO

Hasta el momento de la biopsia, deben aplicarse las condiciones de cultivo de rutina de FIV. Se recomienda seguir las indicaciones generales redactadas por la ponencia correspondiente.

<p>Una vez terminado el proceso de la biopsia, los embriones biopsiados deben lavarse con el fin de pasarlos al medio de cultivo sin restos de ácido o medios de biopsia.</p>	<p>RSAA</p>
<p>Deben utilizarse medios y condiciones de cultivo apropiados para el desarrollo de los embriones biopsiados desde el día +3 en adelante.</p>	<p>C</p>
<p>Los embriones biopsiados deben mantenerse en cultivo de forma individualizada, utilizando un sistema claro e inequívoco de identificación, que asegure su seguimiento y correspondencia con los blastómeros analizados.</p>	<p>RSAA</p>

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

En los ciclos de DGP, la selección de los embriones a transferir, así como el procedimiento de transferencia, debe realizarse teniendo en cuenta las indicaciones para la realización del DGP y las características de los embriones que han sido biopsiados.

<p>El criterio de selección para la transferencia de los embriones analizados debe basarse en primer lugar en el resultado del diagnóstico genético, y en segundo lugar en la morfología y desarrollo de cada embrión.</p>	<p>RSAA</p>
<p>El número de embriones a transferir dependerá de la edad de la paciente y de la calidad embrionaria, aunque es recomendable no transferir más de dos embriones para evitar gestaciones múltiples.</p>	<p>RSAA</p>

El día de la transferencia embrionaria vendrá condicionado por el tiempo necesario para el diagnóstico genético. A partir de la obtención de los resultados del estudio genético, es aceptable que el día de la transferencia se establezca a criterio del centro de reproducción asistida.	C
Es recomendable usar un catéter blando y realizar la transferencia suavemente ya que se trata de embriones con una abertura en la zona pelúcida.	RSAA
Es recomendable realizar seguimiento ecográfico, especialmente en las transferencias difíciles.	A
No es recomendable la transferencia de embriones sin diagnóstico.	RSAA
La transferencia de embriones sin diagnóstico es aceptable en casos de <i>screening</i> de aneuploidías si no hay embriones normales disponibles, pero en este caso las ventajas que ofrece el DGP se pierden y debe informarse debidamente a los pacientes y recomendar especialmente el diagnóstico prenatal en caso de embarazo.	RSAA

CONGELACIÓN EMBRIONES POST DIAGNÓSTICO

Se recomienda congelar los embriones normales o no afectados que no vayan a ser transferidos, ya sea en día +3 o en estadio de blastocisto.	RSAA
Se recomienda que la congelación se lleve a cabo de forma individualizada.	RSAA

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

La unidad dónde se va a llevar a cabo el diagnóstico genético preimplantacional es un punto clave para cualquier programa de DGP. El equipamiento adecuado del laboratorio y su organización, los recursos humanos, la formación especializada de los profesionales con experiencia demostrada en DGP, y la imprescindible formación continuada del personal son aspectos básicos en un programa de DGP.

Laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional

El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional puede ser una unidad externa o interna al centro que ofrece el DGP.	RSAA
El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional debe disponer de métodos de identificación de pacientes y células.	RSAA

Los procedimientos y protocolos de laboratorio deben estar recogidos en un manual, revisados y actualizados por el director del laboratorio. La versión más reciente debe estar disponible para todos los miembros del equipo.	RSAA
--	-------------

Actualmente no existe ningún mecanismo de control de calidad respecto el DGP. Es recomendable un sistema de evaluación interna que recoja entre otros los siguientes datos:

- Porcentaje de células dañadas durante la biopsia.
- Porcentaje de células de las que no se obtiene diagnóstico.
- Tasa de error *in vitro*.
- Tasa de error *in vivo*.

Los laboratorios de diagnóstico genético preimplantacional deberían contar con un sistema de evaluación interna.	RSAA
Es recomendable que todo el personal involucrado en los procesos de DGP siga un programa detallado de formación teórico-práctico en todos los aspectos de trabajo con células únicas.	RSAA
Los profesionales responsables de realizar las biopsias embrionarias y el diagnóstico genético preimplantacional deben contar con una titulación universitaria y demostrar su competencia antes de poder realizar un DGP clínico sin supervisión.	RSAA

Técnicas diagnósticas en DGP

Diagnóstico basado en la hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Aspectos metodológicos

Se debe utilizar un sistema claro e inequívoco para la identificación de las extensiones celulares que asegure su correspondencia con el embrión del que derivan.	RSAA
Es aceptable la fijación de las biopsias obtenidas mediante los diferentes protocolos descritos (utilizando metanol: ácido acético, Tween/HCl y una combinación de los dos anteriores).	RSAA
Cualquiera que sea la metodología de fijación utilizada debe asegurar una buena morfología nuclear y una elevada eficiencia de hibridación. Es aceptable, pero opcional, el uso de tratamiento hipotónico.	RSAA

Diagnóstico genético preimplantacional

Es aceptable el diagnóstico en una única célula mononucleada. No existe consenso en cuanto a basar el diagnóstico en el análisis de una o dos células.	RSAA
Se recomienda el uso de sondas comerciales por los correspondientes controles de calidad y por su validación.	RSAA
Se acepta el uso de sondas no comerciales, siempre que hayan superado los controles de calidad y la validación correspondientes también a nivel de blastómeros.	RSAA
Se deben establecer criterios para la evaluación e interpretación de las señales de hibridación en base a la experiencia de cada centro y a los criterios descritos en la literatura.	RSAA

Cada laboratorio debe disponer de un protocolo con los detalles de la metodología y los materiales utilizados:

Los protocolos deben estar optimizados y ser reproducibles de modo que se garantice una eficiencia de hibridación para todos los cromosomas analizados > 95%.	RSAA
Se recomienda establecer y realizar de forma periódica revisiones y controles de calidad de los equipos y de los reactivos utilizados en cada protocolo.	RSAA
Se debe emitir un informe para el centro remitente o el laboratorio de FIV con los resultados de cada uno de los embriones analizados.	RSAA

Opciones diagnósticas

Determinación del sexo embrionario

Se recomienda la determinación del sexo embrionario mediante FISH.	C
Se recomienda utilizar sondas específicas para los cromosomas sexuales y para un autosoma.	C

Portadores de reorganizaciones cromosómicas

Se debe evaluar cada caso de forma independiente y diseñar una estrategia en función de la anomalía cromosómica que presente la pareja.	RSAA
---	-------------

Si se considera posible el diagnóstico, se debe solicitar un estudio de informatividad previo que debe realizarse antes de comenzar con el protocolo de estimulación de la paciente.	RSAA
El estudio de informatividad, utilizando las sondas seleccionadas en cada caso, se debe realizar en extensiones de linfocitos del portador de la reorganización, y se recomienda ampliar el estudio a los dos miembros de la pareja.	RSAA

Caracterización cromosómica (*screening* aneuploidías)

Se recomienda el análisis de los cromosomas más frecuentemente implicados en cromosomopatías viables y abortos de primer trimestre (cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y). Se aconseja incluir el estudio de otros cromosomas en función de cada indicación.	B
--	----------

Riesgos y limitaciones del DGP mediante FISH

Debido a problemas inherentes al procesado de las biopsias obtenidas (fijación, células anucleadas, multinucleación, etc.), se estima que un 7% de los embriones biopsiados no tendrá diagnóstico. Actualmente, no es posible analizar la totalidad y la estructura de los cromosomas en un único núcleo interfásico mediante FISH.

Teniendo en cuenta las limitaciones del diagnóstico en células únicas y el posible mosaicismo embrionario, con la FISH el riesgo de error diagnóstico, es decir, la posibilidad de feto o niño afecto de una cromosomopatía tras DGP, se ha establecido en el 0,9%.	B
En todos los casos se debe informar a la pareja de las limitaciones de la técnica y de sus diferencias respecto a las técnicas citogenéticas de diagnóstico prenatal. Estas diferencias incluirían el número de cromosomas analizados y el riesgo de mosaicismo embrionario.	RSAA
Se recomienda el diagnóstico prenatal en caso de embarazo tras ciclos de FIV-DGP basados en FISH.	RSAA

Diagnóstico de enfermedades monogénicas mediante PCR

El DGP está indicado en enfermedades monogénicas donde se disponga de un estudio directo de mutaciones y /o un estudio indirecto donde se verifique el haplotipo asociado a la enfermedad.	RSAA
--	-------------

Circuito recomendado

Se recomienda valorar cada solicitud por la unidad de genética, preferentemente con anterioridad a la primera visita, aunque se considera aceptable la valoración por las unidades de ginecología y genética de forma simultánea durante la primera cita.

Previo al inicio de la estimulación, la unidad de genética debe reevaluar y confirmar las mutaciones presentes en la pareja consultante a partir de ADN genómico, incluyendo marcadores polimórficos si los hubiere.	RSAA
--	-------------

Aspectos metodológicos

Se debe tener especial precaución en el procesado de las biopsias embrionarias destinadas a la caracterización molecular basada en protocolos de PCR.

El procedimiento de fecundación debe realizarse necesariamente mediante microinyección espermática (ICSI) y con una decumulación ovocitaria exhaustiva.	B
Es aceptable el diagnóstico en una única célula mononucleada, si bien se recomienda basar el diagnóstico en el análisis de dos células de forma independiente.	RSAA
Durante el proceso de biopsia, se debe cambiar la pipeta de aspiración de blastómeros si se produce la lisis de la célula extraída.	RSAA
Se recomienda realizar la introducción de las células dentro de los tubos para su análisis bajo unas estrictas condiciones de esterilidad y bajo control del microscopio estereoscópico.	RSAA
No hay consenso respecto al tampón de lisis a utilizar, aunque los más ampliamente utilizados están basados en lisis alcalina o proteinasa K.	RSAA
Los protocolos deben estar optimizados y ser reproducibles. Cada laboratorio debe disponer de protocolos con los detalles de la metodología y los materiales utilizados.	RSAA
Se recomienda que el estudio genético garantice un 80%-90% de amplificación de las células analizadas y una fiabilidad del 95% con tasas de pérdidas alélicas (ADO) inferiores al 10%.	RSAA
Se recomienda establecer el diagnóstico en base a la opinión o lectura de resultados de dos especialistas.	RSAA

El resultado debe ser contrastado en todas las células analizadas de un mismo embrión y/o para todos los loci analizados, siendo candidatos a transferencia sólo aquellos embriones para los que exista plena concordancia de normalidad.	RSAA
Se debe emitir un informe para el centro remitente o el laboratorio de FIV con los resultados de cada uno de los embriones analizados.	RSAA
Se recomienda establecer y realizar de forma periódica revisiones y controles de calidad de los equipos y de los reactivos utilizados en cada protocolo.	RSAA

Riesgos y limitaciones del DGP mediante PCR

Debido a problemas inherentes al procesado de las biopsias obtenidas, se estima que un 10% de los embriones biopsiados no tendrá diagnóstico.

Se debe informar a la pareja de que el diagnóstico obtenido hace referencia única y exclusivamente a las mutaciones analizadas.	RSAA
Se debe informar a la pareja de las limitaciones de la técnica y de sus diferencias respecto a las técnicas de diagnóstico prenatal.	RSAA
Se recomienda el diagnóstico prenatal en caso de embarazo tras ciclos de FIV-DGP basados en PCR.	RSAA

SEGUIMIENTO DE LOS CICLOS DE FIV-DGP

La relativa novedad de la aplicación del DGP, hace necesaria una evaluación cuidadosa y objetiva de los resultados clínicos obtenidos y se recomienda que los centros recopilen toda la información necesaria para el correcto seguimiento de los ciclos de FIV-DGP. Se sugiere recopilar como mínimo: tasa de embarazo por ciclo, por punción y por transferencia, tasa de implantación, tasa de aborto, tasa de embarazo clínico, tasa de error (basada en material abortivo, diagnóstico prenatal, recién nacidos), tasa de “niño en casa”, tasa de embarazo múltiple, registro de recién nacidos (prematuros, alteraciones congénitas...).

Se recomienda que los centros establezcan registros de seguimiento de los ciclos de FIV-DGP.	RSAA
Los centros que realizan ciclos de FIV-DGP deberían proporcionar sus datos al registro nacional de la Sociedad Española de Fertilidad.	RSAA

Bibliografía

- Geraedts JP, Harper J, Braude P, Sermon K, Veiga A, Gianaroli L, Agan N, Munne S, Gittlin S, Blenow E, de Boer K, Hussey N, Traeger-Synodinos J, Lee SH, Viville S, Krey L, Ray P, Emiliani S, Liu YH, Vermeulen S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD), a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centres. *Prenat Diagn* 2001;21:1086-92.
- Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, Magli MC, Mandelbaum J, Selva J, van Inzen W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 2000;15:2241-6.
- Harper PS. *Practical Genetic Counselling*. London: Arnold, 2004.
- National Institute for clinical Excellence (2004). Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. Clinical Guideline.
- The Preimplantation Genetic Diagnosis International Society: guidelines for good practice in PGD. *Reprod Biomed Online* 2004;9:430-4.
- Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN, Sermon KD, Wilton L; ESHRE PGD Consortium. ESHRE PGD Consortium 'Best Practice guidelines for clinical Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) and Preimplantation Genetic Screening (PGS)'. *Hum Reprod* 2005;20:35-48.
- Geraedts JP, Harper J, Braude P, Sermon K, Veiga A, Gianaroli L, Agan N, Munne S, Gittlin S, Blenow E, de Boer K, Hussey N, Traeger-Synodinos J, Lee SH, Viville S, Krey L, Ray P, Emiliani S, Liu YH, Vermeulen S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD), a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centres. *Prenat Diagn* 2001;21:1086-92.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2002; 4 Suppl 3:31-6.
- Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, Magli MC, Mandelbaum J, Selva J, van Inzen W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 2000;15:2241-6.
- Harper PS. *Practical Genetic Counselling*. London: Arnold, 2004.
- Munné S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 2004;24:638-643.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91-7.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, Remohí J, Simon C. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999;71:1033-9.
- Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003;18:182-8.
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society. The Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS): Guidelines for good practice in PGD. *Reprod Biomed Online* 2004;9:430-4.
- Vidal F, Giménez C, Rubio C, Simón C, Pellicer A, Santaló J, Egozcue J. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:310-3.
- Marcus SF, Ledger WL. Efficacy and safety of long acting GnRH agonists in in vitro fertilization an embryo transfer. *Hum Fertil (Cam)* 2001;4:85-93
- Pouly JL, Bachelot A, de Mouzon J, Devaux A. Comparison of agonists versus antagonists for IVF stimulation: the French FIVNAT survey 2001-2002. *Gynaecol Obstet Fertil* 2004;32:737-40.
- Simpson JL, Liebaers I. Assessing congenital anomalies after preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:170-6.
- Tartatzis B, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003;9:61-76.
- Vandervorst M, Liebaers Y, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod* 1998;13:169-76.

- De Boer K, Catt JW, Jansen RP, Leigh D, McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril* 2004;82:295-8.
- De Boer K, McArthur S, Murray C, Jansen R. First live birth following blastocyst biopsy and PGD analysis. *Reprod Biomed Online* 2002;4:35.
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH. Trophoctoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod* 1990;5:821-5.
- Dumoulin JC, Bras M, Coonen E, Dreesen J, Geraedts JP, Evers JL. Effect of Ca²⁺/Mg²⁺- free medium on the biopsy procedure for implantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Hum Reprod* 1998; 13:2880-3.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70.
- Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989;51:139-148.
- Munné S, Cohen J. Unsuitability of multinucleated blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1993;8:1120-5.
- Parriego M, Sole M, Vidal F, Boada M, Santalo J, Egozcue J, Veiga A, Barri P. One or two cell biopsy: does it affect implantation potential in PGD? Abstract book TWIN-Meeting Alpha-Andrology 2003:30.
- Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2002;8:11-20.
- Van de Velde H, De Vos A, Sermón K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, Lissens W, Vandervorst M, Van Ranst H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20(13):1030-7.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Walle J, White M, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med* 1997; 62(2):182-7.
- Coroleu B, Carreras O, Veiga A, Martell A, Belil I, Hereiter L, Barri PN. Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000;15:616-620.
- Gardner DK, Lane M. Blastocyst transfer. *Clin Obstet Gynecol* 2003;46: 231-8.
- Grifo JA, Giatras K, Tang YX, Krey LC. Successful outcome with day 4 embryo transfer after implantation diagnosis for genetically transmitted diseases. *Hum Reprod* 1998;13:1656-9.
- Jericho H, Wilton L, Gook DA, Edgar DH. A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003;18:568-71.
- Joris H, Van den Abbeel E, Vos AD, Van Steirteghem A. Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum Reprod* 1999;14:2833-7.
- Magli MC, Gianaroli L, Fortini D, Ferraretti AP, Munne S. Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum Reprod* 1999;14:770-3.
- Colls P, Sandalinas M, Pagidas K, Munné S. PGD analysis for aneuploidy in a patient heterozygous for a polymorphism of chromosome 16 (16qh-). *Prenat Diagn* 2004;24:741-4.
- Dozortsev DI, McGinnis KT. An improved fixation technique for fluorescence in situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2001; 76:186-8.
- Harper J, Wilton L. FISH and embryo sexing to avoid X-linked disease. In: Harper JC, Delhanty DA, Handyside AH, eds. *Preimplantation Genetic Diagnosis*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2001:191-201.
- Harper JC, Coonen E, Ramaekers FCS, Delhanty JDA, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994;9:721-4.
- Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline J, Warburton D. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2002;17:1166-70.
- Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online* 2002;4:183-96.
- Munne S, Bahce M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M, Cohen J. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 2004;8:81-90.

- Munne S, Márquez C, Magli C, Morton P, Morrison L. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 1998;4:863-70.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls. *J Soc Gynecol Investig* 2003;100:315-22.
- Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2002;8:11-20.
- Scriven PN, Handyside AH, Mackie Ogilvie C. Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1998;18:1437-39.
- Shim SH, Pan A, Huang XL, Tonk VS, Varma SK, Milunsky JM, Wyandt HE. FISH variants with D15Z1. *J Assoc Genet Technol* 2003;29:146-51.
- Staessen C, Van Assche E, Joris H, Bonduelle M, Vandervorst M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Clinical experience of sex determination by fluorescent in situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1999;5:382-9.
- Tarkowski AK. An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966;5:394-400.
- Thornhill AR, McGrath JA, Eady RA, Braude PR, Handyside AH. A comparison of different lysis buffers to assess allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2001;21:490-7.