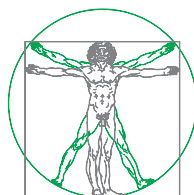


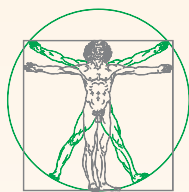
PGT

Relazione Tecnica



AMES
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA



Cosa sono i test genetici preimpianto?

I test genetici preimpianto (PGT*) comprendono tutte le tecniche in grado di analizzare il materiale genetico di cellule uovo o di embrioni ottenuti con trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita, prima del trasferimento embrionale.

I test genetici preimpianto permettono quindi di individuare la presenza di alterazioni genetiche, che potrebbero compromettere lo sviluppo embrionale e quindi l'istaurarsi della gravidanza, o di identificare patologie genetiche di cui uno o entrambi i genitori risultano essere portatori, e che quindi sono ad elevato rischio di avere dei figli affetti da gravi patologie.

Cosa si analizza?

I test genetici preimpianto possono essere effettuati sui globuli polari, su una cellula (blastomero) dell'embrione quando lo stesso raggiunge lo stadio di 6-8 cellule (stadio di clivaggio) o su alcune cellule del trofotoderma, ovvero lo strato più esterno dell'embrione allo stadio di blastocisti.

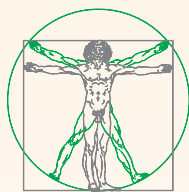
Il procedimento attraverso cui le cellule vengono prelevate dagli ovociti o dagli embrioni si chiama "biopsia".

Biopsia dei globuli polari.

La biopsia dei globuli polari si esegue sulla cellula uovo fertilizzata. Prima della fecondazione da parte dello spermatozoo la cellula uovo ha completato solo la prima divisione meiotica, la cui conseguenza è l'espulsione del primo globulo polare, all'interno del quale viene eliminato metà del corredo cromosomico dell'ovocita. Tuttavia in questa fase la cellula uovo ha ancora un corredo cromosomico diploide (due coppie per ogni cromosoma) e solo dopo la fecondazione da parte dello spermatozoo, l'ovocita completa la seconda divisione meiotica, che si traduce nella formazione di una cellula con un corredo cromosomico aploide (una copia per ogni cromosoma) e l'estrusione del secondo globulo polare, al cui interno si trova il restante materiale genetico. E' possibile effettuare la biopsia dei globuli polari nell'arco di tempo che va dalle 9 alle 22 ore dopo l'inseminazione. L'analisi dei globuli polari fornisce informazioni indirette sul materiale genetico presente all'interno della cellula uovo. E' una tecnica poco invasiva, in quanto non vengono prelevate cellule dell'embrione (i globuli polari sono destinati a degenerare), ma ha lo svantaggio di fornire informazioni solo sul gamete femminile e non è possibile individuare anomalie genetiche generatesi durante le prime fasi di sviluppo embrionale.

Biopsia allo stadio di clivaggio

La biopsia allo stadio di 6-8 cellule prevede la rimozione di un singolo blastomero dall'embrione. L'analisi del materiale genetico di questa cellula fornisce, a differenza dei globuli polari, informazioni sia sul DNA paterno che sul DNA materno. E' tuttavia una tecnica più invasiva, in quanto viene prelevata una delle cellule che forma l'embrione. Va inoltre considerato che, a questo stadio di sviluppo, tre giorni dopo l'inseminazione, l'embrione ha un elevato grado di instabilità cromosomica e di mosaicismo. Con il termine mosaicismo si intende la presenza di cellule con un corredo cromosomico diverso all'interno



dello stesso embrione: in altre parole potrebbero esserci cellule con un materiale genetico alterato e cellule con un patrimonio genetico normale. E' stato stimato che questo fenomeno interessa dal 10 al 95% degli embrioni a questo stadio di sviluppo^{2,3,4}. Pertanto questa tecnica, che fino all'ultima raccolta di dati dell'ESHRE PGD Consortium⁵ era la più diffusa, sta diventando sempre meno utilizzata per lasciare spazio alla biopsia del trofotoderma.

Biopsia del trofotoderma.

Circa 5-7 giorni dopo l'inseminazione, l'embrione si presenta come uno strato di cellule esterno, il trofotoderma, che avvolge una cavità piena di liquido, il blastocoele, all'interno della quale si trova la massa cellulare interna (Inner Cell Mass, ICM), composta dalle cellule da cui si differenzieranno i vari tessuti embrionali. Le cellule del trofotoderma invece saranno destinate alla formazione dei tessuti extraembrionali, come la placenta. La biopsia allo stadio di blastocisti prevede la rimozione di alcune di queste cellule: la zona pellucida, la membrana che avvolge la blastocisti, viene aperta mediante l'utilizzo di un laser, di cui è stata comprovata la biosicurezza sia in modelli animali che umani⁶; successivamente vengono aspirate 5-10 cellule del trofotoderma che vengono quindi sottoposte ad analisi. Anche attraverso questo metodo, come per la biopsia di un blastomero, possono essere ottenute informazioni sul materiale genetico ereditato da entrambe i genitori, ma la metodica presenta ulteriori vantaggi, tra cui il fatto di sottoporre al test genetico preimpianto più di una cellula dell'embrione, riducendo al 5% i casi di non risultato. Inoltre, a questo livello di sviluppo il grado di mosaicismo è notevolmente ridotto rispetto agli stadi precedenti. Alcuni studi hanno altresì dimostrato che la biopsia allo stadio di blastocisti non riduce le potenzialità di impianto dell'embrione⁷. Nella maggior parte dei casi però il trasferimento dell'embrione non può essere effettuato "a fresco", ed è richiesto il congelamento degli embrioni ed il trasferimento differito.

Che tipo di test vengono effettuati?

I test genetici preimpianto si dividono in

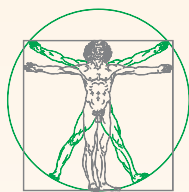
- PGT-A: test genetici preimpianto per aneuploidie
- PGT-SR: test genetici preimpianto per riarrangiamenti strutturali
- PGT-M: test genetici preimpianto per malattie monogeniche

PGT-A

Le aneuploidie cromosomiche sono alterazioni del numero dei cromosomi. Si parla di monosomie quando vi è la perdita di un cromosoma, di trisomie quando invece è presente un cromosoma sovrannumerario.

Possono coinvolgere un singolo cromosoma o possono esserci delle aneuploidie multiple (a carico di più di un cromosoma).

Le aneuploidie sono alterazioni de novo, ovvero non presenti nel DNA del padre e della madre; possono essere dovute ad anomalie presenti già a livello dello spermatozoo e della cellula uovo, generate da errori di segregazione durante le divisioni cellulari che portano alla formazione dei gameti (anomalie di origine meiotica); oppure le alterazioni del numero dei cromosomi possono derivare da errori che



avvengono durante le prime divisioni embrionali (aneuploidie di origine mitotica), quando l'embrione raddoppia molto velocemente il numero di cellule da cui è composto. Le alterazioni cromosomiche numeriche interessano più del 50% degli embrioni umani e la loro incidenza è strettamente correlata all'età materna.

Le aneuploidie sono inoltre la principale causa di fallimenti di impianto e di aborti precoci⁸. Infatti nella maggior parte dei casi, l'alterazione del numero dei cromosomi non è compatibile con una gravidanza a termine. Nell'eventualità in cui l'alterazione numerica sia compatibile con la vita postnatale, essa causa specifiche patologie:

- trisomia del cromosoma 21 : Sindrome di Down
- trisomia del cromosoma 13: Sindrome di Patau
- trisomia del cromosoma 18: Sindrome di Edwards
- anomalie dei cromosomi sessuali

Pertanto, effettuare il test genetico preimpianto per aneuploidie fornisce informazioni sullo stato cromosomico dell'embrione, permettendo quindi di individuare quali sono gli embrioni con corredo cromosomico normale che hanno le maggiori probabilità di dare origine ad una gravidanza, evitando in questo modo alla coppia lo stress legato al fallimento di impianto o all'aborto, conseguenti il trasferimento di embrioni aneuploidi. Inoltre è possibile escludere la presenza di importanti patologie.

Indicazioni per PGT-A

Considerando quindi l'importante ruolo delle alterazioni cromosomiche numeriche nella realizzazione di una gravidanza, i test genetici preimpianto sono indicati nei casi di:

- età materna avanzata
- aborti ripetuti
- ripetuti fallimenti di impianto

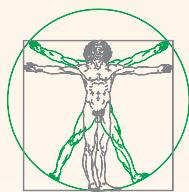
PGT-SR

Le anomalie strutturali comprendono tutte le alterazioni della struttura dei cromosomi, di cui le più comuni sono traslocazioni e inversioni.

Con il termine traslocazione si intende lo scambio di materiale genetico tra due cromosomi non omologhi, che ha come conseguenza la dislocazione di un cromosoma o di una parte di esso su un cromosoma diverso.

In particolare, nelle traslocazioni Robertsoniane sono coinvolti interi cromosomi, mentre le reciproche interessano solo regioni parziali del cromosoma.

Le traslocazioni si dicono bilanciate quando lo scambio non genera la perdita di materiale genetico: in questo caso il portatore della traslocazione risulta essere un individuo sano. Tuttavia nei portatori di



traslocazioni bilanciate, il processo di formazione dei gameti può esitare nella generazione di ovociti e spermatozoi sbilanciati, ovvero in cui il riarrangiamento strutturale ha provocato la perdita o l'acquisizione di materiale genetico.

La presenza di alterazioni parziali può comportare il mancato sviluppo embrionale e quindi la mancanza di una gravidanza o l'interruzione spontanea della stessa, oppure, in alcuni casi, alla nascita di un individuo affetto da gravi patologie. Alcuni studi hanno dimostrato che l'incidenza delle traslocazioni è molto elevata nei pazienti che hanno avuto aborti precedenti⁹, sintomo del fatto che la presenza della traslocazione aumenta il rischio di anomalie cromosomiche negli embrioni; risulta essere inoltre aumentato in coppie in cui uno dei partner ha una traslocazione bilanciata il rischio di disomia uniparentale¹⁰.

Con il termine inversione, invece, si indica l'inversione dell'orientamento di una certa regione cromosomica. Anche in questo caso, seppure il portatore è un individuo sano, la presenza di questa alterazione strutturale può portare alla formazione di gameti sbilanciati e quindi ad alterazioni a livello embrionale.

I PGT-SR permettono di individuare eventuali sbilanciamenti negli embrioni di coppie in cui uno o entrambi i partner sono portatori di un riarrangiamento strutturale in forma bilanciata, riducendo per la coppia il rischio di un ulteriore fallimento di impianto o dell'interruzione spontanea della gravidanza. Inoltre permettono di ridurre l'incidenza di patologie derivate dalla presenza di una traslocazione in forma sbilanciata compatibile con la vita post-natale.

PGT-M

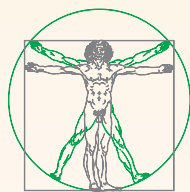
I test genetici preimpianto per patologie monogeniche hanno l'obiettivo di individuare nell'embrione la presenza di mutazioni, già presenti nei genitori, che possono causare una determinata patologia.

Nel caso di patologie recessive, la malattia si manifesta solo se l'embrione eredita la mutazione sia dal padre che dalla madre; la presenza di una sola mutazione infatti, come avviene nei genitori, non causa alcuna disfunzione e l'individuo si dice "portatore sano". In questi casi quindi, la probabilità di due portatori di avere un figlio affetto è di 1:4 (25%).

Per le patologie dominanti, la presenza della mutazione è strettamente correlata al manifestarsi della patologia. Un genitore che presenta la mutazione, ed è quindi anch'esso affetto, ha la probabilità di trasmettere la patologia al 50% della progenie, anche se il partner è sano.

Quando le mutazioni sono a carico di geni che si trovano sui cromosomi sessuali, la trasmissione e la manifestazione della patologia sono legate al sesso del nascituro.

I PGT-M vengono utilizzati per individuare, direttamente o indirettamente, eventuali mutazioni ereditate dagli embrioni, e di evitare quindi il trasferimento di embrioni affetti da gravi patologie. Tra le patologie che possono essere diagnosticate ci sono la Beta-Talassemia, l'Anemia Falciforme, l'Emofilia A e B, la Distrofia Muscolare di Duchenne-Becker, la Distrofia Miotonica, la Fibrosi Cistica, l'Atrofia Muscolare Spinale e la Sindrome dell'X-Fragile.



In generale, possono essere diagnosticate tutte le patologie di cui è stata individuata la mutazione che la provoca.

Quali tecniche vengono utilizzate?

Il centro AMES utilizza tecnologie di ultima generazione per garantire la maggiore accuratezza e sensibilità al momento disponibili nell'ambito dei test genetici preimpianto.

La metodica utilizzata per la rilevazione della aneuploidie è il Next Generation Sequencing (NGS) Illumina. Il DNA delle cellule prelevate mediante biopsia (globuli polari, blastomeri o cellule del trofotoderma) deve essere prima sottoposto a WGA (Whole Genome Amplification), una tecnica che permette di aumentare la quantità del DNA di partenza fino ad arrivare a circa 1 ng.

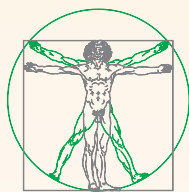
Tramite una sofisticata analisi di laboratorio, il DNA viene sottoposto a un processo di sequenziamento massivo parallelo che impiega tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) utilizzando sequenziatori ILLUMINA.

Tutte le sequenze ottenute sono poi allineate ad un DNA di riferimento: è possibile in questo modo determinare la presenza di eventuali alterazioni del numero dei cromosomi e verificare quindi la presenza di monosomie o di trisomie. Il vantaggio della tecnica NGS, rispetto alle tecniche precedentemente utilizzate per i test genetici preimpianto, è che è possibile identificare anche la presenza di anomalie che interessano solo una porzione di cromosoma (anomalie segmentali), che possono verificarsi anche *de novo* e non essere necessariamente il prodotto di una traslocazione bilanciata presente in uno dei genitori. Sebbene sia stata introdotta solo di recente¹¹, l'accuratezza e la sensibilità della metodica sono ormai largamente condivise.

Inoltre, la sensibilità del sistema NGS ha permesso di meglio identificare e quantificare il mosaicismo dell'embrione. Il mosaicismo embrionale è oggetto di molteplici dibattiti, in quanto è stato dimostrato che il trasferimento di un embrione mosaico può esitare nella nascita di un bambino sano¹², ma non è stato ancora chiarito quali siano gli embrioni da considerarsi utili per il transfer e quali invece debbano essere classificati come aneuploidi. La possibilità di avere uno strumento tanto sensibile permette quindi di avere maggiori informazioni sullo stato di salute dell'embrione. Uno dei limiti della tecnica è l'incapacità di rilevare la presenza di alcune traslocazioni in forma sbilanciata. Per questa ragione, per quanto riguarda i PGT-SR, prima di procedere al trattamento, è necessario verificare con il laboratorio che il test preimpianto per quella specifica alterazione cromosomica possa essere eseguito garantendo la stessa sensibilità e affidabilità.

Karyomapping

La tecnica del Karyomapping, utilizzata dal centro diagnostico polispecialistico AMES, permette di identificare gli embrioni che hanno ereditato una determinata mutazione presente in uno o in entrambi i genitori. La metodica si basa sull'analisi dei Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP): gli SNP informativi vengono utilizzati per stabilire l'origine paterna o materna di ogni segmento cromosomico (aploblocchi). Dall'assemblaggio degli aploblocchi si ottiene l'aplotipo dell'embrione. Il confronto con il DNA di riferimento, appartenente ad un individuo affetto della stessa famiglia, consente poi di classificare l'embrione



come sano, portatore o affetto dalla patologia, mediante analisi di linkage¹³ Il primo step fondamentale è quindi quello della selezione degli SNP informativi. Per far questo sono indispensabili i campioni di sangue della coppia. Inoltre è necessario un campione di sangue di un individuo affetto della stessa famiglia (ad esempio un altro figlio della coppia affetto dalla patologia). Questa prima fase è fondamentale per poter procedere poi alla diagnosi preimpianto. Anche le altre tecniche utilizzate per PGT-M prevedono una fase di set up per la creazione di un test specifico per la coppia e per una determinata patologia, che però è caratterizzata da costi e tempi di attesa piuttosto elevati. Il Karyomapping consente di snellire la fase preparatoria e di avere i risultati in pochi giorni. Inoltre attraverso l'utilizzo di "SNP chiave", ovvero presenti in eterozigosi, è possibile arginare il fenomeno dell'*allele drop out*, che costituisce uno dei più importanti fattori di rischio di misdiagnosi nell'ambito delle indagini genetiche preimpianto¹⁴. L'utilizzo degli SNP permette di utilizzare il Karyomapping per la maggior parte delle patologie da singolo gene, in quanto il test sviluppato da Illumina interroga circa 300000 SNP che coprono l'intero genoma. Il Karyomapping consente inoltre di evidenziare la presenza di monosomie o trisomie di origine meiotica, attivazione partenogenica e disomia uniparentale (causa per esempio della sindrome di Prader Willy o della sindrome di Angelman)¹⁵. I limiti della tecnica sono costituiti principalmente dal fatto che non possono essere individuate trisomie di origine mitotica e che se avvengono eventi di ricombinazione in regioni molto vicine al sito di indagine i risultati possono essere di difficile interpretazione. Inoltre non possono essere identificate mutazioni *de novo*. L'enorme potenziale della tecnica, però, ha consentito, a partire dal 2013, anno in cui è stata commercializzata, un'enorme diffusione della stessa nei laboratori di tutto il mondo.

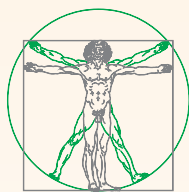
Alcuni dati sulla tecnologia NGS

L'introduzione di test genetici preimpianto di seconda generazione, ovvero in grado di screenare contemporaneamente tutti i cromosomi, ha permesso di aumentare notevolmente le percentuali di successo di trattamenti di PMA in coppie con particolari indicazioni¹⁶. La tecnica maggiormente utilizzata fino a qualche anno fa era l'array *Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH). Nel 2014 il sistema NGS è stato per la prima volta applicato per lo screening preimpianto delle aneuploidie, evidenziando risultati sovrapponibili a quelli dell'array-CGH e mostrando una maggiore sensibilità e accuratezza. Grazie alle sue elevate potenzialità questa metodica si è ampiamente diffusa e i dati più recenti evidenziano che l'utilizzo della tecnica NGS per i PGT-A aumenta la percentuale di gravidanze a termine rispetto a cicli in cui viene utilizzata la metodica array-CGH (62% vs. 54.4% di gravidanze a termine rispettivamente)¹⁷.

Inoltre la risoluzione elevata del sistema permette la rilevazione di anomalie segmentali fino a 1,5 mb¹⁸ e una più accurata valutazione del mosaicismo embrionale¹⁹.

Alcuni dati sul Karyomapping

Dopo una prima validazione della tecnica condotta da Natesan e dai suoi collaboratori nel 2014²⁰, numerosi altri studi hanno confermato l'accuratezza e l'affidabilità del Karyomapping^{21, 22}. Uno di questi ha avuto come oggetto di studio 55 casi clinici in cui la diagnosi preimpianto è stata effettuata sia mediante il metodo tradizionale, sia con Karyomapping. Delle 251 blastocisti analizzate, il Karyomapping ha permesso di diagnosticare il 99.6% di embrioni, mentre il test con PCR ha dato un risultato solo sul



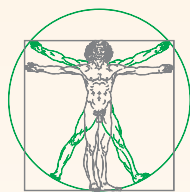
96.8%. Questa differenza è dovuta principalmente alla possibilità di ridurre al minimo il fenomeno dell'*allele drop out*, che può essere conseguenza anche della frammentazione del DNA in seguito alla biopsia. Inoltre l'utilizzo degli SNP permette di individuare i siti di ricombinazione, permettendo una diagnosi anche nel caso in cui il *cross-over* avvenga nelle regioni strettamente in prossimità del gene di interesse. Il tempo richiesto per preparare il test inoltre è risultato essere di circa un quarto rispetto ai metodi tradizionalmente utilizzati, il che riduce lo stress della coppia ed evita ritardi che potrebbero dilungare i tempi della procedura, che per le pazienti che ricorrono a PMA sono di fondamentale importanza.

Chi può richiedere i test genetici preimpianto?

L'art. 14, comma 5, della legge 40/2004, sancisce il diritto per coppie infertili che accedono ai trattamenti di PMA "di essere informati sullo stato di salute degli embrioni prodotti e da trasferire in utero". Le Linee-Guida emanate con DM del 30 aprile 2008 in seguito alla sentenza pronunciata dalla sezione Terza del Tar del Lazio il 21/01/2008, n.398, hanno eliminato il limite della possibilità di indagine, che prima della sentenza poteva essere solo osservazionale. Pertanto le coppie che accendono alla PMA, e che hanno l'indicazione per effettuare questo tipo di indagine, possono richiedere di effettuare i test genetici sull'embrione.

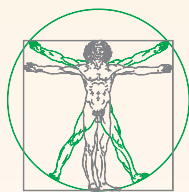
Dopo la sentenza 96/2015 della Corte Costituzionale, anche le coppie fertili portatrici di patologie genetiche (munite del certificato previsto dall'art. 6 della legge 194/78) possono sottoporsi alla PMA e alla diagnosi prima di procedere al trasferimento embrionale, con la possibilità di decidere di non avviare la gravidanza.

È importante ricordare che i test genetici preimpianto non sostituiscono la diagnosi prenatale, che è fortemente raccomandata per le gravidanze ottenute da PMA comprensiva di test genetici preimpianto, soprattutto nel caso di patologie monogeniche.



Bibliografia

1. Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Walle J, White M, et al. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med* 1997;62:182-187.
2. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995;15(1):41-9.
3. Daphnis DD, Delhanty JD, Jerkovic S, Geyer J, Craft I, Harper JC. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Hum Reprod* 2005;20(1):129-37.
4. Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendia P, Pehlivan T, Vilorio T, De los Santos MJ, Simon C, Remohi J, et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn* 2007;27(8):748-56.
5. De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, and Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Human Reproduction* 2017;32(10):1974-1994.
6. Rienzi L, Greco E, Ubaldi F, Iacobelli M, Martinez F and Tesarik J. Laser-assisted intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:1045-1047.
7. Scott RT Jr, Upham K M, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility* 2013;100(3):624-630.
8. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2001;2(4):280-91.
9. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990;5:519-528.
10. Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). *Mol Cytogenet* 2010;3: 8.
11. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, Kokocinski F, Caude- Michel CE, Minasi MG, Greco E. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Human Reproduction* 2014;29:2802-2813.
12. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med* 2015;373:2089-90.
13. Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA, Griffin DK. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *Journal of medical genetics* 2010;47(10):651-8.
14. Gould RL, Griffin DK. Karyomapping and how is it improving preimplantation genetics?, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2017;17:6, 611-621.
15. Natesan SA, Handyside AH, Thornhill AR, Ottolini CS, Sage K, Summers MC, Konstantinidis M, Wells D, Griffin DK. Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders. *Reprod Biomed Online* 2014;29(5):600-5



16. Dahdouh EM, Balayla J, García-Velasco JA. Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *FertilSteril* 2015;104(6):1503-12.

17. Friedenthal J, Maxwell SM, Munné S, Kramer Y, McCulloh DH, McCaffrey C, Grifo JA. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *FertilSteril* 2018;109(4):627-632.

18. Munné S, Blazek J, Large M, Martinez-Ortiz PA, Nisson H, Liu E. et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *FertilSteril* 2017;108: 62-71.

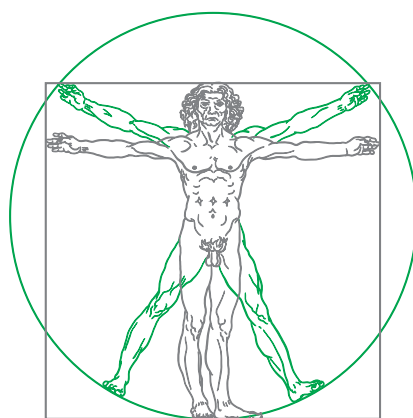
19. Lai HH, Chuang TH, Wong LK, Lee MJ, Hsieh CL, Wang HL, Chen SU. Identification of mosaic and segmental aneuploidies by next-generation sequencing in preimplantation genetic screening can improve clinical outcomes compared to array-comparative genomic hybridization. *MolCytogenet* 2017;26:10:14.

20. Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S, Qubbaj W, Prates R, Munne S et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med* 2014;16: 838-45 .

21. Konstantinidis M, Prates R, Goodall NN, Fischer J, Tecson V, Lemma T, et al. Live births following Karyomapping of human blastocysts: 26 experience from clinical application of the method. *Reprod Biomed Online* 2015;31:394-403.

22. Thornhill AR, Handyside AH, Ottolini C, Natesan SA, Taylor J, Sage K, Harton G, Cliffe K, Affara N, Konstantinidis M, Wells D, Griffin DK. Karyomapping-a comprehensive means of simultaneous monogenic and cytogenetic PGD: comparison with standard approaches in real time for Marfan syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(3):347-56.

*According to The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017



AMES
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA