

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

Mosaicismo cromosómico en embriones preimplantacionales:
Utilidad y controversia ante el uso del Diagnóstico Genético
Preimplantacional (DGP)

Autor: Daniel Bayo Garrido.

Tutor: Cristina González Ravina.

Alcobendas, Septiembre 2022

Índice general

Portada.....	1
Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
2. Objetivos.....	10
3. Materiales y métodos.....	11
4. Resultados y discusión.....	12
4.1. Importancia clínica del mosaicismo.....	12
4.2. Efecto de la edad materna y distribución de embriones mosaicos por rangos de edad...13	
4.3. Impacto clínico en nacidos vivos y preocupaciones éticas.....	14
4.4. Impacto del mosaicismo en la implantación y eficiencia del diagnóstico genético preimplantacional.....	15
4.4.1. Calidad en la evaluación del blastocisto y número de células analizadas.....	16
4.4.2. Tasas de implantación.....	17
4.4.3. Análisis de POCs.....	17
4.5. Desafíos analíticos en el diagnóstico del mosaicismo.....	18
4.6. Eficiencia del PGT-A e interpretaciones erróneas en el diagnóstico de mosaicismo.....	20
4.7. Selección de embriones y asesoramiento genético a pacientes.....	24
4.8. Direcciones futuras.....	28
5. Conclusiones.....	31
6. Bibliografía.....	32

Índice de figuras

-Figura 1. (A) No disyunción de cromosomas en la meiosis I y (B) No disyunción de las cromátidas hermanas en la meiosis II.....	5
-Figura 2. Tipos de mosaicismo de blastocisto y posibles opciones de biopsia de TE, así como sus respectivas precisiones en el diagnóstico del mosaicismo.....	7
-Figura 3. Las tasas de implantación de la transferencia de embriones euploides son independientes de la edad materna.....	13
-Figura 4. Paciente con “aneuploidía abigarrada en mosaico con microcefalia.....	15
-Figura 5. Ilustración del cambio en la interpretación tradicional frente a la interpretación revisada de los resultados de aCGH con el cribado genético preimplantacional (PGS).....	19
-Figura 6. Uso esquemático de umbrales intermedios de número de copias para designar un embrión como mosaico.....	22

-Figura 7. Ilustración del impacto de un número de células subóptimo (falta o exceso) que conduce a un mosaicismo falso positivo de una muestra con aneuploidía uniforme.....23

-Figura 8. Ilustración del impacto del nivel de ruido en la precisión de la predicción de la euploidía (menos ruido) y la tasa de error al predecir el mosaicismo (más ruido) con umbrales de número de copias simples.....24

Índice de tablas

-Tabla 1. Posibles explicaciones y riesgos asociados para los resultados de mosaicos después del análisis de PGT.....12

-Tabla 2. Distribución de embriones por grupo de edad y diagnóstico.....14

-Tabla 3. Resultados clínicos de blastocistos únicos mosaicos transferidos18

-Tabla 4. Guías y recomendaciones para la priorización a la hora de transferir embriones en mosaico en función del cromosoma implicado.....26

Resumen

El mosaicismos cromosómico se define como la presencia conjunta de células con dos o más constituciones cromosómicas diferentes. A diferencia de anomalías derivadas de la meiosis, las cuales afectan a todas las células embrionarias, el mosaicismos tiene lugar debido a errores postcigóticos, es decir errores en la mitosis. De esta forma, los embriones en mosaico pueden albergar tanto células euploides como aneuploides (mosaicos euploides/aneuploides) o estar completamente compuestos por células anormales (mosaicos aneuploides). Existe evidencia científica de que entre los eventos celulares que conducen al mosaicismos embrionario se encuentra la no disyunción mitótica y el fenómeno conocido como “retraso de la anafase”.

Queda demostrado que tanto las tasas de implantación como las de embarazo en curso de embriones mosaicos no son inferiores a las de embriones euploides. Además, existe una amplia variación de fenotipos en nacidos vivos con mosaicismos cromosómico, lo cual depende en cierta medida del número de cromosomas afectados y de cuáles son, por lo que se han confeccionado guías y recomendaciones para asesorar a pacientes que se vean inmersos en esta situación.

Aunque en los últimos años ha habido grandes avances en las técnicas empleadas para realizar PGT-A, el diagnóstico de mosaicismos está dificultado por muchos factores. En primer lugar, la capacidad para detectar mosaicismos cromosómico en biopsias de trofoctodermo es limitada, debido a que las células que presentan mosaicismos pueden confinarse exclusivamente a la masa celular interna. Además, el uso de umbrales arbitrarios de número de copias, que supone la principal estrategia para detectar mosaicismos presenta la desventaja de no ser un método preciso, principalmente debido a la incapacidad de distinguir el ruido técnico de la señal biológica. Estos datos nos sirven para argumentar que son necesarios mejores métodos para predecir la presencia de mosaicismos e interpretar el verdadero significado clínico del mismo, prevenir el descarte de embriones euploides y reducir así los daños emocionales generados a los pacientes.

Palabras clave: Mosaicismos cromosómico, PGT-A, diagnóstico, asesoramiento, NGS, relevancia clínica.

1. Introducción

Las anomalías cromosómicas son una entidad propia dentro de las enfermedades genéticas, constituyendo una gran proporción del conjunto de pérdidas reproductivas, malformaciones congénitas y retraso mental. Estas pueden ser numéricas o estructurales, pero debido al interés y objetivos del presente trabajo, centraremos nuestra atención en las primeras.

La etiología de las anomalías cromosómicas en embriones humanos antes de la implantación es multifacética, pues los errores pueden provenir del ovocito, el espermatozoide o producirse durante las divisiones mitóticas que subyacen a la embriogénesis (1).

De esta forma, la primera anomalía cromosómica y que, también es la más común se trata de la aneuploidía, la cual es causa principal de la implantación fallida, la pérdida de embarazo y los defectos congénitos. Consiste en una condición alterada que implica una desviación en la dotación diploide ($2n$) normal en células somáticas humanas, dando lugar a diferentes anomalías numéricas (no múltiplo de n) entre las que se encuentran la monosomía y la trisomía, correspondiente a una dotación genética de 45 y 47 cromosomas, respectivamente (2).

La aneuploidía tiene su origen principalmente en los errores en la segregación cromosómica y de las cromátidas, respectivamente (tanto en gameto masculino como en el femenino) que suceden en la meiosis I y la meiosis II. Estos errores de la meiosis pueden ser debidos a una no disyunción, según la cual los cromosomas homólogos o las cromátidas hermanas no se separan (Fig. 1A, 1B), dando lugar así a gametos disómicos o nulisómicos, resultando, por tanto, en embriones trisómicos y monosómicos, respectivamente. Por tanto, en esta no disyunción clásica, como resultado de errores en el emparejamiento y/o en la recombinación se produce una inadecuada segregación de los cromosomas o las cromátidas hermanas (3).

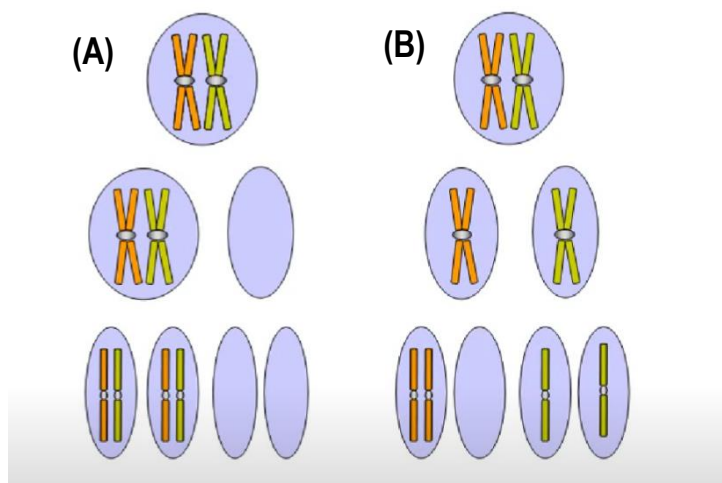


Figura 1. (A) No disyunción de cromosomas en la meiosis I y (B) No disyunción de las cromátidas hermanas en la meiosis II. (elaboración propia)

Otro de los errores que se pueden producir en la meiosis (en la meiosis materna) consiste en separación prematura de los cromosomas homólogos o las cromátidas hermanas en la meiosis I o la meiosis II, respectivamente. Si el fallo se produce en la meiosis I, la separación prematura de los homólogos produce dos univalentes desapareados y, suponiendo una segregación aleatoria de univalentes, la producción de un ovocito con una composición cromosómica equilibrada o con un cromosoma extra o faltante es igualmente probable. Si el fallo sucede en la meiosis II, la pérdida prematura de cohesión entre los centrómeros hermanos da como resultado su segregación independiente, produciendo ovocitos con una constitución cromosómica equilibrada y con cromátidas extra o faltantes con la misma frecuencia (3).

La gran mayoría de los errores meióticos derivan de la meiosis materna (90-99 %). De forma general, se estima que el 50-70 % se originan en la meiosis I y el 30-50 % se originan en la meiosis II (2).

Por otro lado, a pesar de que todas las células embrionarias proceden del mismo cigoto, no todas comparten complementos cromosómicos idénticos, ya que los errores mitóticos durante el desarrollo del embrión pueden dar como resultado poblaciones de células cromosómicamente distintas, denominándose estos embriones mosaico. Por tanto, la definición de mosaicismo cromosómico es la presencia conjunta de células con dos o más constituciones cromosómicas diferentes. El mosaicismo puede ocurrir ya en la etapa de 2 células, aunque la detección se suele dar en la etapa de blastocisto, pues en ese estadio evolutivo se pueden analizar más trofoectodermo (TE) simultáneamente (4).

Mientras que las anomalías derivadas de la meiosis generalmente afectan a todas las células embrionarias de forma uniforme dando lugar tal y como se ha expuesto anteriormente a embriones aneuploides, los errores postcigóticos conducen al mosaicismo, es decir, la presencia de células cromosómicamente distintas en el mismo embrión. De esta forma, los embriones en mosaico pueden albergar tanto células euploides como aneuploides (mosaicos euploides/aneuploides) o estar completamente compuestos por células anormales (mosaicos aneuploides). También se han observado mosaicos de ploidía, que comprenden cualquier combinación de células haploides, diploides y poliploides, tanto en la etapa de escisión del desarrollo como de blastocisto (1).

Entre los eventos celulares que conducen al mosaicismo embrionario se encuentra la no disyunción mitótica (falta de disyunción) y el fenómeno conocido como "retraso de la anafase". La falta de disyunción mitótica conduce a anomalías cromosómicas complementarias (ganancias y pérdidas recíprocas). Se va a considerar el caso en el que un fallo mitótico da lugar a células con dos complementos cromosómicos diferentes pero recíprocos, es decir, uno con trisomía 14 y otro con monosomía 14. El

procedimiento habitual de diagnóstico consiste en lisar las células del TE biopsiadas y analizarlas como una sola muestra. Suponiendo que el que número de células trisómicas y monosómicas en la biopsia fuera igual, el cromosoma 14 adicional de las células trisómicas compensaría la falta de uno de los cromosomas 14 en las células monosómicas, por lo que la cantidad total del cromosoma 14 en el lisado sería normal, y el resultado parecería normal (disomía 14), por lo que la presencia de mosaicismo pasaría desapercibida. Por otro lado, el mosaicismo embrionario también puede estar causado por la pérdida de un cromosoma cuando se mueve al polo de la célula durante a la anafase, hecho conocido como “retraso de la anafase” (5,6).

En la etapa de blastocisto, se han descrito cinco tipos de embriones en mosaico según el linaje celular afectado. Si existen células euploides y aneuploides en la masa células interna (MCI) y el TE se observa “mosaicismo total”. Otro caso puede ser que la población en mosaico se confine exclusivamente a algunas células de la MCI o del TE, observándose así “mosaicismo MCI” o “mosaicismo TE”, respectivamente. Por último, un embrión que contenga todas las células de la MCI o del TE aneuploides se clasifica como “mosaicismo MCI/TE” (Fig 2) (4).















Mosaicism type	Possible TE biopsy	Diagnoses accuracy
Total Mosaic 	 Euploid	Misdiagnosis
	 Mosaic	Accurate
	 Aneuploid	Misdiagnosis
ICM Mosaic 	 Euploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)
TE Mosaic 	 Euploid	Misdiagnosis
	 Mosaic	Accurate
	 Aneuploid	Misdiagnosis
ICM/TE Mosaic Type I 	 Euploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)
ICM/TE Mosaic Type II 	 Aneuploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)

Figura 2. Tipos de mosaicismo de blastocisto y posibles opciones de biopsia de TE, así como sus respectivas precisiones en el diagnóstico del mosaicismo. Como se observa en la figura, es incorrecto extrapolar a todo el embrión el porcentaje de mosaicismo detectado en las células biopsiadas, pues la concordancia entre la biopsia de TE y el embrión completo puede venir condicionada por factores como el número de células biopsiadas, el grado de mosaicismo, la ubicación de la biopsia y la calidad experimental del procedimiento seguido (4).

Existen muchos factores que dificultan el diagnóstico de mosaicismo, ya que un mosaicismo MCI/TE y mosaicismo MCI no se detectan ante la biopsia de TE, pues un embrión mosaico MCI/TE biopsiado mostrará los diagnósticos contrarios al observado en la MCI y en el caso del mosaicismo MCI, la biopsia será totalmente euploide, generando así diagnósticos erróneos. Incluso en embriones mosaicos TE, la detección varía según la ubicación de la biopsia en función de la distribución tisular de células aneuploides cromosómicamente distintas (Fig 2) (4).

Desafortunadamente, el error de muestreo expuesto anteriormente no es el único desafío biológico. También existe la posibilidad de tener células con errores recíprocos contenidas en una sola biopsia, tal y como se ha expuesto anteriormente.

Además, cada laboratorio de Test Genético Preimplantacional (PGT) tiene un enfoque determinado a la hora de detectar el mosaicismo, los umbrales empleados y la forma de clasificarlos. Para discriminar entre muestras aneuploides y euploides se hace uso de valores de umbral determinados por medios estadísticos. De este modo, los embriones se clasifican como mosaicos cuando el resultado cae en un rango “intermedio” entre los valores de umbral. Los umbrales y rangos varían según el método bioinformático utilizado por el laboratorio de análisis genético. Cuando los rangos de euploides y aneuploides son estrechos, las biopsias que son diagnosticadas como euploides y aneuploides tienen menos posibilidades de ser falsos positivos (es decir, es más probable que sean completamente euploides y aneuploides, respectivamente). Sin embargo, estos rangos euploides y aneuploides estrechos conllevan un rango intermedio más amplio (mosaico) y, por tanto, un mayor número de embriones diagnosticados como diagnóstico incierto (5).

El enfoque actual en las clínicas de fertilidad aboga por conseguir un recién nacido vivo sano mediante una transferencia electiva de un único embrión (eSET), con el objetivo de evitar complicaciones clínicas asociadas a un embarazo múltiple.

Debido a que normalmente los pacientes contarán con una cohorte embrionaria extensa disponible para la transferencia, se pretende clasificar a estos embriones en orden de mayor a menor probabilidad de éxito de implantación. Aunque se han desarrollado excelentes sistemas de estandarización para evaluar la morfología embrionaria, la práctica sigue siendo subjetiva y se ha demostrado que la morfología por sí sola no es un predictor totalmente fiable para el éxito en la implantación (2).

En el momento en el que se comprendió que los embriones humanos usualmente albergan anomalías cromosómicas, se empezaron a emplear perfiles cromosómicos para descartar los embriones con anomalías en el número de copias y anomalías estructurales. De este modo, la primera aplicación (a principios de la década de los 90) que se llevó a cabo fue determinar el estado XX/XY de los embriones

en pacientes con enfermedades hereditarias ligadas al cromosoma X, y para ello se extraía una muestra celular representativa de cada embrión y se analizaba por métodos moleculares (7).

Posteriormente, se entendió que el perfil autosómico también podría volverse clínicamente aplicable, desarrollándose así el Test genético preimplantacional para aneuploidías (PGT-A) y reordenamientos estructurales (PGT-SR). El PGT-A buscan identificar embriones preimplantacionales con un complemento cromosómico normal (euploides) y descartar embriones con número anormal de cromosomas (aneuploides) (2).

Hay que tener en cuenta que las versiones anteriores del PGT-A eran ineficaces y, en algunos casos perjudiciales, debido al trauma inducido por la biopsia y a que la tecnología en ese momento solo podía analizar una fracción de todos los cromosomas. De hecho, tradicionalmente se empleaba la hibridación fluorescente in situ (FISH) para detectar variaciones en el número de copias. Posteriormente, se consiguieron pulir métodos de detección de los 24 cromosomas que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), matrices de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), matriz de hibridación genómica comparativa (aCGH) y, más recientemente las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) (8,9).

Aunque siga siendo controvertida, la aparición de estas nuevas tecnologías en PGT-A y el cambio a una biopsia menos traumática en estadio de blastocisto han derivado en la aceptación generalizada del PGT-A, aunque evaluar el impacto total y la utilidad del PGT-A requiere la consideración de múltiples factores, como son el grado de mosaicismo embrionario, la sensibilidad de la plataforma tecnológica empleada, la pérdida de embriones durante el cultivo de los mismos, la criopreservación de los embriones y la experiencia del embriólogo (variabilidad interclínica) (9).

Concretamente, aCGH y NGS son lo suficientemente sensibles como para detectar mosaicismo de bajo grado en una biopsia de TE. Aunque la tasa de mosaicismo real en blastocistos no está bien definida, cuando se realiza NGS los datos sugieren que entre el 10 y el 30 % de las biopsias de TE pueden diagnosticarse como mosaico (8).

En este trabajo, se analizarán principalmente las implicaciones y repercusiones que suponen los embriones mosaicos preimplantacionales de cara al potencial de implantación y al futuro RNIV y la utilidad de las pruebas genéticas preimplantacionales (PGT-A) para detectar este mosaicismo.

2. Objetivos

- Abordar el concepto de embriones mosaicos preimplantacionales y estudiar la repercusión que estos presentan sobre el éxito de la implantación y la salud del futuro Recién Nacido Vivo (RNV).
- Detallar los conceptos e interpretaciones que se obtienen a partir del Diagnóstico Genético Preimplantacional, enfocando el interés principalmente en el Test Genético Preimplantacional para Aneuploidías (PGT-A), considerando las limitaciones que presenta a la hora de la predicción de embriones mosaicos.
- Estudiar el efecto de la edad materna sobre los embriones mosaicos, así como la distribución de los mismos por rangos de edad.
- Plantear la forma en que médicos, genetistas y embriólogos deben asesorar a los pacientes cuando se diagnostica un embrión en mosaico, teniendo en cuenta las consecuencias que puede tener la transferencia de estos, así como la relevancia clínica de un embrión con estas características.
- Analizar futuras direcciones en el campo de la investigación de embriones en mosaico y la mejora en el diagnóstico de los mismos, teniendo en cuenta los avances necesarios para lograrlo.

3. Materiales y métodos

Para la elaboración de esta revisión narrativa se han recopilado, filtrado y sintetizado artículos científicos en las bases de datos de Pubmed y Google Scholar utilizando los siguientes términos en inglés: “chromosomal mosaicism”, “embryo”, “implantation” “next generation sequencing”, “PGT-A”, “meiotic errors” “chromosomal abnormalities”, “biopsy”, “blastocyst” en combinación con otras palabras clave relacionadas con el área temática. Se han discutido críticamente artículos relevantes en idioma inglés, publicados hasta noviembre de 2021.

En la base de datos Pubmed se han utilizado operadores booleanos u operadores de lógica con el objetivo de acotar más el resultado de la búsqueda. Específicamente se ha empleado el operador “AND” (Y), el cual representa la intersección de dos conjuntos, es decir, obliga a que los dos términos tengan que estar presentes en los resultados.

Además, durante la búsqueda bibliográfica se han usado eventualmente el uso de restricciones, sobre todo en las fechas de publicación y las palabras presentes en el texto, para lo cual se ha empleado la opción de “búsqueda avanzada” en Pubmed.

4. Resultados y discusión

4.1. Importancia clínica del mosaicismo

La importancia clínica del mosaicismo cromosómico aún no está correctamente establecida. En primer lugar, queda demostrado que los embriones preimplantacionales cuentan con mecanismos robustos de autocorrección, tal y como sugieren los datos que muestran que las tasas de mosaicismo placentario son similares entre mujeres fértiles e infértiles en el momento de la obtención de la vellosidades coriales (biopsia corial). En segundo lugar, tal y como se ha explicado anteriormente, las células del trofoectodermo pueden no presentar la misma dotación genética que las células de la MCI, y otros tejidos embrionarios pueden estar compuestos por líneas celulares que difieren de las células obtenidas durante la biopsia. Finalmente, la distribución de células anormales en un embrión puede diferir según el momento de los eventos mutacionales y el grado de proliferación de las células aneuploides versus euploides. Por tanto, los embriones que acaban siendo considerados como mosaicos por PGT-A tienen el potencial de convertirse en un feto que es cromosómicamente normal, cromosómicamente anormal o mosaico de bajo, medio o alto grado (8). En la Tabla 1 se muestra las distintas explicaciones para los resultados del PGT-A y los distintos riesgos asociados.

Tabla 1. Posibles explicaciones y riesgos asociados para los resultados de mosaicos después del análisis de PGT

Explicación	Composición embrionaria	Evaluación de los riesgos
Biopsia completamente euploide dentro del rango de resultado mosaico	Probablemente euploide	Riesgo bajo
Biopsia completamente aneuploide dentro del rango de resultado de mosaico	Probablemente aneuploide	Alto riesgo de fallo de implantación, aborto espontáneo o de algún síndrome dependiendo del cromosoma involucrado
Biopsia de mosaico (euploide/aneuploide)	TE mosaico, MCI euploide	Bajo riesgo de mal resultado; sin embargo, posible riesgo de CPM ¹ (incluyendo RCIU ²) dependiendo del cromosoma involucrado
	TE mosaico, MCI aneuploide	Alto riesgo de fallo de implantación, aborto espontáneo o de algún síndrome dependiendo del cromosoma involucrado
	TE mosaico, MCI mosaico	Riesgo en gran parte desconocido; depende del cromosoma implicado, tipo de tejidos afectados y proporción de células aneuploides
Mosaico con anomalías cromosómicas complementarias (ganancias y pérdidas recíprocas)	Probablemente aneuploide o mosaico, sin células euploides	Alto riesgo de fallo de implantación, aborto espontáneo o de algún síndrome dependiendo del cromosoma involucrado
¹ CPM: Mosaicismo placentario confinado ² RCIU: Restricción del crecimiento intrauterino		

4.2. Efecto de la edad materna y distribución de embriones mosaicos por rangos de edad

Se ha demostrado que la transferencia de un blastocisto cromosómicamente normal da como resultado una tasa de implantación que permanece constante independiente de la edad materna (Fig. 3), lo que respalda la hipótesis de que el PGT-A ayuda en la identificación de embriones viables y demuestra que la razón principal (y quizás la única) de la disminución en las tasas de implantación de embriones por transferencia con el avance de la edad materna es la aneuploidía (10).

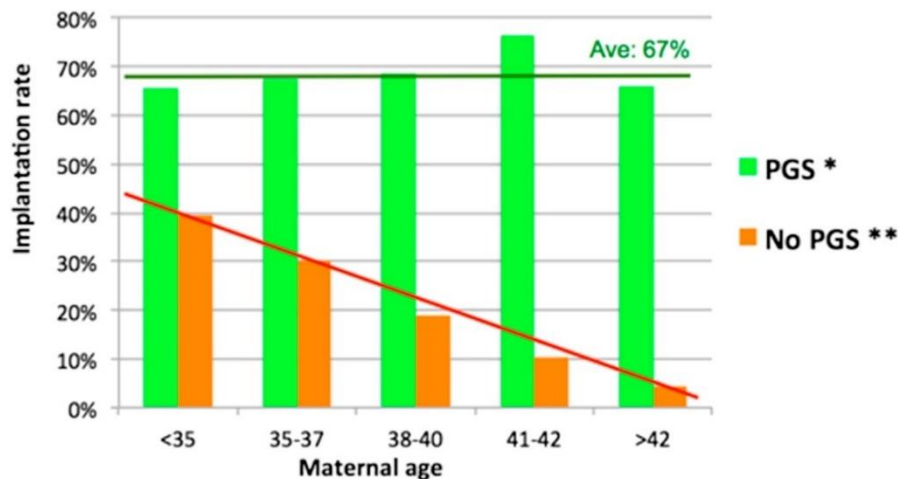


Figura 3. Las tasas de implantación de la transferencia de embriones euploides son independientes de la edad materna. * 2532 ciclos de PGT-A por aCGH con resultado conocido (2015); ** Datos SART 2013 (10).

Se sabe que alrededor del 30 % de los blastocistos son mosaicos en la etapa de blastocisto, cifra cercana a la de hace algunos años usando FISH, pero ahora ha sido confirmada usando NGS. Debido a que estas anomalías tienen un origen postmeiótico, es concebible que las insuficiencias del cultivo embrionario desempeñen un papel en la génesis de este problema, aumentando el riesgo de mala segregación cromosómica durante la mitosis. Esto sigue siendo muy especulativo en este momento, pero hay alguna evidencia de que las tasas de mosaicismo de blastocisto pueden variar entre las clínicas de FIV, lo que sugiere efectos relacionados con el procedimiento. Aunque casi un tercio de los blastocistos son mosaicos, la probabilidad creciente de aneuploidía meiótica (derivada de ovocitos) con el aumento de la edad materna significa que la proporción de embriones que son mosaicos euploides/aneuploides disminuye con la edad, del 26,6 % en mujeres menores de 35 años al 10,5 % en mujeres mayores de 42 años (Tabla 2) (10).

Como se observa en la Tabla 2, conforme aumenta la edad del ovocito, disminuye el porcentaje de embriones euploides y de embriones mosaicos euploides/aneuploides, y aumenta el porcentaje de embriones aneuploides y embriones mosaicos aneuploides. Estos datos concuerdan a la perfección con los resultados proporcionados en numerosos estudios previos, los cuales han indicado el aumento de

fallos en la meiosis materna y, por tanto, mayor número de aneuploidías en los embriones de las gestantes.

Tabla 2. Distribución de embriones por grupo de edad y diagnóstico

Edad (años)	Euploide (%)	Aneuploide (%)	Mosaico y aneuploide (%)	Mosaico euploide/aneuploide	Total
Donante de óvulos	61.2	14.8	6.5	17.4	1972
<35	48.2	18.6	6.6	26.6	2363
35-37	43,9	26.4	9.3	20.5	1572
38-40	33.1	35.6	13.5	17.9	1526
41-42	17.0	51.6	17.5	13.9	689
>42	10.6	57.6	21.2	10.5	436

4.3. Impacto clínico en nacidos vivos y preocupaciones éticas

La frecuencia de mosaicismo en nacidos vivos es indeterminada, ya que los análisis cromosómicos en nacidos vivos, niños y adultos se realizan en su mayoría solo cuando existe una indicación clínica o una fuerte sospecha de un trastorno cromosómico. De hecho, las manifestaciones clínicas están representadas por un espectro de fenotipos, y su relación con diferentes síndromes ha sido ampliamente descrita. Por ejemplo, se ha informado una mayor incidencia de mosaicismo cromosómico en personas con trastornos psiquiátricos importantes y enfermedades autoinmunes (4).

La incidencia de mosaicismo en varias enfermedades se ha descrito de la siguiente manera: 3-18 % en síndromes cromosómicos; 3-5 % en retraso mental y/o malformación congénita múltiple; 16 % en autismo: esquizofrenia con aneuploidía en mosaico de los cromosomas 1, 18 y X en células de cerebro esquizofrénico; aneuploidía del cromosoma X en mosaico en linfocitos sanguíneos; monosomía del cromosoma X en esclerosis sistémica (6,2 % de las células); enfermedad tiroidea autoinmune (4,3 % de las células); y enfermedad de Alzheimer (>10 % en células cerebrales) (11).

Además, se han implicado anomalías cromosómicas complejas en las aneuploidías en mosaico de los nacidos vivos. Se va a comentar un ejemplo sobre un adulto con microcefalia grave y retraso mental en el que el análisis de linfocitos, fibroblastos de piel, médula ósea y linfocitos mostro más del 10% de células con trisomía en muchos cromosomas distintos, con la excepción de los cromosomas 5, 10, 13, 14 y 17. En este caso, la existencia de la trisomía en mosaico predominante en cuatro tejidos específicos y en cultivos repetidos durante un periodo de 3 años sugirió que el mosaicismo se debió a

una anomalía genética que resultó en inestabilidad mitótica. Se sugirió el término “aneuploidía abigarrada en mosaico con microcefalia” como término descriptivo para este síndrome (4,12)(Fig. 4).



Figura 4. Paciente con “aneuploidía abigarrada en mosaico con microcefalia”. (A) Muestra fusión prematura de la sutura sagital y acortamiento rizomérico leve de la parte superior de las extremidades. (B, C) Fenotipo destacable de frente con protuberancia frontal, ojos hundidos, orejas bajas y redondas pequeñas y micrognatia (12).

Otras trisomías brindan información adicional sobre el impacto del mosaicismo en los nacidos vivos. La trisomía 18 en mosaico muestra un amplio espectro fenotípico, que va desde los casi normal hasta la muerte prematura. Aunque es raro, las personas con trisomía 15 en mosaico muestran características similares, que incluyen retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), anomalías craneofaciales y dimorfismos faciales, enfermedad cardíaca, hipopigmentación, vasculatura cerebral anormal, riñones displásicos y otras anomalías orgánicas. Además existe cierta evidencia de que casi todos los individuos son mosaicos para la trisomía 21 en algunos tejidos (4).

Explicar la amplia variación fenotípica del mosaicismo no es sencillo. Una posible explicación utiliza la inactivación sesgada del cromosoma X (XCI), en la que un cromosoma X se inactiva preferentemente (en lugar de inactivarse aleatoriamente). La idea es que, en el momento de la inactivación del cromosoma X, la presencia de una elevada proporción de células trisómicas en el embrión provoque su posterior eliminación por selección. Se propone que en la XCI en tales casos se dan resultados fetales deficientes porque no todas las células trisómicas se eliminan de los tejidos fetales. Aun así, para explicar la amplia variación en los fenotipos de nacidos vivos con mosaicismo se necesitan más datos de resultados clínicos, además de estudios con un mayor número de embriones y un mayor enfoque en las consecuencias de la transferencia de embriones en mosaico (4).

4.4. Impacto del mosaicismo en la implantación y eficiencia del diagnóstico genético preimplantacional

Actualmente existen técnicas como la NGS que permiten diagnosticar el mosaicismo cromosómico en un grupo de células del TE, presentando así la posibilidad de decidir sobre la transferencia de embriones en mosaico y hacer un seguimiento de ellas con resultados clínicos, aunque

los estudios que ofrecen resultados clínicos después de la transferencia de embriones mosaicos siguen siendo escasos.

Para evaluar la incidencia real y las posibles consecuencias de la transferencia de embriones mosaicos, el diagnóstico debe evaluarse en tres niveles: calidad en la evaluación del blastocisto y número de células analizadas, tasas de implantación y aborto y salud del bebé (4).

4.4.1. Calidad en la evaluación del blastocisto y número de células analizadas

Cuando se habla de diagnóstico de blastocisto, lo ideal sería evaluar todas sus células individualmente con el uso de NGS o aCGH, aunque todavía no se ha conseguido, muy probablemente debido al alto coste. Otro enfoque sería realizar más de una biopsia de TE por cada embrión, aunque en los estudios en los que se ha probado esta alternativa no se han conseguido buenas tasas de concordancia entre las biopsias realizadas, obteniendo solo un 50 % de reconfirmación de los mosaicos diagnosticados en la etapa de blastocisto. Por otro lado, cuando se analizaron embriones de blastocisto completo con una aneuploidía segmentaria en mosaico a nivel unicelular con el uso de FISH, se encontró que nueve de cada diez, es decir el 90 % de las aneuploidías segmentarias detectada por NGS, fueron reconfirmadas después del análisis unicelular de todo el blastocisto. Esto nos viene a decir que de todos los embriones diagnosticados como mosaico en la etapa de blastocisto, se reconfirmarán como mosaicos dependiendo del análisis secundario empleado: biopsia de trofoectodermo o análisis de blastocisto completo (4).

Varios laboratorios han demostrado que el mosaicismo se detecta fácilmente con NGS cuando el 20 % o más de las células de la muestra tienen la aneuploidía. Teniendo en cuenta que las biopsias de TE generalmente se componen de 5 a 10 células, las células anormales siempre deben detectarse en biopsias pequeñas (5 células), ya que representan el 20 % del total, pero en muestras más grandes (10 células) no es así, pues no está claro si una sola célula aneuploide, que representa solo el 10 % de la población será siempre detectable (10).

Hasta el momento no hay pruebas publicadas de una clara correlación entre el mosaicismo en el trofoectodermo y la MCI. Por lo tanto, en algunos casos, un bajo nivel de células anormales en el trofoectodermo puede estar asociado con un alto nivel en la MCI y viceversa. La detección de mosaicismo en una muestra de biopsia de trofoectodermo indica que el embrión es (o era) mosaico, pero el porcentaje de células anormales puede no tener sentido en términos del resto del blastocisto. Por ello, debido a que la extensión del mosaicismo en la muestra de la biopsia puede o no tener relevancia para el resto del embrión, el uso de un umbral para determinar si un embrión en mosaico debe considerarse normal o anormal no tiene relevancia clínica ni biológica. Por tanto, la mejor

recomendación es informar a los pacientes de todos los embriones mosaico detectados como tal, independiente del porcentaje de células anormales (10).

4.4.2. Tasas de implantación

Se van a comentar dos estudios en los que se transfirieron embriones en mosaico a pacientes. En el primero de ellos (13), se analizaron 3802 blastocistos mediante aCGH y se detectó mosaicismo cromosómico en 181 blastocistos (4,8 %). Los embriones mosaicos se transfirieron a 18 mujeres para las que la FIV no había dado como resultado embriones euploides y todas se transfirieron un blastocisto mosaico en cada caso. Se produjeron ocho embarazos clínicos (β -hCG positivo) de los cuales seis resultaron en el nacimiento de un bebé único a término (tasa de implantación del 45 %). Todos los embarazos que llegaron a término fueron confirmados con cariotipo normal mediante biopsia corial (Tabla 3).

En el otro estudio (14) se analizó el material de biopsia mediante aCGH y NGS. Se transfirieron 43 blastocistos mosaicos y sus resultados se compararon con 51 blastocistos uniformemente euploides, derivados de un grupo de control. De los blastocistos en mosaico, el 62 % no se implantaron, el 12 % abortaron y solo el 26 % dieron lugar a embarazos evolutivos (tasa de implantación del 38 %). De este modo, la comparación con el grupo control mostró que tanto la implantación como las tasas de embarazo en curso se redujeron en comparación con el grupo control.

En ambos estudios queda patente que la implantación de embriones mosaicos no es equivalente a la implantación de embriones euploides.

4.4.3. Análisis de POCs

Además, es importante analizar la frecuencia de mosaicismo en los POCs (“productos de la concepción”) después de la transferencia de blastocistos euploides, para poder así determinar la tasa de diagnósticos erróneos debido a mosaicismos. Se ha estimado que la tasa de error de diagnóstico clínicamente reconocible por embarazo en curso varía entre el 0,13 y el 15 %, habiendo bastante controversia entre distintos estudios, pero evidenciando que el mosaicismo es parte del origen de diagnósticos erróneos. También hay que destacar que la detección del mosaicismo presenta ciertas complicaciones, ya que depende del número de células de cada línea existente, lo que se conoce como “grado de mosaicismo”, ya comentado anteriormente. Si la celularidad es baja, es posible que las líneas celulares alteradas se vean enmascaradas por las células normales, o a la inversa, de forma que existiría un infradiagnóstico, o directamente una falta de diagnóstico de la condición mosaico. En este caso, la

técnica de aSNP es una excelente alternativa en estos escenarios, pues es capaz de detectar mosaicos de baja frecuencia en muestras de POCs.

Tabla 3. Resultados clínicos de blastocistos únicos mosaicos transferidos.

Paciente No.	Constitución cromosómica	% de mosaicismo*	Cariotipo**	Resultados clínicos
1	arr(4)x1,(10)x1	40	46,XX	Recién nacido sano
2	arr(6)x1,(15)x1	50	46,XX	Recién nacido sano
3	arr(2)x1	40	46,XX	Recién nacido sano
4	arr(2)x1	35	46,XY	Recién nacido sano
5	arr(5)x1	50	46,XX	Recién nacido sano
6	arr(5)x1,(7)x1	40	46,XX	Recién nacido sano
7	arr(11)x1,(20)x3,(21)x3	30	NA	No embarazo
8	arr(1)x1,(6)x3,(10)x3,(12)x3,(13)x3,(14)x3,(21)x3	50	NA	No embarazo
9	arr(3)x1,(10)x3,(21)x3	35	NA	No embarazo
10	arr(1)x3	50	NA	Embarazo bioquímico***
11	arr9p21.2q34.3(26,609,645-140,499,771)x3	45	NA	Embarazo bioquímico***
12	arr(15)x3	30	NA	No embarazo
13	arr(18)x1	50	NA	No embarazo
14	arr(18)x1	50	NA	No embarazo
15	arr(18)x1	40	NA	No embarazo
16	arr(14)x1	50	NA	No embarazo
17	arr(5)x3	40	NA	No embarazo
18	arr10q21.3q26.3(67,216,644-134,326,648)x3	50	NA	No embarazo

NA: no disponible
 *Se enumera el porcentaje aproximado de células aneuploides en el blastocisto transferido
 **El cariotipo se determinó mediante muestreo de vellosidades coriónicas
 ***El embarazo bioquímico se definió por la presencia de un pico bajo en los niveles de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (β -hCG) y ningún retraso sustancial en el inicio del próximo periodo menstrual, pero sin detección de un embarazo identificable por medio de un examen ultrasonográfico.

4.5. Desafíos analíticos en el diagnóstico del mosaicismo

Como se ha comentado, la capacidad para detectar el mosaicismo cromosómico en biopsias de trofoectodermo presenta muchos desafíos analíticos. Si bien superar estos desafíos analíticos puede llegar a ser complejo, llegar a comprender los problemas responsables de esa complejidad es bastante sencillo.

En primer lugar, la detección de mosaicismo es un ejercicio de bioinformática, pues no se realizan procedimientos o procesos de laboratorio adicionales. Los protocolos de pruebas analíticas para aSNP, qPCR, aCGH y NGS no han cambiado en los últimos años. De hecho, los algoritmos de asignación de número de copias y las pruebas estadísticas tampoco han cambiado, aunque la forma en la que se categorizan los resultados de estos análisis cuando se asignan los diagnósticos si han sufrido variaciones (5).

Para comprender cómo se asigna un diagnóstico de mosaicismo, es útil revisar cómo se calibraron en un principio los ensayos para distinguir resultados normales de los anormales. Se suele comenzar por validar un ensayo analizando muestras que contienen un número mínimo de células (normalmente 5) de líneas celulares totalmente caracterizadas, realizándose en primer lugar para líneas celulares euploides puras y luego se repite con células aneuploides. Significativamente, las proporciones reales de \log_2 para los puntos de datos individuales varían en amplios rangos para todas las muestras (Fig 5). Es común que los puntos de datos sin procesar de muestras euploides y aneuploides se superpongan entre sí, pero una vez que se aplican algoritmos estadísticos a los resultados de un cromosoma dado, se obtiene un promedio ponderado que permite la discriminación entre muestras (5).

Idealmente, la distribución de resultados suavizados estadísticamente para resultados normales y anormales debería estar ampliamente separada. Sin embargo, incluso después de un suavizado óptimo, normalmente hay poca diferencia entre los límites exteriores de las distribuciones (Fig. 5). Lo que se hace es seleccionar un valor umbral que discrimine la disomía de las muestras monosómicas y/o trisómicas. Por lo general, este valor es de 3 desviaciones estándar de la media de los promedios suavizados de múltiples réplicas de las muestras disómicas. Luego se confirma que los valores de las muestras anormales caen fuera de este valor umbral, teniendo en cuenta que normalmente no existe un “término medio” y se utiliza un único valor umbral para discriminar las muestras disómicas de las monosómicas o trisómicas. Para aquellos cromosomas donde las líneas de células monosómicas o trisómicas estables no están disponibles, se calculan los rangos disómicos suavizados y los niveles que estén fuera de estos rangos generalmente se consideran anormales (5).

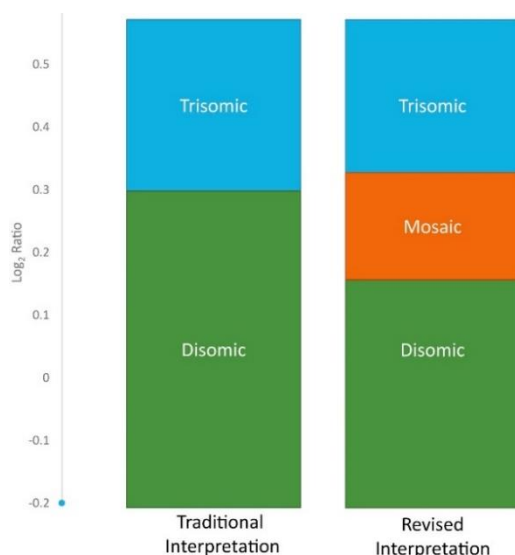


Figura 5. Ilustración del cambio en la interpretación tradicional frente a la interpretación revisada de los resultados de aCGH con el cribado genético preimplantacional (PGS). La interpretación tradicional busca solamente separar la disomía de la trisomía, mientras que la interpretación revisada considera que los valores cercanos al valor umbral anterior que separa la disomía de la trisomía se consideran mosaico (5).

Los autores han tomado estos datos y han creado una nueva “categoría intermedia” que han etiquetado como mosaico. El rango de resultados para estas muestras en mosaico ($\text{media} \pm 3\text{SD}$) es bastante amplio y abarca el valor umbral utilizado anteriormente para discriminar entre resultados

normales y anormales (Fig. 5). Es necesario enfatizar que los análisis previos de muestras disómicas puras cayeron en la parte inferior de este nuevo rango de mosaico. Por lo tanto, no se espera que el rango de mosaicos solo contenga muestras consideradas mosaico, es decir, se podría esperar que estuviera enriquecido con embriones cuyas biopsias cayeron en el umbral de mosaico, pero el hecho de que los rangos se superpongan con las muestras disómicas significa que los resultados no brindan una discriminación clara. De este modo, los embarazos derivados de los resultados de la parte inferior de este rango de mosaico recientemente definido puede provenir tanto de embriones mosaicos como de embriones normales cuyo resultado analítico simplemente cayó en la parte superior del rango normal (5).

La realidad es que interpretar los resultados es aún más complicado. Si un resultado parece ser un 20 % de mosaico, es posible que, debido a errores recíprocos, la muestra sea completamente anormal, con una mezcla de 40 % de células monosómicas y 60 % de células trisómicas. Aunque tal resultado sería indistinguible de una muestra que fuese 80 % disómica y 20 % trisómica. En cada caso, el cromosoma estaría sobrerrepresentado en aproximadamente un 20 %. Esto es significativo ya que un embrión cuyos resultados sugieren un mosaicismo de bajo nivel puede, de hecho, ser completamente aneuploide con todos los riesgos clínicos que esto conlleva (5).

4.6. Eficiencia del PGT-A e interpretaciones erróneas en el diagnóstico de mosaicismo

La capacidad del PGT-A para reducir la incidencia de abortos espontáneos y casi eliminar el riesgo de niños nacidos con anomalías genéticas graves representa la razón principal por la que los pacientes encuentran atractivo este enfoque, ya que la pérdida del embarazo o, peor aún, la terminación de un embarazo muy deseado debido a una anomalía genética grave es quizás el peor resultado posible del tratamiento de reproducción asistida. Aunque los argumentos en contra del PGT-A basados en la “tasa acumulativa de embarazo” tiene una base lógica, se debe reconocer que la transferencia de un embrión cromosómicamente normal elimina el impacto del avance de la edad femenina en la tasa de implantación (Fig. 3), así como en un menor riesgo de aborto espontáneo (10).

Un aspecto crítico ante el PGT-A es que la tasa de error no es 0, por lo que algunos embriones euploides, que podrían haber producido embarazos viables, se descartan incorrectamente mientras que otros aneuploides se transfieren erróneamente. En la mayoría de las áreas de la genética clínica, aunque no son deseables los falsos positivos, estos se toleran si al hacerlo se aumenta la sensibilidad de las pruebas, por lo que esto ha llevado a minimizar los falsos negativos durante los análisis de PGT-A, lo que reduce el riesgo de emplear embriones anormales. Es cierto que las tasas de error del PGT-A han disminuido aproximadamente un 7 % con la introducción de las técnicas de secuenciación masiva, si

bien siguen produciéndose errores debidos a la presencia de mosaicismo. Esto es debido a que aunque a menudo los embriones mosaicos no contienen células euploides (mosaicos aneuploides), hay casos en los que un embrión puede estar compuesto por una combinación de células normales y anormales (mosaicos euploides/aneuploides), y son estos embriones los que corren riesgo particular de diagnóstico erróneo (10).

Como se ha comentado, la introducción de los diagnósticos de embriones mosaicos ha llevado a una reducción en la precisión del PGT-A. En el ensayo STAR realizado en 2019, los laboratorios de estudio que incluyeron diagnósticos de mosaico informaron tasas de aneuploidía del 33 al 72 %, mientras que los laboratorios que no consideraron el diagnóstico de mosaicismo informaron tasas de aneuploidía de 0 al 43 % en el mismo grupo de edad, lo que indica que la inclusión de diagnósticos de embriones mosaicos da como resultado una sobreestimación de la presencia de anomalías cromosómicas, dando lugar a un mayor número de falsos positivos y a la imposibilidad de demostrar buenos resultados del PGT-A, especialmente en pacientes menores de 35 años (15).

Los métodos más empleados para predecir el mosaicismo implican el uso de umbrales arbitrarios de número de copias de cromosomas (es decir del 20 % al 80 % de aneuploidía) a partir de datos de secuenciación masiva. De este modo, si el número de copias de un cromosoma cae fuera del umbral para un número de copias disómico normal de 2 (entre 1,8 y 2,2) y fuera del umbral para monosomía y trisomía uniforme (por debajo de 1,2 o por encima de 2,8) se determina que ese cromosoma cae en el “rango de mosaico” (1,2-1,8 o 2,2-2,8) (Fig.6).

Al realizar una revisión sistemática de estudios que realizaron rebiopsias de embriones considerados mosaicos según los umbrales intermedios de número de copias se reveló que era poco probable que la mayoría de esos embriones (57 %) hubieran sido mosaicos. Además, se ha encontrado que muchos embriones con un número de copias en el rango de mosaico tienen un origen meiótico de aneuploidía consistente en aneuploidía uniforme, lo que confirma la inexactitud de predecir el mosaicismo por estos métodos. Además, hay que tener presente que estudios recientes han demostrado que los embriones considerados “mosaicos de bajo nivel” tienen un potencial reproductivo equivalente al de los embriones considerados euploides (15).

Se han considerado los datos de una revisión sistemática (15) en la que se evaluaron los resultados clínicos después de la transferencia de embriones designados como “mosaico”. Todos estos estudios involucraron el uso de umbrales intermedios de número de copias después de realizar PGT-A para los 24 cromosomas en biopsias de TE. Se identificaron un total de 25 estudios relevantes con resultados para 2759 embriones mosaico, de los cuales solamente se confirmó 1 resultado de PGT-A

(0,04 %) en el embarazo en curso resultante, lo que demuestra una notable falta de confirmación en las predicciones de PGT-A de mosaicismo en embrión previo a la implantación, así como inexactitud de los umbrales intermedios de número de copias de la biopsia embrionaria previa a la implantación para predecir el mosaicismo en un embarazo o parto en curso.

46,XY,-3(mos),+22(mos)

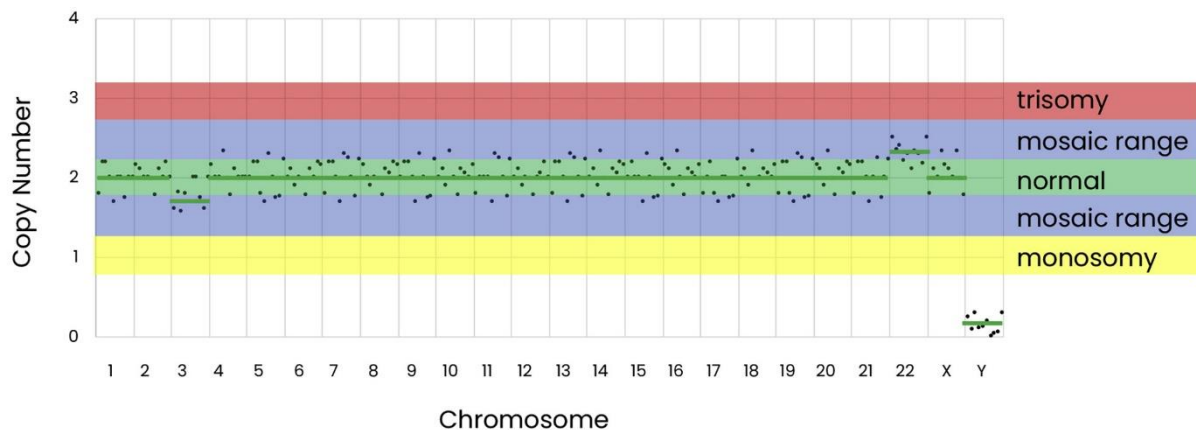


Figura 6. Uso esquemático de umbrales intermedios de número de copias para designar un embrión como mosaico. En este caso, el cromosoma 3 cae en el rango de monosomía en mosaico y el cromosoma 22 en el rango de trisomía en mosaico (15).

En principio se podría argumentar que la tasa de mosaicismo esperada en este entorno es baja. Sin embargo, se ha estimado que la prevalencia del mosaicismo en embarazos en curso después de la concepción natural es del 1 al 2 %. Es poco probable que la transferencia de más de 2500 embriones mosaicos resulte en una tasa de mosaicismo que sea de 1000 veces menor que la resultante de la concepción natural (15).

Este ejemplo da evidencia de que muchos de los embriones considerados mosaicos nunca lo fueron realmente, es decir, se consideran falsos positivos. Se ha demostrado en varias revisiones sistemáticas que un gran porcentaje de los embriones considerados mosaicos por una sola biopsia de TE resultaron ser aneuploides uniformes cuando se evaluaron múltiples rebiopsias. Además, el análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) junto con el análisis de número de copias intermedias para PGT-A reveló que los cromosomas con número de copias intermedias se pueden también originar a partir de aneuploidías en embriones triploides. Como es lógico, la transferencia de embriones con este tipo de diagnóstico falso positivo de mosaicismo (falso negativo de aneuploidía uniforme) conduciría a tasas de éxito reducidas, dado que los embriones con aneuploidía uniforme poseen un potencial reproductivo cercano al 0 % (15).

Los orígenes del mosaicismo falso positivo desde una perspectiva de biología molecular se basan en que este tipo de error diagnóstico podría surgir cuando se analiza un número subóptimo de células trofoectodérmicas. Esto se debe a que la amplificación del ADN ocurre de manera exponencial

y como es sabido, durante la fase lineal, el ADN se duplica en cantidad después de cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero cuando los componentes de la PCR se vuelven limitados (saturación), el ADN ya no puede duplicarse en cantidad después de cada ciclo, dando como resultado una disminución en la diferencia relativa observada entre los cromosomas disómicos y trisómicos, lo que llevaría a un número de copias intermedio y a un diagnóstico falso positivo de aneuploidía en mosaico, es decir un falso negativo de aneuploidía uniforme. De forma similar, con muy pocas células, es posible que la amplificación no alcance la fase lineal antes de la cuantificación y dé lugar a la observación de un número de copias intermedio y un mosaicismo de falsos positivos (Fig. 7) (15).

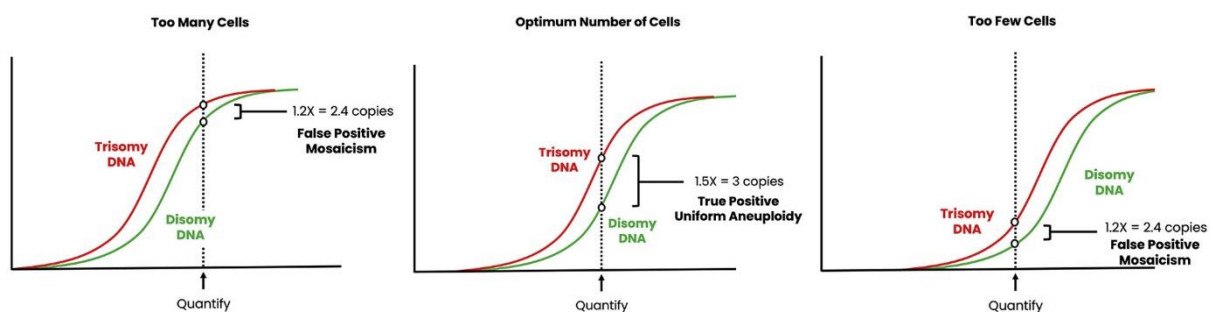


Figura 7. Ilustración del impacto de un número de células subóptimo (falta o exceso) que conduce a un mosaicismo falso positivo de una muestra con aneuploidía uniforme. Demasiadas células pueden provocar la saturación de la amplificación antes de la cuantificación y la subestimación de la cantidad relativa de ADN (rango de mosaico). Muy pocas células pueden no alcanzar la fase lineal de amplificación en el momento de la cuantificación y dar lugar a una subestimación de la cantidad relativa de ADN (rango de mosaico) (15).

Por el contrario, muchos embriones designados como mosaico por el análisis del umbral del número de copias son completamente euploides. Además, se ha demostrado que los embriones con mosaicismo de “bajo nivel” poseen un potencial reproductivo equivalente al de los embriones designados como euploides (15).

Una posible explicación para este tipo de error de diagnóstico puede ser la incapacidad del análisis simple del número de copias para distinguir el ruido técnico de la señal biológica (Fig.8). Este problema puede verse amplificado por los desafíos asociados con el análisis genético de muy pocas células, los procedimientos de biopsia que dan lugar tanto a células intactas como a células fragmentadas (artefactos), o a la lisis incompleta de las células antes de la amplificación, todo lo cual puede afectar al nivel de ruido observado (15).

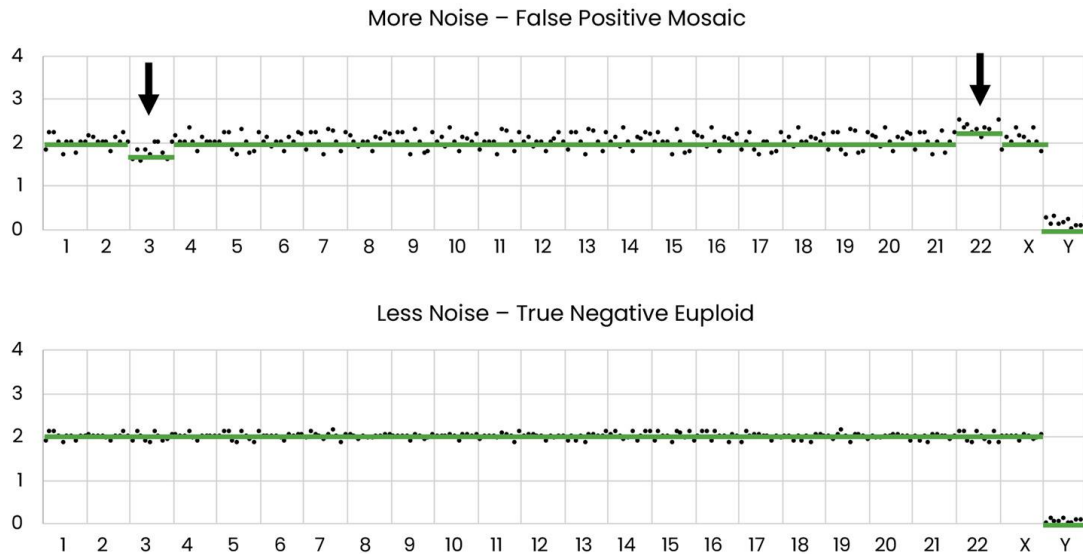


Figura 8. Ilustración del impacto del nivel de ruido en la precisión de la predicción de la euploidía (menos ruido) y la tasa de error al predecir el mosaicismo (más ruido) con umbrales de número de copias simples (15).

4.7. Selección de embriones y asesoramiento genético a pacientes

Es lógico pensar que la detección de mosaicismo puede ser una herramienta útil para reducir una cohorte de embriones a aquellos con la mayor probabilidad de ser completamente euploides, lo que tiene el potencial de aumentar la tasa de embarazo por transferencia incluso por encima de la que se observa actualmente con las técnicas estándar de PGS. Sin embargo, para los pacientes que solo tienen embriones mosaico disponibles, la decisión de transferir o incluso almacenar dichos embriones puede ser increíblemente difícil, ya que existen varios desafíos para determinar el pronóstico de cualquier resultado de mosaico dado (8).

Las directrices dadas en 2016 por la Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGDIS) sugieren que la transferencia de ciertos mosaicos es preferible a la de otros. Específicamente, se recomienda que las monosomías en mosaico se consideren antes que las trisomías en mosaico. Si bien las monosomías a menudo se perciben como “no viables”, debe tenerse en cuenta que cada evento de no disyunción postcigótica genera una célula monosómica y una célula trisómica, por lo que los embriones considerados mosaicos para una monosomía, también pueden contener células trisómicas y viceversa. Debido a que las técnicas de NGS no pueden aún distinguir de manera segura entre monosomía/euploidía en mosaico y monosomía/trisomía en mosaico, se debe tener precaución al interpretar los resultados que parecen indicar solo una monosomía en mosaico (5,8,16).

Las pautas de PGDIS establecen que, si se considera la transferencia de una trisomía en mosaico, se prefieren las que involucran los cromosomas 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 22, X e Y sobre los que involucran los cromosomas 2, 7, 13, 14, 15, 16, 18 y 21 (Tabla 4). Sin embargo, se

han documentado aneuploidías en mosaico de prácticamente todos los cromosomas en RNV con una gran variedad de efectos fenotípicos. Si bien los fenotipos más conocidos como son el síndrome de Down, el síndrome de Patau, y el síndrome de Edwards (trisomías en cromosomas 21, 13 y 18 respectivamente), así como los síndromes que involucran los cromosomas sexuales, el retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) y las disomías uniparentales (UPD) deben tenerse en cuenta en las decisiones de transferencia de embriones, es esencial reconocer que, en teoría, cualquier aneuploidía puede ser viable en presencia de una línea celular euploide. Por otro lado, estas pautas también recomiendan que se considere la proporción de células aneuploides al contemplar la transferencia de un embrión diagnosticado como mosaico; sin embargo también se debe reconocer que el porcentaje de mosaicismo en la biopsia de TE no necesariamente se correlaciona con el encontrado en el resto del embrión (8,16).

Por último, las pautas de PGDIS no abordan las aneuploidías parciales en mosaico (mosaicos euploides/aneuploides) para las cuales hay aún menos datos disponibles debido a la rareza individual de cada ganancia o pérdida segmentaria en particular. En general, el mosaicismo de cualquier aneuploidía total o parcial teóricamente podría resultar en un nacido vivo si el porcentaje de célula anormales fuera lo suficientemente bajo como para no causar una implantación fallida o aborto espontáneo, aunque teniendo en cuenta las posibles anomalías existentes dependiendo del porcentaje de células y tejidos anormales involucrados. Dicho esto, los médicos encontrarán grandes dificultades para elegir embriones “seguros” que tengan una posibilidad total de dar un RNV sano o de provocar una implantación fallida o un aborto espontáneo (8,16).

La posterior declaración de CoGEN realizada en 2017 sobre el mosaicismo detectado en biopsias de blastocistos preimplantacionales incluye las siguientes recomendaciones para priorizar embriones en mosaico para la transferencia: (i) los embriones en mosaico para trisomías capaces de ser viables dando lugar a RNV (cromosomas 13, 18, 21 y 22) tienen la prioridad más baja; (ii) los embriones mosaicos para trisomías asociadas con disomía uniparental son de baja prioridad (cromosomas 14 y 15); (iii) los embriones mosaicos para trisomías asociadas con IUGR (cromosomas 2, 7 y 16) son de baja prioridad; (iv) el mosaicismo que afecta a los cromosomas 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19 y 20 no se ha asociado con los resultados adversos antes mencionados; y (v) se debe considerar que las monosomías en mosaico tienen un riesgo similar al de sus trisomías contrapartes (17) (Tabla 4).

Cromosoma	PGDIS 2016	CoGEN 2017	Grati 2018
1	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 1
2	Prioridad 4	Baja prioridad	Prioridad 3
3	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 1
4	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 2
5	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 2
6	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 4
7	Prioridad 4	Baja prioridad	Prioridad 3
8	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 5
9	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 4
10	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 1
11	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 3
12	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 1
13	Prioridad 4	Baja prioridad	No transferir
14	Prioridad 3	Alta prioridad	No transferir
15	Prioridad 3	Alta prioridad	Prioridad 4
16	Prioridad 4	Baja prioridad	No transferir
17	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 3
18	Prioridad 4	Baja prioridad	No transferir
19	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 1
20	Prioridad 2	Alta prioridad	Prioridad 5
21	Prioridad 4	Baja prioridad	No transferir
22	Prioridad 2	Baja prioridad	Prioridad 3
XXX			Prioridad 5
XXY			Prioridad 5
XYY			Prioridad 2
45X			No transferir
Otras monosomías	Prioridad 1	Igual que trisomías	Igual que trisomías

Tabla 4. Guías y recomendaciones para la priorización a la hora de transferir embriones en mosaico en función del cromosoma implicado. La guía PGDIS 2016 muestra una gradación por prioridades a la hora de transferir embriones en mosaico trisómicos para un solo cromosoma, de forma que los cromosomas prioritarios presentan un valor de 2, mientras que los que no lo son presentan una prioridad de 3 y 4, siendo estos últimos los más desfavorables a la hora de ser transferidos. La guía CoGEN 2017 simplemente distingue entre alta prioridad para la transferencia y baja prioridad para la transferencia. La guía Grati 2018 muestra una gradación por prioridades a la hora de transferir embriones según el cromosoma afectado. La prioridad 1 es la más favorable y la prioridad 5 es la más desfavorable, aunque también se aconseja la no transferencia cuando se ven implicados ciertos cromosomas.

Dichas recomendaciones (PGDIS 2017 y CoGEN 2017) brindan alguna orientación para la toma de decisiones clínicas hasta que se acumulen suficientes datos prospectivos. Sin embargo, en presencia de varios embriones mosaicos aneuploides, puede ser difícil asignar la prioridad correcta, ya que no se proporciona un sistema de puntuación claro (17).

Por todo ello, en el estudio de Grati realizado en 2018 (17) se busca desarrollar un sistema de puntuación para priorizar embriones mosaicos aneuploides preimplantacionales basado en evidencia clínica derivada de análisis citogenéticos de muestras de vellosidades coriónicas (CVS) del primer trimestre y de POCs. En esta última guía se utilizaron la probabilidad de que una aneuploidía en mosaico detectada en CVS involucre al feto, el riesgo de UPD clínicamente significativa y la posibilidad de que el mosaicismo culmine en aborto espontáneo para generar un sistema de puntuación para priorizar los embriones aneuploides en mosaico detectados por PGS. En la tabla 4 se muestra la puntuación compuesta para cada cromosoma. Una puntuación más alta implica una mayor probabilidad de un resultado adverso antes mencionado, por tanto, cuanto menor sea la puntuación compuesta, mayor será la prioridad para la transferencia de embriones (17).

En base a este nuevo sistema de puntuación, se sugiere que los embriones en mosaico deberían tener la siguiente prioridad para la transferencia: (i) las trisomías en mosaico 1, 3, 10, 12 y 19 tienen una puntuación compuesta de 0 y tienen la prioridad más alta para la transferencia debido a un riesgo muy bajo de cualquiera de estos resultados adversos; (ii) las trisomías en mosaico 4, 5 y 47 XYY tienen una puntuación compuesta de 1 y son el segundo grupo que se considera para la transferencia, aunque con una probabilidad ligeramente mayor de aborto espontáneo o una aneuploidía viable; (iii) Las trisomías en mosaico 2, 7, 11, 17 y 22 tienen una puntuación compuesta de 2 y son el tercer grupo que se considera para la transferencia, ya que tienen un riesgo ligeramente mayor de aborto espontáneo o un riesgo relativamente bajo de UPD (trisomías 7 y 11); (iv) las trisomías en mosaico 6, 9 y 15 tienen una puntuación compuesta de 3 debido a un mayor riesgo de aborto espontáneo, UPD o aneuploidía viable. La posibilidad de transferencia debe considerarse con cautela y solo después de una discusión detallada con los futuros padres; (v) las trisomías en mosaico 8, 20, 47 XXX y 47 XXY tienen una puntuación compuesta de 4 a 5, debido al alto riesgo de compromiso fetal y un riesgo ligeramente mayor de aborto espontáneo y aneuploidía viable. La posibilidad de transferencia podría considerarse después de una extensa discusión con los futuros padres sobre las posibles manifestaciones clínicas de la misma; (vi) es mejor evitar las restantes aneuploidías en mosaico: trisomías 13, 14, 16, 18, 21 y 45 X (17).

Las puntuaciones de prioridad antes mencionadas con respecto a las trisomías autosómicas también deben aplicarse a las respectivas monosomías autosómicas en mosaico. Esto se debe a que lo

más probable es que sean resultado de la no disyunción postcigótica que daría lugar a dos células hijas: una trisómica y otra monosómica, además de la línea celular euploide ya presente. En tales circunstancias, la posibilidad de una línea celular trisómica complementaria en el embrión sigue siendo una posibilidad (17).

En relación a la discusión clínica referente a los embriones mosaicos, hay que tener presente que los avances en las tecnologías genómicas para el diagnóstico genético previo a la implantación han revolucionado la capacidad para detectar anomalías genéticas de diversos tipos a nivel de una sola célula o de un pequeño número de células. Estos avances en sensibilidad y resolución han permitido detectar el mosaicismo cromosómico, fenómeno que ocurre en una pequeña minoría de embriones, lo cual representa un desafío clínico en el manejo de los pacientes, particularmente en aquellos con mal pronóstico y/o sin embriones euploides disponibles para la transferencia. Por ello, la transferencia de blastocistos en los que solo se hayan detectado aneuploidías en mosaico solo debe considerarse siguiendo el consejo de expertos y el asesoramiento genético adecuado a las pacientes. Por todas estas razones es necesario informar a los pacientes sobre el razonamiento detrás de cualquier inquietud con respecto a la transferencia y la idoneidad del seguimiento, como la amniocentesis (16).

Como conclusión al uso de todas estas guías y recomendaciones, aunque la transferencia de embriones en mosaico puede estar asociada con un peor resultado, también existe la preocupación de que los embriones viables puedan descartarse injustificadamente debido al diagnóstico del mosaicismo. Por lo tanto, hasta que se disponga de más estudios prospectivos de seguimiento sobre la transferencia real de embriones aneuploides en mosaico, se sugiere utilizar este sistema de puntuación (Tabla 4) como una herramienta para médicos y embriólogos, tanto para priorizar los embriones a transferir, como para ser de ayuda al analizar los posibles resultados después de la transferencia (17).

4.8. Direcciones futuras

Aunque el desarrollo de la secuenciación de nueva generación (NGS) ha proporcionado mejoras importantes en la precisión diagnóstica de PGT-A, su sensibilidad mejorada ha introducido inherentemente nuevos desafíos para la interpretación de los resultados, en particular con respecto al mosaicismo cromosómico (8).

Paradójicamente, las plataformas menos sensibles facilitaron una toma de decisiones clínicas más sencilla, ya que los embriones podían clasificarse más fácilmente como euploides o aneuploides. Sin embargo, en la era del progreso tecnológico constante, tanto en el diagnóstico como en los enfoques de investigación, las incertidumbres que desafían el manejo clínico en PGT-A son quizás inevitables. En última instancia, cuanto más fino sea el enfoque, mayor será la incidencia de diagnósticos de significado

clínico desconocido. Por lo tanto, una mayor estandarización de las prácticas clínicas y de laboratorio será fundamental para lograr la coherencia y corroborar los hallazgos relevantes. En el contexto de mosaicismo cromosómico, la mejora de la toma de decisiones clínicas se basará inevitablemente en estándares basados en la evidencia. Además, los esfuerzos futuros para definir las características embrionarias que son importantes para mantener la estabilidad cromosómica pueden proporcionar una evaluación más definitiva del impacto del mosaicismo cromosómico en el desarrollo humano temprano, y, por tanto, esclarecer estas incertidumbres finalmente allanará el camino hacia una mejor selección de embriones y manejo clínico(1).

Por otro lado, la idea errónea de que el mosaicismo se puede predecir con precisión en el embrión previo a la implantación y la mala interpretación de los perfiles de número de copias simples han llevado a un desperdicio significativo de embriones, pérdida de recursos financieros, confusión entre médicos y embriólogos y, lo que es más importante, daño a los pacientes. Está claro que los umbrales de número de copias no son capaces de predecir con precisión el mosaicismo en el embrión previo a la implantación ni sus resultados clínicos reales, por lo que eliminar la práctica actual de predecir el mosaicismo mediante umbrales intermedios de número de copias puede ayudar a reducir las tasas de falsos positivos, evitar el descarte de embriones sanos, reducir la carga de asesoramiento genético y mejorar la utilidad y la precisión del cribado de aneuploidías (15).

Hay que tener presente que el PGT-A puede no ser adecuado para todas las poblaciones de pacientes de FIV o centros de FIV, ya que el uso exitoso de PGT-A requiere una aplicación cuidadosa de los procedimientos de embriología disponibles, métodos de genética molecular y enfoques validados para la interpretación de datos complejos (15).

Lo que está claro es que el mosaicismo existe en embriones preimplantacionales, pero se necesitan mejores métodos, con menos falsos positivos antes de considerar el uso de PGT-A para predecir la presencia e interpretar la verdadera importancia clínica del mosaicismo. El interés comercial en la detección del mosaicismo no se basa en la evidencia de que la FIV es un factor de riesgo para el mosaicismo. De hecho la prevalencia del mosaicismo en embarazos provenientes de tratamientos de reproducción asistida es la misma que la de las concepciones naturales (15,18).

Actualmente están surgiendo nuevos métodos que pueden mejorar la especificidad de la predicción del mosaicismo en el embrión previo a la implantación. Por ejemplo, determinar el origen de la división celular de la aneuploidía puede evitar falsos positivos al proporcionar un segundo análisis independiente de los cromosomas que se encuentran en el rango “mosaico” mediante el análisis del

número de copias, de forma que en los casos en los que el origen es mitótico, se pueden lograr tasas más altas de mosaicismo verdadero positivo (19).

Hasta que se realicen mejoras en la precisión de la predicción del mosaicismo, se debe reconsiderar la validez de los diagnósticos de mosaicismo originales y utilizar términos como embriones mosaicos “putativos” o embriones con perfiles PGT-A “consistentes con posible mosaicismo”. Dicho esto, todos los resultados clínicos después de la transferencia de embriones designados como “mosaico” deben reevaluarse críticamente, con la idea de que muchos de estos embriones se han clasificado erróneamente y en realidad son uniformemente euploides o uniformemente aneuploides (15).

5. Conclusiones

El trabajo aquí presentado nos permite concluir que:

- Queda patente que tanto la implantación como las tasas de embarazo en curso de embriones mosaicos no son equivalentes a las de embriones euploides.
- Para poder explicar la amplia variación en los fenotipos de nacidos vivos con mosaicismo se necesitan más datos de resultados clínicos, además de estudios con un mayor número de embriones y un mayor enfoque en las consecuencias de la transferencia de embriones en mosaico.
- Conforme aumenta la edad el ovocito, disminuye el porcentaje de embriones euploides y de embriones mosaicos euploides/aneuploides, y aumenta el porcentaje de embriones aneuploides y embriones mosaicos aneuploides.
- El diagnóstico de embriones en mosaico supone un gran desafío analítico. El hecho de que los rangos de muestras en mosaico se superpongan con los rangos de muestras disómicas significa que los resultados no brindan una discriminación clara, pudiendo afectar a las decisiones clínicas y suponer riesgos clínicos asociados.
- Debido a que la extensión del mosaicismo en la muestra de la biopsia puede o no tener relevancia para el resto del embrión, el uso de un umbral para determinar si un embrión en mosaico debe considerarse normal o anormal no tiene relevancia clínica ni biológica.
- Existe gran evidencia de la existencia de un gran número de falsos positivos en el diagnóstico de embriones en mosaico por PGT-A, lo que se explica por la incapacidad del análisis simple del número de copias para distinguir el ruido técnico de la señal biológica.
- Hasta que se disponga de más estudios prospectivos de seguimiento sobre la transferencia real de embriones aneuploides en mosaico, se sugiere utilizar las guías y recomendaciones expuestas como una herramienta para médicos y embriólogos, tanto para priorizar los embriones a transferir, como para ayudar a analizar los posibles resultados después de la transferencia.
- Se necesitan mejores métodos para predecir la presencia de mosaicismo e interpretar el verdadero significado clínico del mismo, para conseguir así reducir las tasas de falsos positivos, prevenir el descarte de embriones euploides, y reducir así los daños emocionales generados a los pacientes.

6. Bibliografía

1. Popovic M, Dhaenens L, Boel A, Menten B, Heindryckx B. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: The ultimate diagnostic dilemma. *Hum Reprod Update*. 2020 Apr 15;26(3):313–34.
2. Viotti M. Preimplantation genetic testing for chromosomal abnormalities: Aneuploidy, mosaicism, and structural rearrangements. *Genes (Basel)*. 2020 Jun 1;11(6).
3. Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: Mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet*. 2012 Jul;13(7):493–504.
4. Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 2017 May 1;107(5):1107–12.
5. Scott RT, Galliano D. The challenge of embryonic mosaicism in preimplantation genetic screening. *Fertil Steril*. 2016 May 1;105(5):1150–2.
6. Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JCM, van Wissen LCP, Bras M, Janssen M, et al. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 2004;19(2):316–24.
7. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy KR, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990 Apr;344(6268):768–70.
8. Besser AG, Mounts EL. Counselling considerations for chromosomal mosaicism detected by preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online*. 2017 Apr 1;34(4):369–74.
9. Homer HA. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): The biology, the technology and the clinical outcomes. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2019 Apr 1;59(2):317–24.
10. Munné S, Grifo J, Wells D. Mosaicism: “survival of the fittest” versus “no embryo left behind.” *Fertil Steril*. 2016 May 1;105(5):1146–9.
11. Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet*. 2008 Nov 25;1(1):26.
12. Pinson L, Mannini L, Willems M, Cucco F, Sirvent N, Frebourg T, et al. CEP57 mutation in a girl with mosaic variegated aneuploidy syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014 Jan;164(1):177–81.
13. Greco E, Minasi MariaG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *New England Journal of Medicine*. 2015 Nov 19;373(21):2089–90.
14. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Tarozzi N, Borini A, Wells D. The developmental potential of mosaic embryos. *Fertil Steril*. 2015 Sep;104(3):e96.
15. Treff NR, Marin D. The “mosaic” embryo: misconceptions and misinterpretations in preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Fertil Steril*. 2021 Nov 1;116(5):1205–11.

16. PGDIS. Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage [Internet]. PGDIS. 2016 [cited 2022 Aug 11]. Available from: http://pgdis.org/docs/newsletter_071816.html
17. Grati FR, Gallazzi G, Branca L, Maggi F, Simoni G, Yaron Y. An evidence-based scoring system for prioritizing mosaic aneuploid embryos following preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online*. 2018 Apr 1;36(4):442–9.
18. Huang A, Adusumalli J, Patel S, Liem J, Williams J, Pisarska MD. Prevalence of chromosomal mosaicism in pregnancies from couples with infertility. *Fertil Steril*. 2009 Jun;91(6):2355–60.
19. Handyside AH, McCollin A, Summers MC, Ottolini CS. Copy number analysis of meiotic and postzygotic mitotic aneuploidies in trophoctoderm cells biopsied at the blastocyst stage and arrested embryos. *Prenat Diagn*. 2021 Apr 1;41(5):525–35.