

DOI: 10.2436/20.1501.02.70

Biologia de la reproducció
(Mercè Durfort i Francesca Vidal, ed.)*Treballs de la SCB. Vol. 59 (2008) 225-232*

DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL EN ESTADIS EMBRIONARIS TARDANS

MÒNICA PARRIEGO,¹ ANNA VEIGA ^{1,2} I FRANCESCA VIDAL ³¹ *Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.*² *Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.*³ *Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Mònica Parriego i Beltran. Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció, Institut Universitari Dexeus. Gran Via Carles III, 71-75. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: monpar@dexeus.com.

RESUM

La incorporació de la biòpsia de blastocist en la pràctica clínica pot ser considerada com una alternativa vàlida per als cicles de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP). La disponibilitat d'un major nombre de cèl·lules obre la possibilitat de realitzar diagnòstics múltiples en paral·lel en el mateix embrió, i es poden detectar teòricament malalties multigèniques o bé combinar diversos tipus de diagnòstic mitjançant FISH i PCR. Els embrions transferits en estadi de blastocist estan subjectes a una doble selecció: genètica i mitjançant el cultiu, i això es veu reflectit en elevades taxes d'implantació, fet que permet reduir el nombre d'embrions a transferir per tal d'evitar gestacions múltiples. Tot i que l'aplicació clínica de la biòpsia de blastocist per al DGP és encara limitada i recent, els bons resultats obtinguts pel que fa a taxes d'implantació i d'embaràs, així com les possibilitats diagnòstiques que obre, suggereixen que es tracta d'una tècnica que esdevindrà més freqüent en el futur.

Paraules clau: biòpsia embrionària, blastocist, diagnòstic genètic preimplantacional.

PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS AT THE BLASTOCYST STAGE

SUMMARY

The incorporation of blastocyst biopsy into clinical practice can be considered as a valid alternative when performing PGD. The fact that it makes more material available for analysis is of particular value in those cases where the aim is to diagnose monogenic diseases. The availability of a greater number of cells opens the possibility of performing multiple

diagnoses in parallel on the same embryo; these could be used to detect multigenic diseases or for the combined diagnosis of different disorders through diagnostic approaches based on both FISH and PCR. Embryos transferred at the blastocyst stage are subjected to a dual selection process (genetic and through culture) and this is reflected in their greater implantation potential, thus enabling a lower number of embryos to be transferred, which in turn reduces the risk of multiple pregnancy. Although the clinical application of blastocyst biopsy for PGD remains a limited and recent development, the good results in terms of implantation and pregnancy rates obtained so far, as well as the diagnostic possibilities it opens up, suggest that this technique can become more widely used in the early future.

Key words: embryo biopsy, blastocyst, preimplantation genetic diagnosis.

INTRODUCCIÓ

Divuit anys després de la seva primera aplicació clínica (Handyside *et al.*, 1990) el diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) s'ha consolidat i afermat. Actualment, la gran majoria de centres de reproducció assistida situats en països en els quals la legislació ho permet han incorporat el DGP com una opció a oferir a les parelles amb elevat risc de transmetre una malaltia genètica a la seva descendència. L'aplicació del DGP permet seleccionar per a la transferència els embrions lliures de la malaltia analitzada amb l'objectiu d'evitar gestacions afectes de la malaltia familiar. Des d'aleshores les indicacions per a les quals s'ofereix el DGP no han fet més que augmentar i el desenvolupament de noves metodologies per millorar i optimitzar les possibilitats diagnòstiques és constant.

Una de les innovacions més recents consisteix a realitzar el DGP a partir de biòpsies cellulars obtingudes de blastocists. Aquest canvi implica que l'embrió es biopsii en un estadi avançat del desenvolupament (dia +5 o dia +6), i és necessària una modificació important en la tècnica de biòpsia mateixa. Aquesta nova metodologia comporta associats una sèrie d'avantatges (i també alguns inconvenients) que es discutiran en aquest article, alhora que es descriurà detalladament la tècnica.

Les cèl·lules que s'obtenen durant la biòpsia de blastocist corresponen al trofèctoderma. Cal tenir en compte que en l'estadi de blastocist es troben diferenciats per primer cop dos llinatges cellulars diferents: trofèctoderma (TE) i massa cel·lular interna (MCI). Mentre que el botó de cèl·lules de la MCI ha de donar lloc a l'embrió en si, les cèl·lules del TE són les encarregades de formar les cobertes extraembrionàries.

L'ús de les cèl·lules del TE com a font de material per al diagnòstic preimplantacional ja va ser suggerit fa més d'una dècada (Dokras *et al.*, 1990; Carson *et al.*, 1993) amb la intenció d'obtenir un nombre superior de cèl·lules per a l'anàlisi i així superar les dificultats associades als diagnòstics basats en l'anàlisi d'una sola cèl·lula. Aquesta possibilitat resulta especialment interessant en aquells casos en què el diagnòstic genètic es realitza basant-se en la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), més sensible als problemes derivats de la poca quantitat de DNA disponible. Les fallades d'amplificació i el fenomen de *allele drop out* (ADO), observat després de l'anàlisi de cèl·lules úniques (ja siguin blastòmers o CP) en els cicles de DGP-PCR, comporten que un cert percentatge d'embrions restin sense un diagnòstic conclouent i, per tant, que no puguin ser considerats per a la transferència. A més, la biòpsia d'un nombre superior de cèl·lules hauria de permetre diag-

nosticar més d'una malaltia, o bé combinar diversos tipus de diagnòstic.

Malgrat els aspectes positius esmentats, la biòpsia de blastocist ha estat incorporada a la pràctica clínica de manera molt recent (Boer *et al.*, 2004; Kokkali *et al.*, 2005) i, avui dia, en la gran majoria de centres el DGP encara es basa en l'anàlisi de biòpsies obtingudes d'embrions primerencs (D+3) o bé d'òcits (biòpsia de corpuscle polar) (GooSENS *et al.*, 2008).

L'objectiu d'aquest treball és presentar el DGP basat en la biòpsia de blastocist, els aspectes tècnics i metodològics que el caracteritzen i les opcions que ens ofereix actualment.

ASPECTES TÈCNICS: BIÒPSIA EMBRIONÀRIA

La micromanipulació dels blastocists resulta complexa i l'ús de la tecnologia làser durant el procés de biòpsia (Veiga *et al.*, 1997) ha estat un punt clau per superar moltes de les limitacions tècniques que es presentaven. Els principals beneficis de l'ús del làser són la rapidesa, la precisió i la no-acidificació del medi, que conjuntament faciliten el procés de biòpsia i esdevenen essencials per obtenir una escissió ràpida, fàcil i eficient de les cèl·lules del TE.

La primera part del procés de biòpsia implica la realització d'una obertura a la zona pellúcida (ZP) de l'embrió mitjançant l'ús un làser de tipus *near-infrared 1.48-µm diode non-contact*. El temps d'exposició, així com la intensitat del pols a aplicar, s'ha d'ajustar de manera individualitzada per a cada

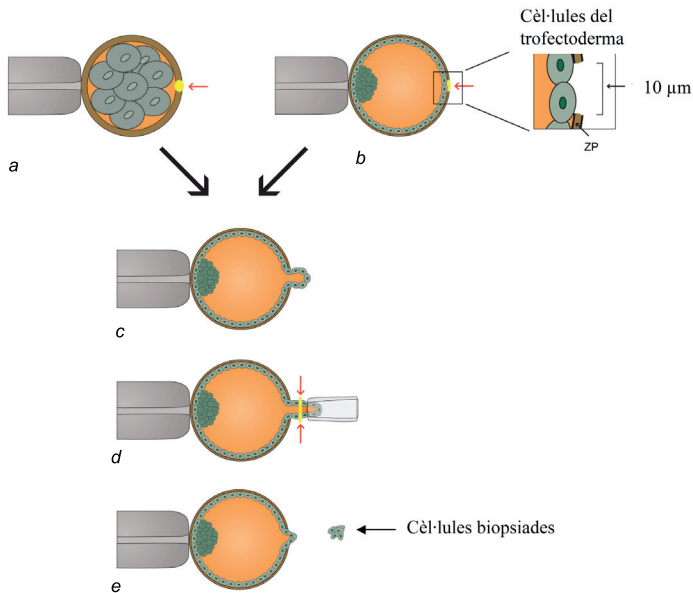


FIGURA 1. Diagrama que mostra les dues aproximacions possibles de la biòpsia de blastocist. Les fletxes indiquen el polsos de làser. *a)* Obertura de la zona pellúcida en un embrió en el tercer dia de desenvolupament, *b)* obertura de la zona pellúcida en un blastocist, *c)* hèrnia de les cèl·lules del trofectoderma, *d)* biòpsia de les cèl·lules herniades i *e)* cèl·lules biopsiades.

embrió per tal d'aconseguir una obertura de 10-30 μm , i estarà determinat pel gruix de la zona pel·lúcida (Veiga *et al.*, 1997; McArthur *et al.*, 2005).

Hi ha dues opcions per realitzar l'obertura de la ZP (vegeu la figura 1). La primera aproximació es realitza en embrions primerencs en el seu tercer dia de desenvolupament (McArthur *et al.*, 2005) (vegeu la figura 1a). L'obertura de la ZP es realitza en tots els embrions disponibles en el tercer dia de desenvolupament. El motiu de realitzar l'obertura en aquesta etapa és intentar minimitzar el risc de danyar les cèl·lules adjacents, ja que en l'estadi de blastocist, l'espai perivitellí és quasi inexistent. Els embrions es mantenen en cultiu fins que assoleixen l'estadi de blastocist. En el moment en què el blastocist s'expandeix, les cèl·lules més properes a l'obertura tendeixen a herniar i són biopsiades. L'altra possibilitat consisteix a realitzar l'obertura directament en l'estadi de blastocist, en el dia 5 o 6 del desenvolupament (vegeu la figura 1b). L'àrea de la ZP triada per a la dissecció és la directament oposada on es troba la MCI. Després d'unes hores de cultiu (4-10 h) i la subseqüent hèrnia d'algunes cèl·lules del TE, pot realitzar-se la biòpsia.

En ambdós casos, les biòpsies s'obtenen immobilitzant el blastocist amb una pipeta de subjecció (diàmetre intern: 20-30 μm), amb les cèl·lules herniades col·locades en la posició de les tres (vegeu la figura 1c). Les cèl·lules herniades del TE (2-9 cèl·lules) són aspirades suaument dins la pipeta de biòpsia (diàmetre intern: 30 μm), i a continuació s'apliquen 3-5 polsos de làser per separar les cèl·lules a biopsiar de la resta del blastocist (vegeu la figura 1d). Finalment, les cèl·lules obtingudes són alliberades de la pipeta de biòpsia i queden a disposició per ser processades per a l'anàlisi (vegeu les figures 1e i 2).

Fins al moment, tot i que els casos publi-

cats són pocs, els grups que apliquen aquesta metodologia descriuen una gran eficiència en el procés, ja que es manté la viabilitat dels embrions i s'observa la reconstitució de la cavitat blastocèlica el dia després de la biòpsia (Mc Arthur *et al.*, 2005; Kokkali *et al.*, 2007).

ELS EMBRIONS: BLASTOCISTS

Tal i com s'ha comentat, realitzar el DGP en aquest estadi del desenvolupament requereix que els embrions assoleixin l'estadi de blastocists i que el nombre que hi arriba ens ofereixi possibilitats realistes de dur a terme una transferència embrionària després de l'anàlisi genètica.

Els avenços en el coneixement dels requeriments metabòlics dels embrions en els diferents estadis de desenvolupament (Leese *et al.*, 1991) han permès desenvolupar medis i sistemes de cultiu *in vitro* cada cop més eficients (medis seqüencials) (Ménezo *et al.*, 1999). No obstant això, el nombre d'embrions que assoleixen l'estadi de blastocist és encara relativament baix; només la meitat dels zigots cultivats *in vitro* arriben a blastocist i en aproximadament un 20 % dels cicles iniciats no és podrà dur a terme el DGP per manca d'embrions (McArthur *et al.*, 2005). Aquest percentatge és superior al descrit quan el DGP es fa en embrions primerencs (Goosens *et al.*, 2008). No obstant això, també és cert que molts dels embrions que no aconsegueixen assolir l'estadi de blastocist són cromosòmicament anormals (Sandalinas *et al.*, 2001; Clouston *et al.*, 2002), i possiblement aquestes anomalies són les responsables que els embrions no progressin. Després de la biòpsia de blastocist, sovint hi ha menys embrions transferibles; no obstant això, això es veu compensat pel potencial d'implantació superior d'aquests embrions. Aquest fet permet reduir el nom-

TAULA 1. Resultats del DGP per biòpsia de blastocist (experiència clínica)

	McArthur et al. (2005)	Kokkali et al. (2007)
Nre. cicles iniciats	231	10
Nre. blastocists biopsiats	1050	53
Nre. cicles sense embrions disponibles per a la biòpsia (%)	48 (21)	0 (0)
Nre. embrions diagnosticats (%)	974 (93)	50 (94,3)
Nre. cicles amb transferència (%)	119 (52)	10 (100)
Nre. embrions transferits (mitjana per transferència)	127 (1,1)	21 (2,1)
Taxa d'implantació	41	47,6
Taxa d'embaràs per transferència	43	60
Nre. embrions congelats	146	5 + 7

bre d'embrions a transferir sense disminuir la taxa de gestació i minimitzar el percentatge de gestacions múltiples (McArthur *et al.*, 2005; Kokkali *et al.*, 2007).

MATERIAL D'ESTUDI: CÈL·LULES DEL TROFECTODERMA

A més de l'avantatge que ens ofereix poder disposar de 2-9 cèl·lules d'un mateix embrió per a l'anàlisi genètica, un altre aspecte que es considera positiu de biopsar blastocists és el tipus de cèl·lules que es retiren de l'embrió.

Les cèl·lules del blastocist que estan destinades a formar part del futur l'embrió són les de la massa cel·lular interna (ICM), i les cèl·lules del trofocderma (TE), que són les que s'obtenen amb la biòpsia, estan destinades a participar en la formació de les cobertes extraembrionàries; per tant, la seva retirada no implica una reducció de la massa embrionària.

Les biòpsies d'embrions primerencs impliquen una reducció de la massa embrionària i, si es considera que un embrió no

biopsiat té un potencial d'implantació del 20 %, aquest es veuria reduït a un 17 % després de la biòpsia d'una cèl·lula (Cohen *et al.*, 2006). Ja que amb la biòpsia de blastocists la ICM queda intacta, aquest possible efecte negatiu s'evitaria.

El mosaïcisme observat en embrions obtinguts *in vitro* és l'alteració cromosòmica més freqüent observada en embrions humans primerencs de dones menors de quaranta anys. Aquest fenomen, degut a errors mitòtics, és una de les limitacions del DGP, ja que pot comportar que la cèl·lula analitzada no resulti representativa de la resta de l'embrió. Diversos estudis que analitzen el contingut cromosòmic en l'estadi de blastocist han mostrat que en molts (90 %) coexisteixen línies cel·lulars diferents (Veiga *et al.*, 1999; Ruangvutilert *et al.*, 2000; Bielanska *et al.*, 2002a, b, 2005; Derhaag *et al.*, 2003), tot i que el percentatge de cèl·lules anormals observat és menor (< 30 %) que en estadis embrionaris anteriors (Ruangvutilert *et al.*, 2000; Bielanska *et al.*, 2002a).

S'ha suggerit que la possible localització preferencial de cèl·lules aneuploides al trofocderma podria donar lloc a errors di-

agnòstics, ja que les cèl·lules biopsiades no serien representatives del contingut cromosòmic de l'embrió. De totes maneres, aquestes suposades diferències quant a continguts cel·lulars diferents dels dos llinatges dels blastocists no han estat confirmades en els estudis que s'han dut a terme fins ara (Evsikov i Verlinsky, 1998; Magli *et al.*, 2000; Derhaag *et al.*, 2003).

La presència de cèl·lules poliploides (principalment tetraploides) és un fet freqüent en blastocists (Munné *et al.*, 1994; Delhanty *et al.*, 1997; Bielanska *et al.*, 2002a, b; Ruangvutilert *et al.*, 2000), i sembla que es tracta d'un fenomen normal, probablement relacionat amb la implantació. S'ha observat que les cèl·lules poliploides tendeixen a localitzar-se en el TE. Els percentatges de cèl·lules tetraploides presents en el TE varien entre el 23 i el 74 %, i es troben en menys proporció en blastocists de bona qualitat (Bielanska *et al.*, 2002a); aquest fet s'ha de tenir en consideració en fer el DGP.

MARGE DE TEMPS PER A L'ANÀLISI

El temps disponible per a l'anàlisi és un altre punt important a tenir en compte quan

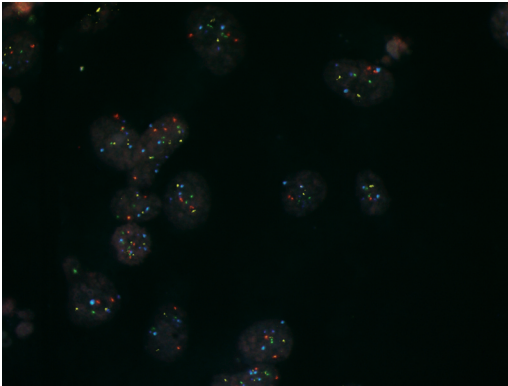


FIGURA 2. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH) en cèl·lules biopsiades.

fem DGP basada en l'anàlisi de blastocists, ja que queda reduït a un màxim de 24 h si volem dur a terme la transferència dels embrions en el mateix cicle, i obliga a establir una coordinació molt acurada entre les diferents unitats que intervenen en el procés.

El fet que no tots els embrions d'una mateixa cohort assoleixin l'estadi de blastocist de manera sincrònica pot implicar que les biòpsies hagin de realitzar-se en diferents moments, i això afecta el procés de l'anàlisi genètica de les mostres. Fins i tot, si el nombre final d'embrions a analitzar és baix, aquest aspecte complica l'organització al laboratori de DGP. Com a alternativa, el grup de Kokkali i col·laboradors opta per congelar (sense DGP) els embrions que assoleixen l'estadi de blastocist més tardanament (el dia 6è), i els mantenen per a una anàlisi en el cicle següent. No obstant això, aquesta aproximació només seria vàlida en els casos en què es disposés de blastocists biopsiats el dia +5 que haguessin estat diagnosticats com a normals per a la transferència.

Pel que fa a la durada dels procediments diagnòstics, la realitat és que la majoria de protocols d'anàlisi en DGP que s'utilitzen actualment es poden dur a terme en menys de 24 h, i el temps només representaria una limitació en els casos en què fos necessari confirmar o repetir alguna anàlisi.

CRIOPRESERVACIÓ

La criopreservació d'embrions biopsiats continua sent un dels punts febles del DGP, sigui quin sigui l'estadi embrionari en què es dugui a terme. Els embrions amb una obertura a la ZP són més sensibles al procés de congelació, fet que es reflecteix en una reduïda taxa de supervivència i desenvolupament d'aquests embrions quan són congelats i descongelats (Joris *et al.*, 1999; Magli *et al.*, 1999). Aquest impacte negatiu del

procés de congelació es fa palès tant en embrions primerencs com en blastocists sense la ZP intacta.

El procés de vitrificació com a alternativa a les tècniques clàssiques de congelació ha estat introduït en nombrosos programes de congelació a causa de la seva simplicitat i, sobretot, dels seus excel·lents resultats, no solament en oòcits, sinó també en embrions primerencs i blastocists (Vanderzwalmen *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2005). Els resultats obtinguts fins ara amb la vitrificació dels embrions biopsiats (Parriego *et al.*, 2007) fan que es presenti com l'opció de preferència després d'un DGP.

APLICACIÓ CLÍNICA

L'experiència clínica del DGP en blastocists és, fins al moment, poc extensa, i només han estat publicades sèries procedents de dos grups (McArthur *et al.*, 2005; Kokkali *et al.*, 2007).

Les dades disponibles (vegeu la taula 1) mostren que el nombre mitjà de blastocists biopsiats per pacient és de cinc (4,5 en el cas de McArthur *et al.* (2005) i 5,3 en el de Kokkali *et al.*, (2007). S'observen diferències entre els dos grups, tant pel que fa als cicles en què no va poder-se realitzar el DGP per manca d'embrions, com pel que fa al nombre d'embrions disponibles per a la transferència.

No obstant això, les eficiències diagnòstiques descrites en les dues sèries són similars (93 i 94,3%) i són clarament superiors a les descrites en la literatura per als cicles PGD-PCR mitjançant biòpsia de blastòmer de dia +3 (Goosens *et al.*, 2008). A més, ambdós grups descriuen elevades taxes d'implantació i embaràs després de la transferència d'aquests embrions.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat realitzat sota els auspicis de la Càtedra d'Investigació en Obstetrícia i Ginecologia del Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció, Institut Universitari Dexeus, Universitat Autònoma de Barcelona, amb el suport del Projecte 2005SGR 00437 (Generalitat de Catalunya). Els autors agraeixen a Marta Parriego la preparació de les il·lustracions.

BIBLIOGRAFIA

- BIELANSKA, M.; JIN, S.; BERNIER, M.; TAN, S. L.; AO, A. (2005). «Diploid-aneuploid mosaicism in human embryos cultured to the blastocyst stage». *Fertility and Sterility*, 84: 336-342.
- BIELANSKA, M.; TAN, S. L.; AO, A. (2002a). «High rate of mixoploidy among human blastocysts cultured in vitro». *Fertility and Sterility*, 78: 1248-1253.
- (2002b). «Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome». *Human Reproduction*, 17: 413-419.
- BOER, K. A. DE; CATT, J. W.; JANSEN, R. P.; LEIGH, D.; McARTHUR, S. (2004). «Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF». *Fertility and Sterility*, 82: 295-298.
- CARSON, S. A.; GENTRY, W. L.; SMITH, A. L.; BUSTER, J. (1993). «Trophectoderm microbiopsy in murine blastocysts: comparison of four methods». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 10: 427-433.
- CLOUSTON, H. J.; HERBERT, M.; FENWICK, J.; MURDOCH, A. P.; WOLSTENHOLME, J. (2002). «Cytogenetic analysis of human blastocysts». *Prenatal Diagnosis*, 22: 1143-1152.
- COHEN, J.; WELLS, D.; MUNNÉ, S. (2007). «Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates». *Fertility and Sterility*, 87: 496-503.
- DELHANTY, J. D.; HARPER, J. C.; AO, A.; HANDYSIDE, A. H.; WINSTON, R. M. (1997). «Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients». *Human Genetics*, 99: 755-760.
- DERHAAG, J. G.; COONEN, E.; BRAS, M.; BERGERS JANSEN, J. M.; IGNOUL-VANVUCHELEN, R.; GERAEDTS, J.

- P.; EVERS, J. L.; DUMOULIN, J. C. (2003). «Chromosomally abnormal cells are not selected for the extra-embryonic compartment of the human preimplantation embryo at the blastocyst stage». *Human Reproduction*, 18: 2565-2574.
- DOKRAS, A.; SARGENT, I. L.; ROSS, C.; GARDNER, R. L.; BARLOW, D. H. (1990). «Trophectoderm biopsy in human blastocysts». *Human Reproduction*, 5: 821-815.
- EVSIKOV, S.; VERLINSKY, Y. (1998). «Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts». *Human Reproduction*, 13: 3151-3155.
- GOOSSENS, V.; HARTON, G.; MOUTOU, C.; SCRIVEN, P. N.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; SERMON, K.; HARPER, J. C. (2008) «ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006». *Hum Reprod*. DOI: 10.1093/humrep/den238.
- HANDYSIDE, A. H.; KOTOGIANNI, E. H.; HARDY, K.; WINSTON, R. M. (1990). «Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification». *Nature*, 344: 768-770.
- JORIS, H.; ABBEL, E. VAN DER; VOS, A. DE; STEIRTEGHEM, A. VAN (1999). «Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation». *Human Reproduction*, 14: 2833-2837.
- KOKKALI, G.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; VRETTOU, C.; STAVROU, D.; JONES, G. M.; CRAM, D. S.; MAKRAKIS, E.; TROUNSON, A. O.; KANAVAKIS, E.; PANTOS, K. (2007). «Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study». *Human Reproduction*, 22: 1443-1449.
- KOKKALI, G.; VRETTOU, C.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; JONES, G. M.; CRAM, D. S.; STAVROU, D.; TROUNSON, A. O.; KANAVAKIS, E.; PANTOS, K. (2005). «Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major». *Human Reproduction*, 20: 1855-1859.
- LEESE, H. J.; HUMPHERSON, P. G.; HARDY, K.; HOOPER, M. A.; WINSTON, R. M.; HANDYSIDE A. H. (1991). «Profiles of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and adenine phosphoribosyl transferase activities measured in single preimplantation human embryos by high-performance liquid chromatography». *Journal of Reproduction and Fertility*, 91: 197-202.
- MAGLI, M. C.; GIANAROLI, L.; FORTINI, D.; FERRARETTI, A. P.; MUNNÉ S. (1999). «Impact of blastomere biopsy and subsequent cryopreservation». *Human Reproduction*, 14: 770-773.
- MAGLI, M. C.; JONES, G. M.; GRAS, L.; GIANAROLI, L.; KORMAN, I.; TROUNSON, A. O. (2000). «Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro». *Human Reproduction*, 15: 1781-1786.
- MCARTHUR, S. J.; LEIGH, D.; MARSHALL, J. T.; BOER, K. A. DE; JANSEN, R. P. (2005). «Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts». *Fertility and Sterility*, 84: 1628-1636.
- MENEZO, Y. J. R.; CHOUTEAU, J.; TORELLÓ, M. J.; GIRARD, A.; VEIGA, A. (1999). «Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans». *Fertility and Sterility*, 72: 221-224.
- MUNNÉ, S.; GRIFO, J.; COHEN, J.; WEIER, H. U. (1994). «Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study». *American Journal of Human Genetics*, 55: 150-159.
- PARRIEGO, M.; SOLÉ, M.; AURELL, R.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. (2007). «Birth alter transfer of frozen-thawed vitrified blastocysts». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24: 147-149.
- RUANGVUTILERT, P.; DELHANTY, J. D.; SERHAL, P.; SIMOPOULOU, M.; RODECK, C. H.; HARPER, J. C. (2000). «FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos». *Prenatal Diagnosis*, 20: 552-560.
- SANDALINAS, M.; SADOWY, S.; ALIKANI, M.; CALDERON, G.; COHEN, J.; MUNNÉ, S. (2001). «Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage». *Human Reproduction*, 16: 1954-1958.
- VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.; STANDAERT, V.; ROOSEDAAL, E. VAN; VANDERVORST, M.; BOLLEN, N.; ZECH, H.; MUKAIDA, T.; TAKAHASHI, K.; SCHOYSMAN, R. (2002). «Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification». *Human Reproduction*, 17: 744-751.
- VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M.; CARRERA, M.; VIDAL, F.; BOISO, I.; MENEZO, Y.; BARRI, P. N. (1999). «Confirmation of diagnosis in preimplantation genetic diagnosis (PGD) through blastocyst culture: preliminary experience». *Prenatal Diagnosis*, 19: 1242-1247.
- VEIGA, A.; SANDALINAS, M.; BENKHALIFA, M.; BOADA, M.; CARRERA, M.; SANTALO, J.; BARRI, P. N.; MENEZO, Y. (1997). «Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human». *Zygote*, 5: 351-354.
- ZHENG, W. T.; ZHUANG, G. L.; ZHOU, C. Q.; FANG, C.; OU, J. P.; LI, T.; ZHANG, M. F.; LIANG, X. Y. (2005). «Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos». *Human Reproduction*, 20: 1615-1618.