



Un testigo genético: PGT como herramienta de control de calidad del laboratorio de fertilización in vitro para confirmación de parentescos

A genetic witness: PGT as a routine IVF quality control tool to confirm familial relationships.

Diana Garro-Núñez,^{1,2} Jia Xu,² Nathan Treff,¹ Diego Marín¹

Resumen

OBJETIVO: Demostrar y validar que una plataforma de PGT basada en microarreglo de SNPs es capaz de predecir relaciones familiares entre muestras de manera rutinaria y, por lo tanto, convertirse en una herramienta para el control de calidad y seguridad del laboratorio de fertilización in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio retrospectivo de validación. Se determinaron puntuaciones de similitud genética de las diferentes categorías de parentesco con biopsias de trofoectodermo de 97 embriones, 22 muestras de ADN parental y 317 rebiopsias de 58 embriones descartados. Luego, el método validado se implementó como control de calidad de rutina en un laboratorio de PGT para 4,767 casos clínicos.

RESULTADOS: Los parentescos (mismo origen, hermano completo y no relacionado) se distinguen fácilmente a partir de las puntuaciones de similitud genética con 100% de sensibilidad y especificidad. No fue posible diferenciar entre hermanos completos y medio hermanos debido a una superposición de las puntuaciones. Progenitor-embrión presentaron puntuaciones con 100% de sensibilidad y especificidad.

CONCLUSIÓN: Plataformas de PGT basadas en SNP de alta resolución ofrecen la posibilidad de ampliar su aplicabilidad más allá de indicaciones convencionales, pues son capaces de determinar las relaciones familiares entre muestras de embriones. Esto las convierte en una valiosa herramienta adicional para mejorar la seguridad en los laboratorios de embriología.

PALABRAS CLAVE: PGT, testigos electrónicos; biopsias de trofoectodermo; parentesco; SNP.

Abstract

OBJECTIVE: To determine if a high-throughput SNP-array based PGT platform can accurately predict familial relationships between samples under analysis.

MATERIALS AND METHODS: Retrospective validation study. Genetic similarity scores (GSS) of the different categories of relationship were determined with trophoctoderm biopsies of 97 embryos, 22 parental DNA samples and 317 rebiopsies of 58 arrested embryos. The validated method was then implemented as routine quality control in a PGT laboratory for 4,767 clinical cases.

RESULTS: Relationships (same origin, full sibling, and unrelated) are easily distinguished from the GSS with 100% sensitivity and specificity. It was not possible to differentiate between full and half sibs due to overlapping scores. Parent-embryo presented scores with 100% sensitivity and specificity.

¹Genomic Prediction Inc, 671 US Highway One, North Brunswick, NJ 08902, USA.

²Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica.

Recibido:

Aceptado:

Correspondencia

Diana Garro-Núñez
diana@genomicprediction.com

Este artículo debe citarse como: Garro-Núñez D, Xu J, Treff N, Marín D. Un testigo genético: PGT como herramienta de control de calidad del laboratorio de fertilización in vitro para confirmación de parentescos. Reproducción (México) 2024; 15: 1-10.

CONCLUSION: high-throughput SNP-array based PGT platform offer the possibility of expanding their applicability beyond conventional indications, as they can determine familial relationships between embryo samples. This makes them a valuable additional tool to improve safety in embryology laboratories.

KEYWORDS: PGT, electronic witness; trophoctoderm biopsies; relationship; SNPs.

ANTECEDENTES

Las clínicas de fecundación in vitro llevan simultáneamente a cabo tareas de alta complejidad que requieren estrategias que minimicen los riesgos. Los errores pueden ocurrir durante la identificación de pacientes, preparación de muestras de semen, inseminación, vitrificación y otros procesos de manipulación que implican el trasvase de muestras.^{1,2,3} Se estima que la tasa de errores en los procedimientos de fertilización in vitro va del 0.20 al 1.39% incluidas las muestras biológicas de distintos pacientes, asignación equivocada de blastocistos y error en etiquetas preasignadas.^{2,4,5,6} Las consecuencias de esos errores son: diagnóstico incorrecto, pérdida del material biológico y, en los casos más desfavorables, inseminación con gametos incorrectos o la transferencia errada de un embrión.^{2,4,7-10}

La comunidad científica de reproducción asistida recomienda incorporar métodos de identificación y trazabilidad del material biológico.³ Por eso el uso de testigos dobles manuales y testigos electrónicos (EWS; por sus siglas en inglés) es decisivo para reducir los errores humanos en los laboratorios de fertilización in vitro.^{2,6} Los testigos dobles se refieren a la participación de un segundo profesional que confirma la información, pero no están exentos de errores involuntarios.⁷ EWS son sistemas electrónicos

automatizados que ahorran tiempo y mejoran el flujo de trabajo.⁶ Algunos tipos de EWS se basan en la identificación de muestras por radiofrecuencia (RFID), códigos de barras de silicona y el uso de inteligencia artificial.^{11,12,13} Un problema de los EWS es que pueden tener fallas debido a una configuración incorrecta del sistema y al daño de etiquetas.^{2,5}

Existen diferentes plataformas para practicar pruebas genéticas preimplantacionales (PGT por sus siglas en inglés), como las basadas en la reacción de cadenas de polimerasa (PCR), secuenciación de siguiente generación (NGS) y los microarreglos de polimorfismos de nucleótido único (SNPs).¹⁴ En la actualidad, las plataformas basadas en NGS son las más utilizadas para pruebas genéticas preimplantacionales debido a su fácil acceso, versatilidad de protocolos y alta relación costo-efectividad.¹⁵ Si bien algunas de estas plataformas logran incluir el genotipado de SNPs en muestras procesadas,¹⁶ la mayor parte se limita al análisis del dosaje cromosómico, limitando su uso a indicaciones convencionales de PGT, como aneuploidias (PGT-A), enfermedades monogénicas (PGT-M) y rearrreglos estructurales (PGT-SR).

Gracias a avances recientes en el desarrollo de plataformas de PGT, específicamente microarreglos de SNPs, ahora es posible practicar el



análisis del genoma de biopsias de blastocistos genotipando más de 860,000 SNPs.¹⁷ Esta gran densidad de variantes genéticas distribuidas a lo largo del genoma permite predecir la similitud genética entre muestras analizadas con alta precisión, lo que sugiere que este tipo de plataforma podría utilizarse para confirmar parentescos entre muestras de una misma cohorte embrionaria, o entre embriones y sus respectivas fuentes de gametos, de haber ADN disponible de ambos padres biológicos. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue: demostrar y validar que una plataforma de PGT basada en microarreglo de SNPs es capaz de predecir relaciones familiares entre muestras de manera rutinaria y, por lo tanto, convertirse en una herramienta para el control de calidad y seguridad del laboratorio de fertilización in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo, de validación de la plataforma de SNPs de alta productividad para confirmar las relaciones familiares entre muestras estudiadas en un único laboratorio clínico especializado en pruebas genéticas preimplantacionales. El análisis se efectuó en dos fases: la primera consistente en la validación del método y la segunda en su aplicación como parte de la rutina del laboratorio de PGT.

Todas las muestras incluidas en el análisis cumplieron los criterios establecidos para su procesamiento y obtuvieron resultados susceptibles de interpretación. El procesamiento de muestras se llevó a cabo en un laboratorio clínico acreditado por el Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) y el College of American Pathologists (CAP) de New Jersey, EUA.

El *training set* utilizado para la validación fue de 11 casos de PGT-M y PGT-SR con 97 biopsias de trofoectodermo y 22 muestras de ADN parental disponibles. Además, se utilizaron 58 embriones previamente descartados debido a aneuploidias,

donados para investigación. Estos embriones fueron objeto de múltiples biopsias (317 rebiopsias). Una vez establecida la validación del método se procedió a implementarlo de modo automatizado como control de calidad para 4,767 casos clínicos de PGT procesados por un único laboratorio de pruebas genéticas.

Fase 1. Validación

Las muestras de *training set* se procesaron en ciego. Previamente se conocía el parentesco entre las muestras, gracias al análisis de ligamiento que involucra las pruebas PGT-M y PGTSR.¹⁷ Las categorías de parentescos o relaciones familiares utilizadas para cada par de muestras fueron: 1) mismo origen (rebiopsias del mismo embrión), 2) hermano completo (comparten los dos progenitores), 3) medio hermano (comparte solo un progenitor), 4) progenitor-embrión (embrión y uno de sus padres biológicos) y 5) no relacionados. Enseguida se compararon los datos generados por el microarreglo de SNPs de cada muestra analizada con las otras muestras de la fase de validación (**Cuadro 1**). Se generó una puntuación de similitud genética (descrita en el apartado análisis genético) entre cada par de muestras. Enseguida se procedió a revelar las relaciones de cada par de muestras comparadas y se establecieron umbrales que permitieran identificar cada una de las categorías de relaciones familiares.

Cuadro 1. Cantidad de relaciones según el nivel de parentesco entre las muestras utilizadas en la fase de validación

Nivel de parentesco	Número de observaciones
No relacionado	39442
Hermanos completos	2652
Medios hermanos	496
Progenitor-embrión	452
Mismo origen	317
Total	43359

Fase 2. Aplicación

Una vez establecidos los umbrales de las puntuaciones de similitud genética (descrita en el apartado Análisis genético) para cada categoría, se generó un algoritmo que permite automatizar este análisis para todas las muestras procesadas en un laboratorio de PGT.

Análisis genético

Como parte de los estándares de rutina del laboratorio clínico de PGT se evaluó la calidad del ADN, de modo que solo se incluyeron al estudio las muestras con calidad suficiente para generar un cariotipo. El ADN amplificado de todas las muestras fue procesado por una plataforma PGT basada en el microarreglo de SNPs del Biobanco del Reino Unido (UKBB). Esta plataforma incluye más de 860,000 polimorfismos de nucleótido único (SNP) distribuidos a lo largo del genoma.¹⁷ La placa del microarreglo tiene la capacidad de procesar 96 muestras simultáneamente. Las muestras pueden ser biopsias de trofoectodermo, en algunos casos ADN extraído de saliva parental o de otros parientes, dos controles positivos (ADN genómico del repositorio de Coriell Institute for Medical Research) y dos controles negativos (pocillos vacíos).

Con respecto a la generación de las puntuaciones de similitud genética entre muestras, se utilizó el programa PLINK 1.90 beta para calcular las puntuaciones de Identidad por Estado (IBS), que cuantifican la proporción de SNP con genotipos idénticos entre dos muestras comparadas.¹⁸ El IBS asigna un puntaje a la comparación del genotipo de cada SNP de la siguiente forma: IBS = 1 si ambos alelos de un SNP son iguales entre dos muestras, IBS = 0.5 si solo un alelo es idéntico e IBS = 0 si no comparten ningún alelo. El valor total de IBS se calcula mediante la suma del puntaje de todos los SNPs y luego se divide por el total de SNPs. Los valores finales de puntuaciones de similitud genética (PSG) se

estimaron a partir de la fórmula $PSG = 1 - IBS$. Cada categoría de parentesco debe tener un rango distinto de similitud genética en comparación con las otras para ser validada. A partir de los valores anteriores se establecen los umbrales de similitud genética para cada parentesco al promediar los valores de extremos próximos de los rangos entre categorías.

Además, para confirmar la relación biológica materna y paterna de las muestras de trofoectodermo se hizo un análisis de SNPs informativos, consistente en la identificación de SNPs homocigotos en todo el genoma con genotipos opuestos para cada uno de los progenitores y su evaluación en muestras de embriones para confirmar patrones de herencia mendeliana. Rana y colaboradores ahondan con más detalle en la validación de este método.^{19,20}

RESULTADOS

Fase 1: Validación

Las puntuaciones de similitud genética calculadas para la categoría 1) mismo origen estuvieron entre 0.001-0.032, 2) hermanos completos entre 0.059-0.110, 3) medios hermanos entre 0.104-0.133, 4) progenitores y embrión entre 0.084-0.115, y 5) muestras no relacionadas entre 0.120-0.194 (**Figura 1A**). Para muestras de biopsias embrionarias, las categorías mismo origen, hermano completo y no relacionado se distinguen fácilmente por las puntuaciones calculadas y se establecieron umbrales que mantuvieron una sensibilidad y especificidad del 100%. No fue posible definir un umbral para distinguir entre hermanos completos y medio hermanos debido a una superposición de las puntuaciones del IBS (**Figura 1A y 1B**). Además, se establecieron umbrales para las relaciones progenitor-embrión con una sensibilidad y especificidad del 100%. Es importante resaltar que los valores de progenitor-embrión se encuentran dentro de la categoría de parentesco redefinida



como “relacionados” (**Figura 1B**) y su resultado se complementa con el análisis adicional de confirmación de relación biológica materna y paterna por medio de SNPs informativos.

Fase 2: Aplicación

El algoritmo genera como resultado final un mapa de calor para cada placa del microarreglo (**Figura 2 y 3**). Los mapas de calor son matrices de los valores del puntaje de similitud genética (1-IBS) para las 96 muestras que se procesan en una misma placa comparadas entre sí (**Fi-**

gura 2A). Se utiliza un patrón de color para representar el valor de la similitud entre dos muestras, según los umbrales previamente validados (**Figura 1B**). Este gráfico permite distinguir fácilmente las cohortes embrionarias que se corrieron en una misma placa de microarreglo. Las **Figuras 2A y 2B** muestran un ejemplo de los resultados esperados de un mapa de calor y de una cohorte embrionaria generados a partir de un proceso de fertilización in vitro certero. Es importante evaluar las métricas de calidad del ADN como primer paso, porque si alguna muestra tiene baja calidad o falla de amplificación, el

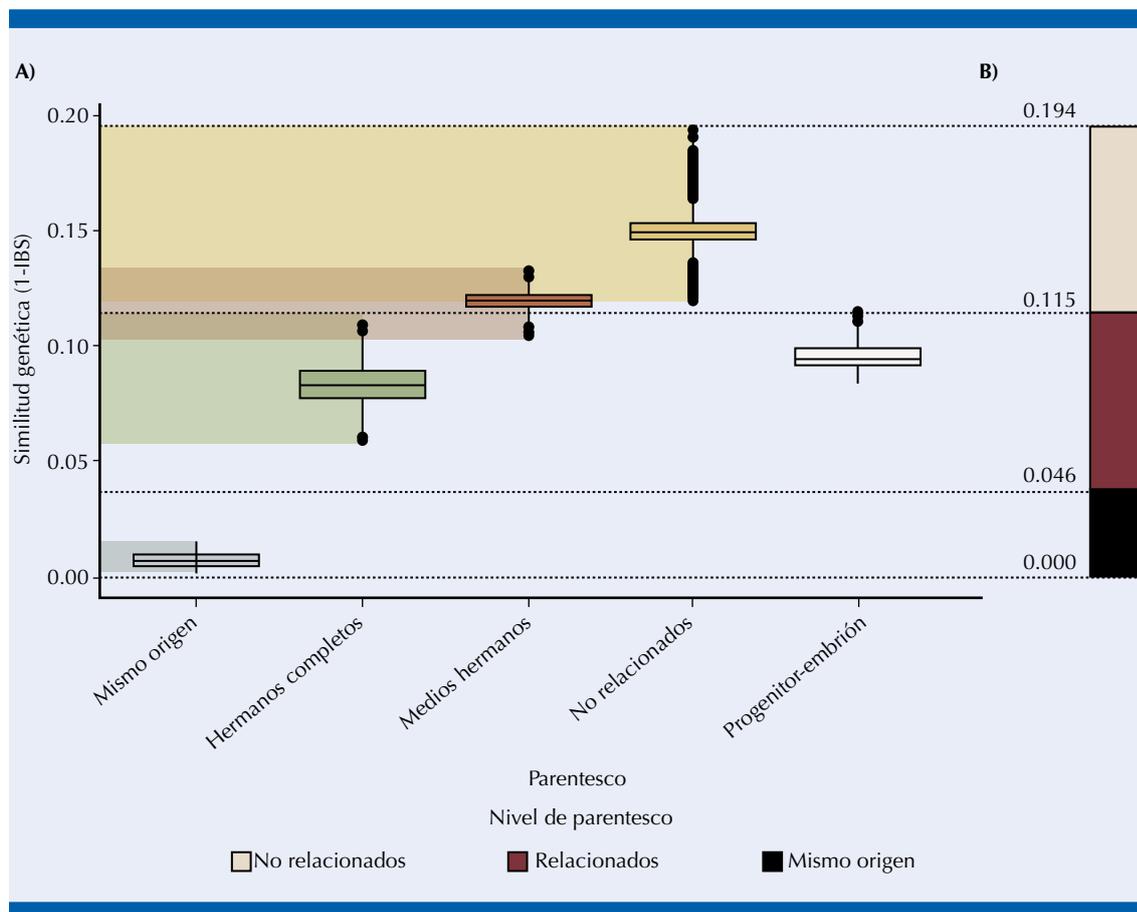


Figura 1. Similitud genética según categorías de parentesco. **A)** Puntuaciones 1 - Identidad por Estado (IBS) para cada categoría de parentesco a partir de biopsias de trofoectodermo y ADN de saliva parental. **B)** Umbrales de similitud genética según el nivel de parentesco redefinido según rangos de IBS diferenciados entre sí.

algoritmo la tomará como no relacionada. Esto se debe a una subrepresentación de los alelos compartidos entre dos muestras, producto del genotipado ineficiente de una de ellas debido a su baja calidad.

La **Figura 2C** muestra un ejemplo de error en el laboratorio de PGT que se cometió intencionalmente durante la validación, para confirmar su utilidad como control de seguridad del laboratorio de PGT. Este error consistió en invertir la orientación de la placa del microarreglo, de manera que las 96 muestras tenían un número de identificador incorrecto. La **Figura 2D** ejemplifica un error en el laboratorio de fertilización in vitro, en donde un embrión no pertenece a la cohorte embrionaria. De los 4,767 casos clínicos analizados a los que se aplicó el Testigo Genético como parte de la rutina del laboratorio de PGT, se identificaron 3 (0.02%) errores en la trazabilidad de embriones debido a inconsistencias en el procedimiento de las clínicas de fertilización in vitro.

La fase de validación no logró identificar un límite de similitud genética específico para medios hermanos, por lo que esta categoría no puede identificarse con precisión por esta herramienta. Sin embargo, en el laboratorio de PGT se reciben y utilizan muestras de múltiples donantes de gametos, ya sea para la misma paciente o para diferentes pacientes. Cuando estas muestras se procesan, el mapa de calor puede identificarlos aleatoriamente como relacionados o no relacionados (**Figura 3**) debido a que el umbral de similitud genética que divide relacionados y no relacionados se encuentra en medio del rango de similitud genética de medios hermanos. **Figura 1**

DISCUSIÓN

Esta investigación demuestra que las pruebas de PGT con alta densidad (>800,000) de SNPs y una plataforma de alta productividad permi-

ten la predicción del parentesco entre muestras analizadas. Es posible identificar cuándo dos biopsias son del mismo embrión, son hermanos completos o no están relacionadas, gracias a los puntajes IBS de similitud genética. Además, la incorporación del análisis de SNPs informativos permite definir cuándo una muestra es el progenitor de un embrión. Si bien esta herramienta no predice con exactitud el parentesco entre medios hermanos, el patrón aleatorio que se obtiene en el mapa de calor puede alertar, potencialmente, el uso erróneo de espermatozoides con diferentes orígenes en una misma cohorte embrionaria, cuando en realidad el tratamiento no involucró donantes.

Cuando el testigo genético detecta inconsistencias en los parentescos esperados, el mapa de calor de huella genética mostrará patrones de color inusuales. Cuando esto sucede, primero se debe corroborar que no haya problemas con la amplificación de la muestra; por ejemplo, muestras con resultados inconclusos que, por su calidad, no son isusceptibles de interpretación. Luego, se inicia una investigación en el laboratorio de PGT para verificar que todo el proceso se llevó a cabo correctamente (revisión de videos, documentación registrada, etc.). En caso de no identificarse algún error en el laboratorio de PGT, se contacta a la clínica de fertilización in vitro para que inicie una investigación interna. Finalmente, se toman las medidas correctivas necesarias.

Hasta la fecha no tenemos conocimiento de que plataformas de PGT disponibles en el mercado cuenten con una validación publicada para confirmar el parentesco entre muestras. Por eso, los resultados de este estudio demuestran, por primera vez, que una plataforma de PGT puede incorporar la confirmación de relaciones familiares como un testigo genético de rutina. Es importante resaltar que este método no fue diseñado como una prueba de paternidad porque estas pruebas quedan reservadas para los

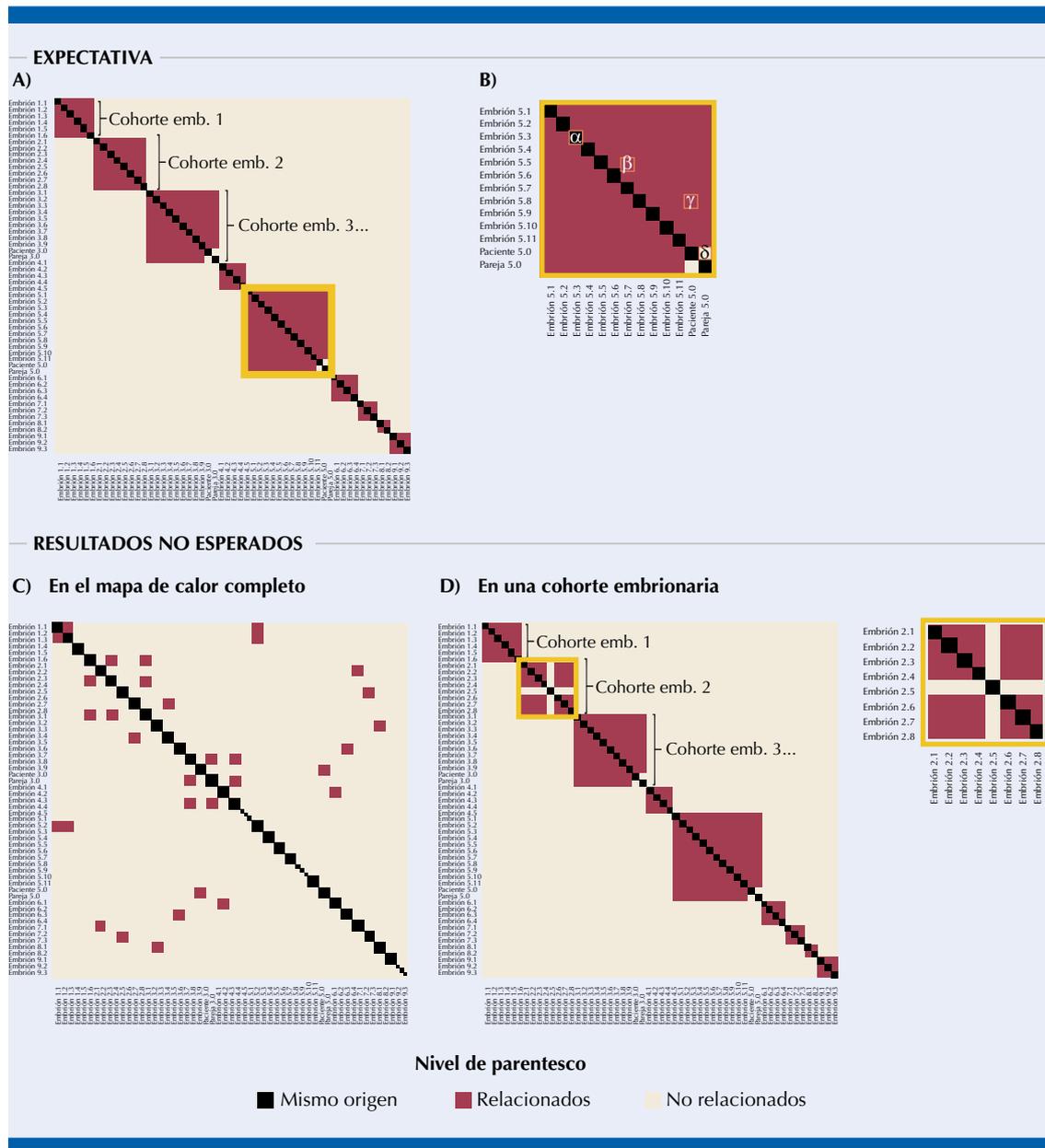


Figura 2. Control de calidad basado en un mapa de calor para verificar el parentesco entre embriones de diferentes cohortes embrionarias. **A)** Matriz de los valores de puntaje de similitud genética esperada para todas las muestras que se procesan en la misma placa del microarreglo de SNPs comparadas entre sí. **B)** Ejemplo de una cohorte embrionaria en donde se corrobora que cada muestra pertenece efectivamente a la cohorte. β - Indica la comparación de una muestra con ella misma, β - indica que el embrión 5.5 es hermano del embrión 5.7, γ - indica que la paciente 5.0 es la madre del embrión 5.8. δ - Muestra que los progenitores no están relacionados. **C)** Ejemplo de un error en el laboratorio PGT que conduce a una discrepancia en la identidad de todas las muestras. **D)** Ejemplo de un error en el laboratorio FIV: el embrión 2.5 no pertenece a la cohorte embrionaria. El patrón de color refleja los rangos de IBS validados según parentesco: negro, cuando las muestras son del mismo embrión; rojo, están relacionados a nivel de hermanos o progenitor-embrión; beige, no relacionado.

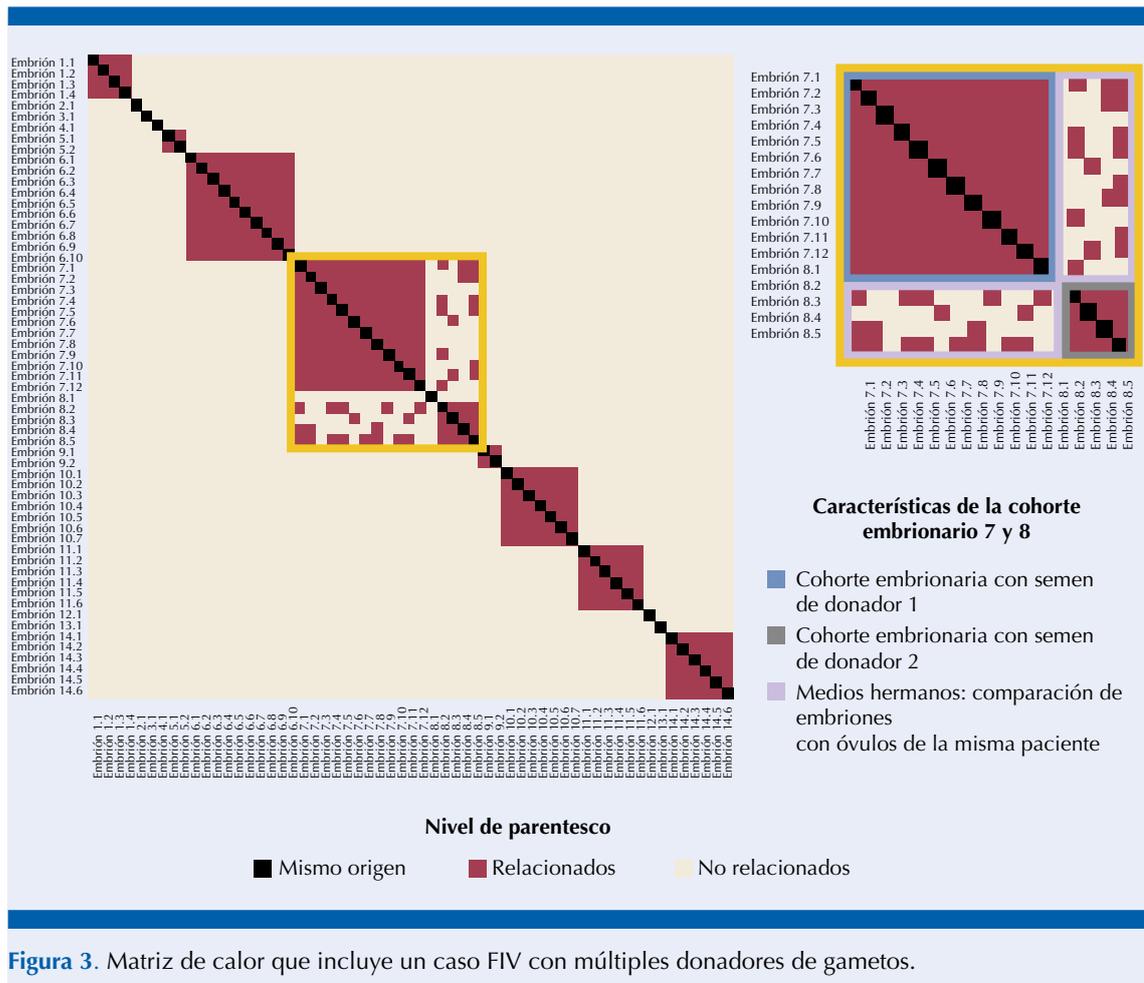


Figura 3. Matriz de calor que incluye un caso FIV con múltiples donadores de gametos.

laboratorios acreditados para ese fin. El objetivo del testigo genético es robustecer los sistemas de trazabilidad vigentes en los laboratorios de embriología y, además, tener una herramienta extra para el control interno en el laboratorio de genética.

Las ventajas de este método incluyen que su implementación no supone gastos económicos adicionales ni complejidad técnica porque se utilizan los mismos datos generados para el análisis de PGT. Además, a pesar de que los valores de IBS varían según la ancestría, este no debería ser un factor preocupante, ya que

se confirmó la utilidad de este método en una población de pacientes con orígenes muy diversos. Es importante considerar que la proporción de ciclos de fertilización in vitro con PGT aumenta constantemente,²¹ por lo que su implementación como herramienta adicional de control de seguridad en el laboratorio de fertilización in vitro puede crecer de forma orgánica. Sumado a lo anterior, el testigo genético puede potencialmente ser incorporado por laboratorios que utilizan diferentes métodos de PGT, como Next Generation Sequencing (NGS), siempre y cuando: 1) se optimicen estas plataformas para incorporar suficientes SNPs



que permitan este análisis, y 2) sean validados con controles positivos. Además, informar a los pacientes acerca del uso de esta herramienta puede consolidar su confianza en el tratamiento de fertilización in vitro al percibir un nivel de seguridad superior en la manipulación de sus muestras, especialmente si los pacientes no tienen experiencia previa.⁹

Una limitación de este estudio es la posibilidad de que los casos de PGT con múltiples donantes de gametos no se beneficien de esta herramienta porque los medios hermanos no se distinguen al 100% de los hermanos completos y las muestras no relacionadas. Este método no reemplaza el etiquetado o el testigo electrónico para distinguir el número asignado a cada embrión dentro de la misma cohorte, sobre todo cuando no se cuenta con ADN de los padres. Por último, es decisivo tener en mente que la manipulación de las muestras en el laboratorio de fertilización in vitro después del reporte de PGT requiere de un nivel de rigurosidad aún mayor porque las muestras no serán objeto de ninguna otra medida de control de seguridad adicional a los métodos de testigo convencionales.

CONCLUSIONES

Estos datos amplían las aplicaciones y los beneficios de PGT al validar su uso como herramienta de control de calidad para los laboratorios de PGT y embriología. En entornos donde los sistemas de testigos electrónicos no son prácticos de implementar o se ven afectados por un error humano previo o propio del sistema, el PGT de alta resolución puede volverse fundamental para optimizar la seguridad de la fertilización in vitro. Se recomienda que a mediano plazo todas las plataformas de PGT se desarrollen con una alta resolución para tener mayor densidad de polimorfismos y poder implementar el testigo genético como parte de la rutina del laboratorio PGT.

REFERENCIAS

1. Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, for Committee of the Special Interest Group on Embryology et al. Revised Guidelines for Good Practice in IVF Laboratories. *Hum. Reprod.* 2008;23(6):1253–1262. <https://doi.org/10.1093/humrep/den068>.
2. Rienzi L, Bariani F, Dalla Zorza M, Romano S, Ubaldi FM et al. Failure Mode and Effects Analysis of Witnessing Protocols for Ensuring Traceability during IVF. *Reprod. Biomed.* 2015;31(4):516–522. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.018>.
3. ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos MJ, Apter S, Coticchio G, Vermeulen N et al. Revised Guidelines for Good Practice in IVF Laboratories (2015)†. *Hum. Reprod.* 2016;31(4):685–686. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew016>.
4. Cimadomo D, Ubaldi FM, Capalbo A, Maggiulli R, Rienzi L et al. Failure Mode and Effects Analysis of Witnessing Protocols for Ensuring Traceability during PGD/PGS Cycles. *Reprod. Biomed.* 2016;33(3):360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.06.002>.
5. Thornhill AR, Brunetti XO, Bird S, Bennett K, Taylor J et al. Reducing Human Error in IVF with Electronic Witnessing. *Fertil. Steril.* 2011;96(3):S179. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.697>.
6. Holmes R, Wirka KA, Catherino AB, Hayward B, Swain JE. Comparison of Electronic versus Manual Witnessing of Procedures within the in Vitro Fertilization Laboratory: Impact on Timing and Efficiency. *FS Rep.* 2021;2(2):181–188. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2021.04.006>.
7. de los Santos MJ, Ruiz A. Protocols for Tracking and Witnessing Samples and Patients in Assisted Reproductive Technology. *Fertil. Steril.* 2013;100(6):1499–1502. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.029>.
8. Dyer C. Human Error and Systems Failure Caused IVF Mix Up. *BMJ* 2004;328(7455): 1518.
9. Montero L, Gallardo M, Lastra M, Braula-Reis A, Sánchez-Martín F et al. La percepción de los pacientes de reproducción asistida sobre la tecnología de testigo electrónico: resultados de una encuesta. *Med. Reprod. Embriología Clínica* 2018;5(1):19–24. <https://doi.org/10.1016/j.medre.2017.09.002>.
10. Spriggs M. IVF Mixup: White Couple Have Black Babies. *J. Med. Ethics* 2003;29(2):65. <https://doi.org/10.1136/jme.29.2.65>.
11. Gupta S, Fauzdar A, Singh VJ, Srivastava A, Singh S et al. A Preliminary Experience of Integration of an Electronic Witness System, Its Validation, Efficacy on Lab Performance, and Staff Satisfaction Assessment in a Busy Indian in Vitro Fertilization Laboratory. *J. Hum. Reprod. Sci.* 2020;13(4):333–339. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_66_20.

12. Novo S, Nogués C, Penon O, Barrios L, Ibáñez E et al. Barcode Tagging of Human Oocytes and Embryos to Prevent Mix-Ups in Assisted Reproduction Technologies. *Hum. Reprod.* 2014;29(1):18–28. <https://doi.org/10.1093/humrep/det409>.
13. Hammer KC, Jiang VS, Kanakasabapathy MK, Thirumalaraju P, Shafiee H et al. Using Artificial Intelligence to Avoid Human Error in Identifying Embryos: A Retrospective Cohort Study. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2022;39(10):2343–2348. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02585-y>.
14. Treff NR, Zimmerman RS. Advances in Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disease and Aneuploidy. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2017;18(1):189–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035508>.
15. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Greco E et al. Application of Next-Generation Sequencing Technology for Comprehensive Aneuploidy Screening of Blastocysts in Clinical Preimplantation Genetic Screening Cycles. *Hum. Reprod.* 2014;29(12):2802–2813. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu277>.
16. Zimmerman RS, Tao X, Marin D, Werner MD, Treff NR et al. Preclinical Validation of a Targeted next Generation Sequencing-Based Comprehensive Chromosome Screening Methodology in Human Blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.* 2018;24(1):37–45. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax060>.
17. Treff NR, Zimmerman R, Bechor E, Hsu J, Melchior Tellier LCA et al. Validation of Concurrent Preimplantation Genetic Testing for Polygenic and Monogenic Disorders, Structural Rearrangements, and Whole and Segmental Chromosome Aneuploidy with a Single Universal Platform. *Eur. J. Med. Genet.* 2019;62(8):103647. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.04.004>.
18. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Lee JJ et al. Second-Generation PLINK: Rising to the Challenge of Larger and Richer Datasets. *GigaScience* 2015;4(1):s13742-015-0047-0048. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>.
19. Kratka C, Vadapalli PS, Mendola R, Garrisi J, Marin D et al. Accurate Detection and Frequency of Abnormal Ploidy in the Human Blastocyst. *FS Sci.* 2023;4(2):27–35. <https://doi.org/10.1016/j.xfss.2023.02.003>.
20. Rana B, Lambrese K, Mendola R, Xu J, Treff NR et al. Identifying Parental and Cell-Division Origins of Aneuploidy in the Human Blastocyst. *Am. J. Hum. Genet.* 2023;110(4):565–574. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.03.003>.
21. Theobald R, SenGupta S, Harper J. The Status of Preimplantation Genetic Testing in the UK and USA. *Hum. Reprod.* 2020;35(4):986–998. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa034>.