

Hiệu quả kết hợp chẩn đoán và sàng lọc di truyền tiền làm tổ trên phôi của bệnh teo cơ tủy

Efficiency of combination between PGT-M and PGT-A for embryos of spinal muscular atrophy disease

Nguyễn Thanh Tùng*,
Nguyễn Thị Thanh Nga**

*Viện Mô Phôi lâm sàng Quân đội,
**Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá hiệu quả kết hợp chẩn đoán và sàng lọc nhiễm sắc thể trên phôi tiền làm tổ của bệnh teo cơ tủy (spinal muscular atrophy – SMA). **Đối tượng và phương pháp:** 11 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con bị bệnh SMA do mất đồng hợp tử exon 7 gen SMNt tham gia làm thụ tinh ống nghiệm. Phương pháp nghiên cứu: Kích thích buồng trứng có kiểm soát, tạo phôi nuôi đến giai đoạn phôi nang. Sinh thiết các tế bào lá nuôi để làm vật liệu di truyền dùng cho chẩn đoán bằng 2 kỹ thuật PCR-RFLP và minisequencing. Phôi không bị bệnh tiến hành sàng lọc bất thường nhiễm sắc thể trên mẫu WGA (whole genome amplification) bằng giải trình tự gen thế hệ mới NGS (next generation genetic sequencing). Phôi không bị mất đồng hợp exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy và bình thường nhiễm sắc thể sẽ được chuyển phôi ở chu kỳ sau đó. **Kết quả:** 49 số phôi nang đủ tiêu chuẩn sinh thiết để thực hiện PGT-M và PGT-A, trong đó có 17 phôi mất đồng hợp tử exon 7 gen SMNt gây bệnh SMA (34,7%), (32 phôi không bị mất exon 7 gen SMNt nên không gây bệnh SMA). 32 phôi không mắc bệnh SMA được làm sàng lọc (PGT-A) có 20 phôi chuẩn bội (62,5%). 10 gia đình được chuyển một phôi bình thường trong chu kỳ chuyển phôi trễ sau đó, 6 phụ nữ chuyển phôi thành công với tỷ lệ thai lâm sàng 60% (6/10), tỷ lệ phôi làm tổ 60% (6/10), 6 em bé sinh ra khỏe mạnh. **Kết luận:** PGT-M kết hợp với PGT-A sẽ chọn lựa phôi khỏe, cải thiện tỷ lệ có thai và sinh ra các bé khỏe mạnh.

Từ khóa: Teo cơ tủy, gen SMN, PCR-RFLP, minisequencing, PGT-M, PGT-A.

Summary

Objective: To evaluate the efficacy of combination between PGT-M and PGT-A in spinal muscular atrophy disease (SMA). **Subject and method:** Eleven couples had had at least one child acquired SMA due to homozygous deletion of exon 7 of SMNt gene, they attended invitro fertilization (IVF). Methods: Controlled ovarian stimulation, embryos were cultured until blastocyst stage. Trophoblast cells were biopsied as genetic material, which used for diagnosis by PCR-RFLP and minisequencing. WGA of blastocysts without SMA was used for PGT-A by NGS. Blastocysts diagnosed as unaffected and euploidy, which were selected for transfer in next cycles. **Result:** 49 blastocysts reached the standard to be biopsied for PGT-M and PGT-A, among those, 17 blastocysts with SMA (34.7%) and 32 blastocysts without SMA (65.3%). 32 unaffected blastocysts continue to be tested by PGT-A, as result 20 euploidy

Ngày nhận bài: 17/9/2021, ngày chấp nhận đăng: 18/10/2021

Người phản hồi: Nguyễn Thanh Tùng, Email: tung_ttcnp@yahoo.com - Viện Mô Phôi lâm sàng Quân đội

blastocysts (62.5%). Ten families had one unaffected blastocyst for transfer in the next frozen-thawed embryos transfer cycle. Six transfers were successful, resulting in a clinical pregnancy rate of 60% (6/10) and an implantation rate of 60% (6/10). Finally, 6 healthy babies were born. *Conclusion:* The combination between PGT-M and PGT-A choose healthy embryos, improve the pregnant rate and create healthy babies.

Keywords: Spinal muscular atrophy (SMA), SMN (survival motor neuron), preimplantation genetic for monogenic disease (PGT-M), preimplantation genetic for aneuploidy (PGT-A), PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism).

1. Đặt vấn đề

Bệnh teo cơ tủy (Spinal Muscular Atrophy - SMA) là bệnh thần kinh cơ đặc trưng bởi sự thoái hoá tuần tiến của các tế bào sừng trước tủy sống, dẫn đến yếu cơ đối xứng gốc chi, trương lực cơ và phản xạ gân xương bị giảm hoặc mất, biến dạng lồng ngực và cứng khớp. Trường hợp nặng bệnh nhi chết trong vòng năm đầu tiên do biến chứng viêm phổi và suy hô hấp. Đây là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, cả bố và mẹ là người lành mang gen bệnh, khi đó khả năng mỗi lần sinh con mắc bệnh là 25%. Tỷ lệ bệnh SMA chung trên toàn thế giới là 1/10.000 trẻ đẻ sống và tỷ lệ người mang gen bệnh dao động 1/50 [1]. Nguyên nhân gây bệnh SMA là do đột biến gen SMNt (survival motor neurone) trên nhiễm sắc thể số 5 [2]. Khoảng 95% các bệnh nhân SMA bị đột biến mất đồng hợp exon 7 gen SMNt, còn 3 - 6% các trường hợp bệnh nhân SMA bị đột biến điểm gen SMNt [3], [4]. Hiện nay, chưa có phương pháp nào chữa được bệnh SMA mà chỉ điều trị triệu chứng là chủ yếu. Do vậy, vấn đề dự phòng bệnh là rất cần thiết. Trong đó, phương pháp chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi là phương pháp dự phòng bệnh hiệu quả nhất bởi có thể chọn được phôi khỏe trước khi cấy phôi vào tử cung của mẹ. Tuy nhiên, phôi tạo ra trong ống nghiệm có tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể, hay gặp ở phụ nữ trên 35 tuổi cũng là nguyên nhân chính làm cho tỷ lệ có thai trong thụ tinh ống nghiệm bị hạn chế [5]. Việc kết hợp chẩn đoán mắc bệnh teo cơ tủy và sàng lọc nhiễm sắc thể trên phôi sẽ cải thiện tỷ lệ phôi làm tổ và thai lâm sàng, rút ngắn thời gian có thai để sinh ra các trẻ khỏe mạnh.

Nghiên cứu này đưa ra mục tiêu: *Đánh giá hiệu quả phối hợp giữa chẩn đoán và sàng lọc di truyền tiền*

làm tổ trên bệnh teo cơ tủy của bệnh nhân thụ tinh trong ống nghiệm.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Gồm 11 cặp vợ chồng mang gen có tiền sử sinh con bị bệnh teo cơ tủy do mất đồng hợp exon 7 gen SMNt có chỉ định làm thụ tinh ống nghiệm được thực hiện tại Viện Mô phôi lâm sàng Quân đội và Khoa Sinh học di truyền, Học viện Quân y.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả hồi cứu.

2.2.2. Kỹ thuật tiến hành

Phác đồ kích thích buồng trứng

Kích thích buồng trứng có kiểm soát sử dụng phác đồ GnRH đối đồng vận bắt đầu ngày 2 của chu kỳ với liều FSH phù hợp với đáp ứng của từng bệnh nhân. Khi có ít nhất hai nang trên 17mm, bệnh nhân sẽ được gây trưởng thành noãn bằng GnRH đồng vận 0,2mg (Dipherelin; Ipsen Pharma). Noãn được chọc hút qua ngả âm đạo sau 35 giờ dùng GnRH đồng vận.

Nuôi cấy và sinh thiết phôi

Sau 16 - 18 giờ thực hiện kỹ thuật ICSI (tiêm tinh trùng vào bào tương noãn), noãn được đánh giá thụ tinh, noãn thụ tinh bình thường được chuyển sang đĩa nuôi mới trong môi trường LP (Life Global) nuôi cấy từ ngày 1 đến ngày 5 trong tủ ấm Cook 37°, CO₂ 6%, O₂ 5%. Đến ngày thứ 5, phôi nang được phân loại dựa trên đánh giá đồng thuận Alpha của Hiệp hội ESHRE 2011 [6].

Sáng ngày 5 khi phôi nang được phân biệt rõ nụ phôi và tế bào lá nuôi thì được đục lỗ thủng màng trong suốt kích thước 7µm đối diện với nụ phôi. Chờ khoảng 4 giờ khi các tế bào lá nuôi thoát qua lỗ thủng màng trong suốt có số lượng 6 đến 7 tế bào thì tiến hành sinh thiết phôi. Các tế bào lá nuôi sau sinh thiết được rửa bằng môi trường PBS1X+ 1%PVP và cho vào tuýp PCR rồi gửi đến labo di truyền.

Phôi nang sau sinh thiết được đông lạnh bằng kỹ thuật thủy tinh hoá theo phương pháp Cryotop của Massashige Kuwayama (2005) [7].

Sau khi chẩn đoán và sàng lọc, phôi không bị bệnh teo cơ tủy và không bất thường nhiễm sắc thể sẽ được chuyển một phôi ở chu kỳ tiếp theo có sử dụng liệu pháp thay thế hormon chuẩn bị niêm mạc tử cung. Bệnh nhân có thai sẽ được hỗ trợ hoàng thể bằng progesteron đủ đến 12 tuần.

Chẩn đoán di truyền đột biến trên tế bào lá nuôi của phôi nang

Tách chiết DNA, khuếch đại toàn bộ gen bằng bộ QLAamp DNA Blood mini kit (Qiagen). Sản phẩm sau khi tiến hành nhân toàn bộ bộ gen làm mẫu để thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP và minisequencing phát hiện đột biến gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy.

Kỹ thuật PCR-RFLP

Trình tự mỗi nhân exon 7 gen SMNt:

F-5'-cttcctttttttcttacagggtt-3'.

R-5'-gtagggatg tagattaaccttttatct-3'.

Chu trình nhiệt: 96°C trong 5 phút; [94°C trong 1 phút, 54°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút] × 35 chu kỳ; 72°C trong 10 phút. Ủ sản phẩm PCR với enzym *Hinfl* để phân biệt exon 7 SMNt với exon 7 SMNc. Điện di gel agarose 3% kiểm tra kết quả.

Kỹ thuật minisequencing

Trình tự mỗi nhân exon 7 gen SMNt

F-5'-agactatcaacttaattctgatca-3'.

R- 5'-caccttccttcttttgattgt-3'.

Chu trình nhiệt: 96°C trong 5 phút; [94°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút] × 35 chu kỳ; 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR thu được dùng làm khuôn để tiến hành phản ứng minisequencing.

Trình tự mỗi minisequencing:

5'-ccttttattttccttacagggtt-3'

Chu trình nhiệt: [96°C trong 10 giây, 54°C trong 5 giây, 60°C trong 30 giây] × 25 chu kỳ. Sản phẩm thu được thêm vào 1 đơn vị enzyme rSAP, ủ theo chu trình nhiệt: 37°C trong 1 giờ và 75°C trong 15 phút. Điện di mao quản kiểm tra sản phẩm chạy minisequencing.

Sàng lọc di truyền bất thường nhiễm sắc thể

Phôi được chẩn đoán không mắc bệnh teo cơ tủy sẽ được sàng lọc di truyền bất thường nhiễm sắc thể thực hiện qua các bước chuẩn bị, giải trình tự trên máy Ion Torrent của hãng Thermo. Kỹ thuật này có thể phát hiện các bất thường liên quan tới cấu trúc nhiễm sắc thể với kích thước lớn 0,1Mb.

3. Kết quả

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng và labo bệnh nhân đột biến gen SMNt

Chỉ tiêu	$\bar{X} \pm SD$
Tuổi trung bình của 11 bệnh nhân	31,36 ± 3,38 Max: 36; Min: 26
AMH (ng)	2,98 ± 0,94 max: 4,4; min: 1,3
Số phôi ngày 3 trung bình	8,09 ± 2,51 max: 13; min: 5
Số phôi nang tạo được trung bình	5,18 ± 1,89 max: 8; min: 3
Tỷ lệ hình thành phôi nang (số phôi nang/số phôi ngày 3)	57/89 (64,04%)
Số phôi nang đủ điều kiện sinh thiết (49 phôi)	4,45 ± 1,75 max: 7; min: 2

Kết quả Bảng 1 cho thấy 11 bệnh nhân có độ tuổi trung bình 31,36 ± 3,38. AMH trung bình 2,98 ± 0,94ng. Tổng số phôi ngày 3 tạo được 89, số phôi nang tạo được 57 phôi, tỷ lệ hình thành phôi nang là 64,04%. Số phôi nang đủ điều kiện sinh thiết là 49 phôi, trung bình mỗi bệnh nhân có 4,45 ± 1,75, bệnh nhân có số phôi nang nhiều nhất để sinh thiết là 7 phôi, ít nhất là 2 phôi.

Bảng 2. Kết quả chẩn đoán và sàng lọc di truyền phôi bệnh nhân đột biến gen SMNt

Chỉ tiêu	Tỷ lệ %
Số phôi không mắc bệnh teo cơ tủy	32/49 (65,3%)
Số phôi mắc bệnh teo cơ tủy	17/49 (34,7%)
Số phôi chuẩn bội	20/32 (62,5%)
Số phôi lệch bội	9/32 (28,1%)
Số phôi thể khảm	3/32 (9,4%)
Số phôi trung bình không mắc bệnh SMA và nhiễm sắc thể bình thường	$1,73 \pm 0,65$ max: 2; min: 0

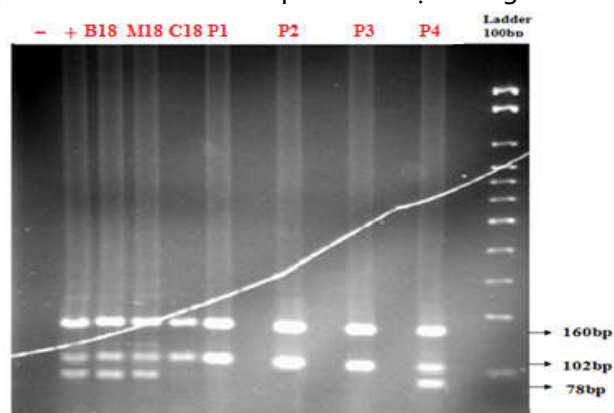
Bảng 2 cho thấy trong số 49 phôi nang đủ tiêu chuẩn sinh thiết phôi, có 32 phôi không mắc bệnh SMA với tỷ lệ 65,3%, 17 phôi mắc bệnh SMA với tỉ lệ 34,7%. 32 phôi không mắc bệnh SMA tiếp tục thực hiện kỹ thuật PGS bằng kỹ thuật NGS thì có 20 phôi chuẩn bội (62,5%), 9 phôi lệch bội (28,1%) và 3 phôi thể khảm (9,4%). Số phôi trung bình không mắc bệnh SMA và nhiễm sắc thể bình thường là $1,73 \pm 0,65$.

Bảng 3. Kết quả lâm sàng sau khi chuyển phôi được chẩn đoán và sàng lọc di truyền

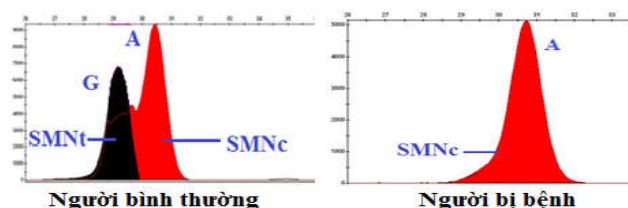
Chỉ tiêu	$\bar{X} \pm SD$
Tỷ lệ phôi nang sống sau rã đông	10/10 (100%)
Tỷ lệ có thai	7/10 (70%)
Tỷ lệ thai sinh hóa	1/10 (10%)
Tỷ lệ thai diễn tiến	6/10 (60%)
Tỷ lệ phôi làm tổ	6/10 (60%)
Tỷ lệ trẻ sinh sống	6/10 (60%)

Trong 11 bệnh nhân tham gia tạo phôi ống nghiệm thì có 1 bệnh nhân có 2 phôi không mắc bệnh SMA nhưng bất thường nhiễm sắc thể cả 2 phôi nên không tham gia chuyển phôi. 10 bệnh nhân đủ điều kiện để chuyển 1 phôi trong chu kỳ chuyển phôi đông lạnh, có 6 bệnh nhân có thai lâm sàng và thai diễn tiến (60%), 1 bệnh nhân thai sinh hóa (10%). Tỷ lệ phôi làm tổ 60%, 6 bệnh nhân sinh được 6 bé khỏe mạnh.

Ví dụ minh họa phát hiện đột biến gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy bằng kỹ thuật PCR-RFLP từ sản phẩm nhân WGA của 4 phôi thể hiện trong Hình 1.

**Hình 1.** Kết quả điện di trên gel 3% sản phẩm nhân exon 7-SMNt sau khi dùng enzyme *HinfI* cắt giới hạn trên mẫu tế bào phôi sinh thiết của gia đình SMA18.

Theo như trên Hình 1, (-): Mẫu chứng không có ADN; (+): Mẫu đối chứng là người không bị bệnh (đối chứng dương); B18: Bố bệnh nhân SMA18, M18: Mẹ bệnh nhân SMA18; C18: Bệnh nhân SMA18; P1: Phôi 1; P2: Phôi 2; P3: Phôi 3; P4: phôi 4. Trong 4 phôi có phôi 1, phôi 2, phôi 3 chỉ có hai băng tương ứng kích thước 160bp và 102bp của exon 7 gen SMNc, nghĩa là ba phôi đó bị mất đồng hợp exon 7 gen SMNt nên sẽ bị bệnh SMA, còn phôi 4 có xuất hiện 3 băng nên có mặt exon 7 gen SMNt, do đó phôi sẽ phát triển bình thường, không bị bệnh SMA. Vì vậy, chỉ có phôi 4 đủ tiêu chuẩn để tiếp tục sàng lọc bất thường nhiễm sắc thể.

**Hình 2.** Hình minh họa kết quả điện di mao quản sản phẩm nhân exon 7 gen SMNt của kỹ thuật minisequencing

Ở vị trí nucleotid 214 trên exon 7 SMNt là C, còn exon 7 SMNc là T vì vậy, với kỹ thuật minisequencing, người bình thường sẽ xuất hiện hai đỉnh tương ứng G của exon 7 SMNt và A của exon 7 SMNc, người bị bệnh teo cơ tủy do mất đồng hợp exon 7 SMNt chỉ có một đỉnh tương ứng A của exon 7 gen SMNc.

4. Bàn luận

Các nhà khoa học khẳng định đột biến gen SMNt là nguyên nhân chính gây nên bệnh SMA. Nghiên cứu của Wirth kết luận rằng đột biến mất đoạn SMNt chiếm đa số ở bệnh nhân SMA, tác giả cũng cho rằng đột biến SMNc không liên quan chặt chẽ đến bệnh SMA vì 26% người bình thường trong quần thể nghiên cứu thiếu cả 2 bản sao của gen SMNc [8]. Ngoài ra, nghiên cứu cũng cho thấy đột biến mất đoạn exon 7 của SMN1 đóng vai trò chính trong cơ chế gây bệnh SMA trong khi vai trò của exon 8 là thứ yếu. Mất đoạn đồng hợp exon 7 gen SMNt thường gây kiểu hình. Bệnh nhân SMA thể I đều bị đột biến mất cả exon 7 và 8, trong khi đó có 5 - 6% bệnh nhân SMA thể II bị đột biến mất exon 7 nhưng exon 8 hoàn toàn bình thường [9], [10]. Hiện nay phương pháp RFLP vẫn được nhiều tác giả sử dụng để chẩn đoán vì tính ổn định, dễ thực hiện và giá thành không cao so với phương pháp khác. Tác dụng của các enzyme cắt giới hạn rất đặc hiệu nên phương pháp này cho kết quả âm tính giả rất thấp. Để khảo sát exon 7 của gen SMN chúng tôi sử dụng enzym *HinfI* có tác dụng cắt tại hai vị trí trên gen SMNt và 1 vị trí trên gen SMNc để phân biệt exon 7 SMNt với exon 7 SMNc. Trên gen SMNc, enzym *HinfI* cắt sản phẩm PCR của SMNc thành hai đoạn 160bp và 102bp, trên gen SMNt, enzym *HinfI* cắt thành 3 đoạn 160bp, 78bp và 24bp. Tuy nhiên vạch 24bp có kích thước nhỏ sẽ không quan sát được trên điện di agarose 3%. Trên phôi bị đột biến mất đoạn exon 7 của gen SMNt thì kết quả điện di chỉ xuất hiện 2 vạch của gen SMNc, thiếu 1 vạch của gen SMNt (Hình 1). Do bệnh SMA chỉ biểu hiện khi mất đoạn exon 7 nên chúng tôi chỉ thiết kế đoạn mỗi nhân được đoạn gen SMN có exon 7. Để khẳng định chắc chắn phôi không bị mất đồng hợp tử exon 7 gen SMNt gây bệnh teo cơ tủy, chúng tôi sử dụng kết hợp đồng thời kỹ thuật PCR-RFLP với kỹ thuật minisequencing để nhân gen với yêu cầu kết quả của hai kỹ thuật này phải trùng nhau mới đưa ra kết luận chẩn đoán.

Trong giai đoạn sớm phát triển của phôi, những bất thường nhiễm sắc thể (phôi lệch bội) sẽ dẫn đến dừng phát triển, thất bại làm tổ, sảy thai liên tiếp

[11]. Phôi lệch bội là yếu tố chính ảnh hưởng đến tỷ lệ thành công của thụ tinh trong ống nghiệm (IVF), nó có nguồn gốc từ lỗi của phân bào giảm nhiễm hoặc ngay sau khi hình thành hợp tử. Tuổi người mẹ tăng lên là nguyên nhân hàng đầu của hầu hết lỗi phân bào giảm nhiễm xảy ra trong quá trình hình thành noãn. Những đóng góp khác gây ra phôi lệch bội đó là lỗi nảy sinh sau thụ tinh do lỗi nguyên phân. Bất thường nhiễm sắc thể do lỗi nguyên phân này có tần suất cao hơn do lỗi phân bào giảm nhiễm [12]. Giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) được áp dụng trong nghiên cứu của chúng tôi có độ phân giải và độ nhạy cao giúp cho việc sàng lọc phôi sẽ chính xác. Trong 32 phôi nang được sàng lọc thì có 12 phôi lệch bội và thể khảm (37,5%), 11 bệnh nhân tham gia làm PGT-M và PGT-A có độ tuổi trung bình $31,36 \pm 3,38$, duy nhất có 1 bệnh nhân trên 35 tuổi, tương tự như kết quả nghiên cứu của Ata B và cộng sự (2012) tỷ lệ phôi lệch bội 30 - 40% trên phụ nữ dưới 35 tuổi [5]. Rõ ràng rằng nhờ việc sàng lọc nhiễm sắc thể trên phôi, giúp cho việc lựa chọn phôi có tiềm năng làm tổ sau khi đã được chẩn đoán không mắc bệnh SMA sẽ rút ngắn thời gian có thai và giảm chi phí do không phải chuyển phôi đông lạnh nhiều lần. Cho nên ngay lần chuyển phôi chu kỳ tiếp theo sau chu kỳ chọc trứng, trong 10 phụ nữ thì có 6 phụ nữ có thai lâm sàng và sinh ra 6 em bé khỏe mạnh.

5. Kết luận

Bệnh nhân có tiền sử sinh con mắc bệnh SMA do mất đồng hợp tử exon 7 gen SMNt, biện pháp dự phòng tốt nhất là thực hiện thụ tinh ống nghiệm thực hiện kỹ thuật PGT-M kết hợp với PGT-A sẽ giúp cải thiện tỷ lệ có thai nhanh và sinh ra các bé khỏe mạnh.

Tài liệu tham khảo

1. Meiki J, Abdelhak S, Sheth P et al (1994) *De Novo and inherited deletion of the 5q13 region in spinal muscular atrophies*. Science 264(5164): 1474-1477.
2. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH et al (1990) *Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3*. Nature 334(6266): 540-541.

3. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S et al (1995) *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy determining gene*. Cell 80(1): 155-165.
4. Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K (2003) *Determination of SMN 1 and SMN 2 copy number using Tag Man technology*. Hum Mut 22: 74-78.
5. Ata B, Kaplan B, Danzer H et al (2012) *Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated*. Reprod BioMed Online 24: 614-620.
6. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryo (2011) *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment proceedings of an expert meeting*. Human Reproduction 26(6): 1270-1283.
7. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O (2005) *Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination*. Reprod Biomed Online 11: 608-614.
8. Wirth B (2000) *An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)*. Hum Mut 15: 228-237.
9. Cobben JM, Van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH (1995) *Deletions of survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy*. Am J Hum Genet 57(4): 805-808.
10. Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Patel S, Muntoni F, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE (1996) *Gen deletion in spinal muscular atrophy*. J Med Genet 33(2): 93-96.
11. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S et al (2012) *Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos*. Fertil Steril 98: 675-680.
12. Delhanty Joy DA (2013) *The origins of genetic variation between individual human oocytes and embryos: Implications for fertility*. Hum Fertil 16: 241-245.