



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**AVANCES EN EL CRIBADO GENÉTICO
EN DONANTES DE GAMETOS**

Marta Molina Romero

Granada, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Marta Molina Romero
ISBN: 978-84-1117-230-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72878>

Agradecimientos

Siempre recordaré aquel consejo que mis padres me dieron el día en que debía decidir qué carrera elegir: “Estudia y trabaja en algo que realmente te apasione y que disfrutes, solo así podrás dar lo mejor de ti a la gente que te rodea y recibirás de ellos esa misma energía, solo así podrás ser realmente feliz”. Y aquí estoy, disfrutando de la biología, de la célula, de la genética, de la reproducción asistida, de mis grandes compañeros y de los maravillosos pacientes, feliz con cada uno de los conocimientos que adquiero cada día y con todo lo que me queda por ofrecer y recibir. Gracias a cada uno de los que han formado parte de este maravilloso camino.

Principalmente al Dr. José Antonio Castilla por la confianza depositada en mí y su eterna paciencia. Por brindarme la oportunidad de desarrollar y disfrutar la tesis doctoral bajo su dirección. Por compartir todos sus conocimientos y por buscar siempre una solución. Por las críticas, siempre constructivas, y por el constante apoyo recibido en los buenos, y en los no tan buenos, momentos. Me siento realmente afortunada de poder compartir con él este proyecto, entre otros. Gracias por ayudarme a crecer, personal y profesionalmente.

Al Dr. Juan Pablo Ramírez, por darme la oportunidad de desarrollar mis conocimientos de genética e iniciarme en el ámbito de la reproducción humana asistida. Por demostrar que merece la pena ser diferente y esforzarse por ofrecer un servicio de calidad y enseñarnos a dar lo mejor de nosotros. Ha sido un regalo haber aprendido y trabajado a su lado.

A todos mis compañeros, Alberto Y., Ángel, Miguel, Ángela, Mayte, Lucre, David R., Elo, Amelias, Miguel, Jose, David C., Merche, Sandra, Alberto G.,

Carmen, M^a Cruz y en especial a Sonia, por vuestra infinita paciencia, por vuestro apoyo y por vuestra sonrisa. Por ser un gran equipo que todo lo hace posible.

En especial a Puri, compañera y amiga, por enseñarme la embriología con tanto cariño. Gracias por escucharme, por ofrecerme tu tiempo siempre que lo he necesitado. Y sin duda, por aconsejarme y guiarme con la burocracia que conlleva el depósito y defensa de una tesis doctoral.

A Jose Luis, gracias por estar siempre disponible para brindarme tu ayuda de forma desinteresada. Por compartir conmigo tus conocimientos, que han hecho que este proyecto pueda brillar aún más.

A los centros de reproducción asistida y a todos sus profesionales, por compartir los casos clínicos y sus consultas, por despertar en mí el interés y hacerme ver las necesidades que nacen de nuestro trabajo y por las que merece la pena trabajar para mejorar.

A mis compañeros de residencia del HU de La Princesa, Anita, Nati y Juanfran, porque gracias a vosotros la residencia fue una experiencia maravillosa. Por enseñarme que, con esfuerzo, entrega y, sobre todo, humildad, los sueños se pueden conseguir. Porque a pesar de la distancia y el tiempo, siempre estáis ahí.

A mis amigas y amigos, a los que tengo cerca y a los que estáis lejos, a los que estuvisteis y a los que seguís estando, a los de siempre y a los nuevos, gracias por vuestro tiempo, por vuestras sonrisas, por los viajes, por las rutas, por cuidar mis cactus, por estar para brindar en los buenos momentos y por la escucha y consejos en las adversidades.

A mis hermanas, Carmen, Paula, Ana y Mónica, porque es una suerte teneros y que seáis, además de hermanas, las mejores amigas que puedo tener, por no juzgarme y aceptarme, por estar siempre ahí. Gracias por existir y por darnos a las personas más bonitas de este mundo, Fran y Marcos.

A mis padres, Paco y Luisa, mis incondicionales, os elegiría una y otra vez. Por vuestra entrega y sacrificio, por vuestra comprensión y cariño, por apoyarme en mis proyectos y enseñarme a ser mejor persona y autodependiente. Por ser mis referentes de esfuerzo, bondad, humildad y respeto. Por vuestros abrazos, vuestros “te quiero”, vuestras miradas, por vuestras palabras y vuestros silencios, por vuestro amor desinteresado y sin límites: GRACIAS.

A mis padres

*“La medicina es la ciencia de
la incertidumbre y el arte
de la probabilidad.”*

(William Osler)

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en la siguiente revista científica:

- Molina M, Yoldi A, Navas P, Gañán M, Vaquero Á, del Pico JL, et al. Carriers of cystic fibrosis among sperm donors: complete CFTR gene analysis versus CFTR genotyping. *Fertil Steril*. 2020;114:524–34

Y han sido presentados en las siguientes reuniones y congresos de sociedades científicas nacionales:

- II Congreso Interdisciplinar de Genética Humana. Madrid, España. 2019.
- XIII Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Sevilla, España. 2019.
- X Congreso Nacional de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Cáceres, España. 2019.
- IV Reunión de la Escuela Granadina de Reproducción y Embriología (ESGRE). Granada, España. 2019.
- 36th Virtual annual meeting of ESHRE. 2020.
- 37th Virtual annual meeting of ESHRE. 2021.
- XV Foro de LA CALAHORRA 2021. Granada, España. 2021.
- III Congreso Interdisciplinar de Genética Humana. Valencia, España. 2021.
- XIV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Online. 2021.
- XI Congreso Nacional de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). Toledo, España. 2021.

- 33º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad. Bilbao, España. 2022.

GLOSARIO

A	Adenina
ACBVD	Ausencia bilateral congénita de conductos deferentes
ACMG	Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (American College of Medical Genetics)
ACOG	Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (American College of Obstetricians and Gynecologist)
AMP	Asociación de Patología Médica (Association of Medical Pathology, AMP)
B	Benigna
CC	Variante causante de FQ
CDG	Candidatos a donantes de gametos
CDO	Candidatas a donantes de ovocitos
CDS	Candidatos a donantes de semen
CFTR-RD	Trastornos Relacionados con CFTR (CFTR Related disorder)
CMV	Citomegalovirus
CNRHA	Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida
CNVs	Variación en el número de copias (Copy number variations)
CRMS	Síndrome metabólico relacionado con CFTR (CFTR-related metabolic síndrome)
dbSNP	The Single Nucleotide Polymorphism Database
DG	Donantes de gametos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Donantes de ovocitos
DS	Donantes de semen
E	Elucigen
ECA	Asociación europea de citogenetistas (European Cytogeneticists Association)
ENaC	Canales de sodio epiteliales
ESHG	Sociedad europea de genética humana

	(European Society of Human Genetics)
ESHRE	Sociedad europea de reproducción humana y embriología (European Society of Human Reproduction and Embryology)
FQ	Fibrosis quística
H	Heres
HB	Hepatitis B
Hg19	Homo sapiens (human) genome assembly GRCh37
HGMDB	The Human Gene Mutation Database
HGVS	Sociedad de variantes en el genoma humano (Human Genome Variation Society)
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HTLV	Human T-lymphotropic virus
I	Igenomix
ISCN	Sistema internacional para la nomenclatura de citogenética humana (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)
IS-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de desplazamiento inverso (Inverse Polymerase PCR)
IVF/ICSI	Fecundación in vitro/Inseminación intracitoplasmática de espermatozoides (In vitro fertilisation/Intracytoplasmic Sperm Injection)
kDa	Kilodalton
LB	Probablemente benigna (Likely Benign)
LP	Probablemente patogénica (Likely Pathogenic)
N/S	Variante no descrita en ClinVar
NA	No descrita (Not available)
NCC	Variante no causante de FQ
NGS	Secuenciación masiva (Next Generation Sequencing)
P	Patogénica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PHA	Fitohemaglutinina

PQF	Fundación de calidad perinatal (Perinatal Quality Foundation)
qC+	qCarrier Plus
RFA	Recuento de folículos antrales
RHA	Reproducción humana asistida
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RPR	Rapid plasma reagin
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SG	Sistemas Genómicos
SIRHA	Sistema de Información de Reproducción Humana Asistida
SMFM	Sociedad de medicina materno fetal (Society for Maternal-Fetal Medicine)
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido (Single-nucleotide polymorphism)
SNV	Variantes de un solo nucleótido (Single Nucleotide Variants)
SUE	Variante bajo evaluación clínica
SXF	Síndrome del X frágil
TPHA	Treponema pallidum Haemagglutination
TP-PCR	Triplet repeat Primed-PCR
TRA	Tratamientos de reproducción asistida
VC	Variante asociada a clínica relacionada con FQ
VEB	Virus de Epstein Barr
VHC	Virus de la hepatitis C
VUS	Variantes de significado incierto (Variants of Unknown Significance)
WHO	Organización mundial de la salud (World Health Organization)

Índice

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción	3
2. Hipótesis.....	8
3. Justificación	8
4. Objetivos	10
5. Materiales y métodos	11
6. Resultados	13
7. Discusión	15
8. Conclusiones.....	18
Introducción.....	21
1. Técnicas de reproducción asistida con donación de gametos.....	23
2. Regulación de la donación de gametos.....	24
2.1 Regulación legislativa española.....	24
3. Conceptos básicos de genética	27
4. Tipos de variantes o mutaciones.....	34
4.1 Alteraciones genéticas	34
4.1.1 Mutaciones puntuales (SNPs)	34
4.1.2 Inserciones y deleciones (Indels).....	36
4.1.3 Mutaciones dinámicas (expansión de tripletes)	37
4.2 Alteraciones cromosómicas	38
4.2.1 Alteraciones cromosómicas numéricas.....	39
4.2.2 Alteraciones cromosómicas estructurales	40
5. Patrones de herencia genética.....	44
5.1 Herencia monogénica	46
5.1.2 Herencia autosómica.....	46
5.1.3 Herencia ligada al cromosoma X.....	48
5.2 Herencia multifactorial.....	50
5.3 Otros tipos de herencia.....	51
5.3.1 Mitocondrial.....	51
5.3.2 Epigenética	51
5.3.3 Disomía uniparental	51
6. Evolución de las técnicas de secuenciación de DNA.....	52
7. Secuenciación masiva (NGS)	54
7.1 Clasificación de variantes genéticas.....	54

8.	Paneles de portadores	55
8.1	Test de genotipado.....	56
8.2	Test de secuenciación de gen completo o análisis no dirigido de variantes	56
8.3	Recomendaciones del cribado de portadores según las sociedades científicas.....	57
9.	Matching genético.....	62
10.	Fibrosis quística.....	65
11.	Síndrome X-Frágil (SXF)	74
12.	Cariotipo.....	76
13.	Motivos de exclusión de donantes según el riesgo reproductivo.....	77
14.	Asesoramiento genético a pacientes y donantes	79
	Hipótesis.....	86
1.	Hipótesis.....	88
	Justificación y Objetivos	89
1.	Justificación	91
2.	Objetivos	92
	Materiales y Métodos	95
1.	Población.....	97
2.	Proceso de selección en el programa de donación (Figura 1):	97
2.1	Entrevista informativa e historia clínica.....	97
2.2	Análisis de semen.....	99
2.3	Revisión ginecológica y recuento de folículos antrales.....	101
3.	Análisis genético en donantes de gametos.....	101
3.1	Cariotipo.....	102
3.1.1	Clasificación de variantes halladas en el cariotipo.....	102
3.2	Test de portadores mediante NGS.....	103
3.2.1	Interpretación de variantes halladas mediante NGS	105
4.	Análisis de variantes.....	108
5.	Análisis de los test ampliados de portadores mediante genotipado.....	109
6.	Matching genético.....	111
7.	Sensibilidad diagnóstica y sensibilidad clínica	112
8.	Análisis estadístico	114
	Resultados	115
1.	Análisis de variantes halladas en el cariotipo	116
1.1	Alteraciones cromosómicas	116
1.2	Variantes polimórficas.....	117

2. Análisis de variantes y de la frecuencia de portadores de donantes de gametos mediante el test qCarrier Plus.	119
3. Rendimiento de los test de genotipado.	123
4. Análisis de la clasificación de variantes patogénicas.	127
5. Análisis de variantes en el gen CFTR	128
6. Análisis de matching genético y probabilidad de embriones afectados con doble donación de gametos.	133
Discusión	135
Conclusiones	153
Bibliografía	157
Anexo I.	175
Tabla suplementaria 1.	181
Tabla suplementaria 2.	189
Tabla suplementaria 3.	211
Bibliografía Tabla suplementaria 2 y 3.	215

Resumen

1. Introducción

En los países desarrollados la necesidad de recurrir a técnicas de reproducción asistida con donación de gametos va en aumento debido principalmente al retraso en el deseo reproductivo. Con el aumento de la edad de la mujer existe una disminución de la reserva ovárica y de la calidad ovocitaria, lo que conlleva una menor capacidad reproductiva y un aumento del riesgo de aborto y alteraciones fetales. De tal forma que en Europa los tratamientos de reproducción asistida con ovocitos de donante han aumentado significativamente en los últimos 5 años, especialmente ayudado por los avances en la vitrificación ovocitaria (Gliozheni et al., 2016; Wyns et al., 2020).

Por otro lado, en los países desarrollados también se observa una mayor necesidad del uso de semen de donante debido principalmente al aumento de mujeres con deseo de maternidad en solitario y al deseo reproductivo de parejas de mujeres.

La donación de gametos en España y en Europa es por tanto una necesidad cada vez mayor. En base al Real Decreto-Ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, y según la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) (Castilla et al., 2020) y la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA, 2021) se establecen una serie de recomendaciones y criterios para evaluar el riesgo de transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia en tratamientos de reproducción asistida con donantes de gametos, con la intención de aceptar donantes de bajo riesgo reproductivo. Para ello se incluye la realización de un

cariotipo en sangre periférica, la recogida de la historia clínica personal y familiar y el estudio de enfermedades de herencia recesiva.

En relación con la realización del cariotipo, son diferentes sociedades científicas las que recomiendan, en mayor o menor medida, la realización de cariotipo a donantes de gametos (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology, 2013; Clarke et al., 2019; EDQM, 2019; Health Canada Directive, 2019; Castilla et al., 2020). Sin embargo, la prevalencia descrita de alteraciones cromosómicas en esta población es muy diferente según los autores, habiéndose descrito en donantes de semen una frecuencia en torno a un 0.6% (Siffroi et al., 2004) y en donantes de ovocitos entre un 0.7% y un 11.7% (Siffroi et al., 2004; Ravel et al., 2007). Ninguna de estas guidelines establece cómo interpretar los resultados obtenidos, pues es discutida la repercusión de determinadas alteraciones cromosómicas, como los polimorfismos cromosómicos, en la capacidad reproductiva (Tempest y Simpson, 2017; Hastings et al., 2007; Cheng et al., 2017; Akbas et al., 2012).

En cuanto a las enfermedades de herencia recesiva, se debe evaluar la carga genética en relación a la existencia de genes autosómicos recesivos de acuerdo al conocimiento científico y a la prevalencia conocida en la etnia del donante. Actualmente, la evaluación genética de este tipo de enfermedades se realiza mediante test de portadores ampliados o universales.

Los test de portadores evalúan un número determinado de genes, asociados a enfermedades de herencia recesiva, tanto autosómicos como

ligados al cromosoma X, lo que nos permite conocer el estado de portador para las enfermedades que han sido incluidas en el panel.

Existen principalmente dos tipos de test de portadores en el mercado, que se diferencian en la forma en la que analizan los datos o variantes de los genes incluidos en cada panel:

- Test de genotipado: independientemente de la técnica que utilicen para secuenciar el DNA, realizan un análisis dirigido de variantes. Es decir, las variantes genéticas que pueden ser detectadas son establecidas previamente al análisis molecular. Así, el resultado que podemos obtener en los test de genotipado son la presencia o ausencia de aquellas variantes que han sido definidas con anterioridad al análisis de la muestra.

En la actualidad, son varios los paneles de genotipado que se usan en el ámbito de la reproducción humana asistida. Cabe destacar que estos paneles de genotipado son diversos, en cuanto al número y tipo de genes que analiza y respecto al número y tipo de variantes que incluyen (Lazarin et al., 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020; Molly et al., 2021).

- Test de secuenciación de gen completo y análisis no dirigido de variantes (Test NGS): A diferencia del anterior no define previamente qué variantes de interés quiere detectar, sino que analiza todas las variantes encontradas en el proceso de secuenciación de gen completo (regiones codificantes) e informan de todas aquellas variantes que tienen un

potencial papel patogénico (variantes clasificadas como patogénicas y/o probablemente patogénicas). Debido a que realiza un análisis no dirigido de variantes, esta técnica presenta mayor capacidad de detectar individuos portadores que los paneles de genotipado (Lazarin et al., 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020).

El desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación masiva ha permitido elaborar paneles de portadores ampliados de aplicación universal para todos los donantes de gametos, independientemente a su origen étnico, a coste y tiempo razonables (Arjunan et al., 2016; Azimi et al., 2016; Nazareth et al., 2015; Prior et al., 2014). A pesar de los avances en las técnicas de análisis genético, actualmente no existe un consenso que determine cuáles son las enfermedades que se deben incluir en los test de portadores aplicados a donantes de gametos, ni la forma en que se deben analizar dichos genes, si mediante genotipado o mediante análisis completo de los genes (Castilla et al., 2020).

Los test de portadores informan del estatus de portador/no portador de determinadas enfermedades genéticas, lo que nos permite evaluar el riesgo reproductivo para las enfermedades incluidas en los test. El proceso mediante el que se compara la información genética de ambos progenitores y se establece el riesgo reproductivo se conoce como matching genético. La exactitud y precisión del emparejamiento genético, va a depender de los genes analizados y de las variantes patogénicas estudiadas en cada gen.

La elevada heterogeneidad de los paneles disponibles en el mercado implica que exista una alta heterogeneidad de los riesgos reproductivos dependiendo del panel que apliquemos (Lazarin et al., 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020; Molly et al., 2021). Así se demuestra en diferentes estudios en los que la probabilidad de matching genético de alto riesgo presenta grandes variaciones oscilando entre 3-16% (Molina et al., 2020; Martin et al., 2015; Punj et al., 2018).

Por ello, es fundamental determinar la influencia que tiene la elección de un determinado test de portadores en el cálculo de los riesgos reproductivos y transmitir esta información a las parejas que comienzan tratamientos de reproducción asistida, especialmente cuando recurren a gametos de donante.

La situación planteada anteriormente es especialmente importante en el caso del gen CFTR, asociado a la fibrosis quística, debido a que se trata de una enfermedad con elevada heterogeneidad clínica y genética.

Existe una amplia variedad de paneles de mutaciones del gen CFTR, que estudian un número limitado de variantes, teóricamente establecidas según la frecuencia poblacional y asociadas a fenotipo grave. Dada la gran diversidad de variantes descritas en el gen CFTR, la detección de individuos portadores de fibrosis quística utilizando estos paneles dirigidos es limitada. Esta limitación es especialmente aparente en subpoblaciones como la hispánica, en la que las mutaciones no están bien caracterizadas a pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho (Kammesheidt et al., 2006).

Dada a la alta prevalencia de fibrosis quística, todas las sociedades científicas recomiendan el cribado de esta enfermedad en donantes de semen (Charles et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de ellas no especifica de forma detallada qué variantes deben ser incluidas en el estudio y cuáles no, si el screening debe ir dirigido hacia una forma clínica determinada o a todo el espectro de síntomas clínicos asociados a fibrosis quística o si el gen CFTR debe estudiarse por secuenciación completa del gen o bien si debe analizarse mediante genotipado.

2. Hipótesis

El cribado genético de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos, especialmente de fibrosis quística, tiene la misma seguridad reproductiva si se realiza con secuenciación completa del gen (NGS) o con análisis dirigido de variantes (genotipado).

Los diferentes test de genotipado utilizados como test de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos en el ámbito de reproducción humana asistida en España presenta alta homogeneidad en cuanto a las variantes analizadas en genes comunes.

3. Justificación

El problema al que nos enfrentamos es que el avance tecnológico y el avance en el conocimiento científico no van acompañados de una actualización en la legislación que regula estos procesos y en muchas ocasiones tampoco en las recomendaciones de práctica clínica publicadas por diferentes sociedades

científicas. En el caso del cribado genético en donantes de gametos no existen criterios claramente establecidos de cómo se debe proceder y, como consecuencia, no hay unanimidad en los criterios y en los test genéticos que se aplican en los diferentes bancos de gametos, ni en los test de cribado de portadores que elaboran diferentes compañías genéticas.

La heterogeneidad existente en los criterios y test utilizados para el cribado genético de donantes puede repercutir de forma directa sobre los riesgos reproductivos, incluso cuando los pacientes recurren a tratamientos con donantes de gametos seleccionados mediante matching genético, proceso actualmente recomendado por varias sociedades científicas.

Cabe hacer hincapié en la fibrosis quística, debido a que su estudio en donantes de gametos es recomendado por la mayoría de las sociedades científicas, nacionales e internacionales, y a que presenta una alta variabilidad genotípica y fenotípica. Estos dos factores dificultan especialmente la interpretación de los datos genéticos obtenidos en el cribado de portadores de esta enfermedad.

Existen recomendaciones generales en relación a la elaboración de estos test de portadores, pero se desconoce su rendimiento y la repercusión que puede suponer la aplicación de cada uno de ellos en los tratamientos de reproducción asistida con gametos donados. Por ello, resulta fundamental analizar, estudiar y evaluar los diferentes test genéticos disponibles en el mercado y que son generalmente utilizados, tanto en España como en el extranjero, para el cribado de portadores en donantes de gametos.

4. Objetivos

1. Analizar la frecuencia de portadores de alteraciones y polimorfismos cromosómicos en donantes de gametos.
2. Determinar la frecuencia de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos que han sido analizados mediante secuenciación completa de los genes y comparar los resultados con los que se habrían obtenido si se hubieran aplicado los 3 test de genotipado que se usan comúnmente como cribado de portadores en los diferentes bancos de gametos en España.
3. Determinar la frecuencia de portadores de fibrosis quística en donantes de gametos en España cuando son analizados mediante secuenciación completa del gen CFTR y comparar los resultados con los que se habrían obtenido si se hubieran aplicado los 4 test de genotipado de CFTR que son ampliamente utilizados en los diferentes bancos de gametos en España.
4. Determinar la probabilidad de matching de alto riesgo en tratamientos de reproducción asistida que utilizan doble donación de gametos cuando se aplican los test de portadores de enfermedades recesivas mediante secuenciación completa del gen y estimar la probabilidad de matching de alto riesgo que se hubiera obtenido aplicando los test de genotipado.

5. Materiales y métodos

Entre enero de 2017 y agosto de 2020, 5879 personas interesadas en la donación de gametos, con edad comprendida entre 18 y 35 años, se incluyen en un proceso de selección en el programa de donación, que consta de tres fases secuenciales: en primer lugar, se realiza una entrevista informativa; en segundo lugar, se realiza la recogida de la historia clínica personal y familiar y la evaluación psicológica; y en tercer lugar, se realiza la exploración física y análisis de semen o ecografía vaginal, en varones o mujeres, respectivamente.

Se lleva a cabo la entrevista informativa en 5879 individuos interesados en la donación de gametos, 4125 candidatos a donantes de semen (CDS) y 1754 candidatas a donantes de ovocitos (CDO).

A los candidatos que aceptan las condiciones en la entrevista informativa previa se les realiza la recogida de la historia clínica personal y familiar, en la que se incluye información clínica de 4 generaciones familiares, lo que nos permite sospechar la presencia de enfermedades con herencia dominante, alteraciones familiares en el cariotipo o enfermedades multifactoriales que presenten un patrón de agregación familiar y que pudieran conllevar un aumento del riesgo reproductivo, con respecto al riesgo poblacional, para la descendencia.

Finalmente, son 2941 varones los que continúan en el proceso y se les realiza un análisis de semen. Todas las muestras de semen fueron obtenidas en el banco de gametos mediante masturbación tras 3-5 días de abstinencia sexual.

Son aceptados los candidatos cuyos parámetros seminales cumplen los criterios de calidad seminal mínimos establecidos por el banco de gametos, los cuales son superiores a los valores de referencia establecidos en el percentil 5 (Intervalo confianza del 95%) por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). Tras el análisis seminal y posterior test de descongelación 895 candidatos a donantes de semen son aceptados como donantes de semen (DS).

Se realiza exploración física y ecografía vaginal, para valoración ginecológica, a 1310 CDO que continuaron en el proceso de selección tras la entrevista y recogida de historia clínica. El criterio de selección se establece en base al recuento de folículos antrales (RFA). Tras la revisión ginecológica 923 candidatas a donantes de ovocitos son aceptadas como donantes de ovocitos (DO).

A todos los DS y DO que han sido finalmente aceptados se les realiza el análisis del cariotipo en sangre periférica y un test de portadores de 302 enfermedades genéticas de herencia recesiva mediante secuenciación completa del gen y análisis no dirigido de variantes (test qCarrier Plus).

Se evalúan las variantes patogénicas halladas en los donantes de gametos y se calcula la probabilidad de matching de alto riesgo en TRA con doble donación de gametos.

Además, se estiman los resultados que se habrían obtenido si se hubieran aplicado los diferentes test de genotipado más utilizados en España en

el ámbito de reproducción humana asistida en donantes de gametos (panel H, panel SG y panel I).

6. Resultados

La prevalencia de alteraciones cromosómicas que se encontraron en donantes de semen fue del 0.34% y del 0.7% en las donantes de ovocitos. Siendo las alteraciones estructurales en autosomas las que se encontraron con mayor frecuencia en donantes de gametos.

De los 1818 donantes de gametos aceptados en el programa de donación (923 donantes de ovocitos y 895 donantes de semen), 1470 (80,86%) fueron portadores de al menos una variante patogénica (729 donantes de semen y 741 donantes de ovocitos), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones.

De los 302 genes analizados, se detectaron variantes patogénicas en 236 genes diferentes, 14 de los cuales son genes ligados al cromosoma X.

En estos 236 genes se hallaron un total de 3079 variantes patogénicas (1506 en donantes de semen y 1573 en donantes de ovocitos).

De los 236 genes en los que se detectaron variantes patogénicas mediante el test qCarrier Plus, solamente 100 genes son estudiados de forma común por los tres test de genotipado analizados (genes comunes).

En los 100 genes comunes, se detectaron 1741 variantes patogénicas totales, entre las cuales se encuentran 607 variantes diferentes. De las 607

variantes diferentes, 137 (22.6%) habrían sido detectadas por los tres test de genotipado y 271 variantes diferentes (44,7%) no habrían sido detectadas por ninguno de los tres test de genotipado analizados.

De las 607 variantes patogénicas diferentes detectadas en nuestro estudio con secuenciación completa de los genes, solo 378 variantes habrían sido clasificadas como patogénicas/probablemente patogénicas por ClinVar. De las 229 restantes, 102 variantes producirían proteínas truncadas y 150 variantes habrían sido descritas en la literatura asociadas a enfermedades. Cabe destacar que 124 de las variantes patogénicas halladas en nuestro estudio no habrían sido descritas por ClinVar, dando lugar el 76.6% de las mismas a proteínas truncadas.

En relación al gen CFTR, se hallaron 59 variantes diferentes, de las que tan solo 13 habrían sido analizadas de forma común por los 4 test de genotipado analizados para la fibrosis quística y 32 variantes no habrían sido estudiadas por ninguno de los test de genotipado. De estas 32 variantes, 16 están clasificadas como patogénicas y/o probablemente patogénicas por ClinVar y 6 de ellas están clasificadas como A o B (asociada a fibrosis quística o a clínica relacionada con fibrosis quística) por Castellani et al. (2015).

La probabilidad de matching de alto riesgo obtenida con doble donación de gametos cuando se realiza secuenciación completa del gen fue del 5,6%, mientras que la de embrión afecto sería del 1,4%. Si se hubieran aplicado los tres test de genotipado analizados (panel H, panel SG y panel I), se habrían

obtenido probabilidades de matching de alto riesgo del 0,6%, 2,7% y 0,8% y probabilidades de embrión afectos del 0,2%, 0,7% y 0,2%, respectivamente.

7. Discusión

Se observaron el doble de alteraciones cromosómicas en donantes de ovocitos que en donantes de semen (0,7% vs 0,34%), lo que coincide con lo observado en otros estudios (Ananthapur et al., 2010). Esto puede deberse a las diferencias existentes en el protocolo de cribado entre los DS, en el que se realiza un análisis de semen de cribado previo al cariotipo, y las DO, a las que no se realiza un cribado similar previo al cariotipo.

Un porcentaje superior al 80% de los donantes analizados fueron portadores de al menos una variante patogénica, porcentaje similar a lo observado en otros estudios que utilizan, al igual que nosotros, estudio del gen completo y análisis no dirigido de variantes (Ceyhan-Birsoy et al., 2019; Martin et al., 2015; Punj et al., 2018). En cambio, el porcentaje obtenido en nuestro estudio es superior a los observados por otros grupos que utilizaron genotipado y obtuvieron frecuencias de portadores de un 24% y un 56% (Abulí et al., 2016; Lazarin et al., 2013).

De los 236 genes en los que se hallaron variantes patogénicas en nuestro estudio, solo 100 de ellos estaban incluidos en los 3 test de genotipado analizados (genes comunes). Hubo 27 genes que no eran estudiados por ninguno de los tres test de genotipado y 8, 32 y 4 genes que se estudiaban de forma exclusiva por los paneles, H, SG e I, respectivamente. Esto muestra la

marcada heterogeneidad que presentan los diferentes paneles de genotipado en relación a los genes analizados, lo cuál ha sido previamente descrito por Molly et al. (2021) y otros autores (Ben-Shachar et al., 2019; Chokoshvili et al., 2018; Molina et al., 2021).

Cabe destacar que de las 607 variantes patogénicas diferentes que se hallaron en los 100 genes comunes el 44.7% no habrían sido detectadas por ningún test de genotipado y que solo el 22,6% de las mismas habrían sido detectadas por los tres test de genotipado. Esto demuestra que los paneles de genotipado también presentan alta heterogeneidad en relación a las variantes analizadas, incluso cuando hablamos de genes comunes, y que los resultados obtenidos mediante genotipado subestiman la frecuencia de donantes portadores, lo cuál se asocia a un mayor riesgo residual de ser portador ante un resultado negativo del test, tal y como demuestran otros estudios (Abulí et al., 2016; Lazarin et al., 2013; Molina et al., 2020; Silver et al., 2016).

Por otro lado, existe cierta controversia respecto a la consistencia de la clasificación de las variantes en la base de datos de ClinVar (Yang et al., 2017; Amendola et al., 2016). Nuestro análisis registró un alto porcentaje de variantes patogénicas no descritas en ClinVar, siendo 76,6% de las mismas disfuncionales. Este hallazgo coincide con el descrito por Silver et al. (2016), quienes informaron que dos tercios de las variantes disfuncionales encontradas en su estudio en donantes de semen no estaban registradas en ClinVar.

En relación al gen CFTR, solamente el 22% de las diferentes variantes halladas están incluidas en los 4 test de genotipado analizados, lo que muestra

la poca homogeneidad existente entre los test de genotipado para la fibrosis quística, lo cuál ha sido previamente descrito por otros autores (Molina et al., 2020; Ben-Shachar et al., 2019; Amendola et al., 2016; Kanavakis et al., 2003).

La sensibilidad clínica y diagnóstica obtenida con los test de genotipado para el gen CFTR muestra las limitaciones de estos test para detectar portadores de FQ, corroborando hallazgos de investigaciones previas (Kammesheidt et al., 2006; Simpson et al., 2019). Los resultados obtenidos están en línea con los descritos anteriormente en poblaciones del sur de Europa, que presentan alta heterogeneidad molecular y en las que los paneles comerciales cubren del 50% al 75% de las variantes (Molina et al., 2020; Ben-Shachar et al., 2019; Amendola et al., 2016; Kanavakis et al., 2003).

Cabe destacar que el test SG presenta una sensibilidad clínica del 64,57% para detectar número total de donantes portadores de alguna variante en CFTR, pero muestra una sensibilidad clínica de solo un 18,86% para detectar donantes portadores de variantes que el test de SG considera causantes de fibrosis quística. Lo que demuestra que un mismo test genético puede tener diferentes tasas de detección dependiendo de si su aplicación va dirigida hacia alguna forma clínica determinada de FQ, tal y como muestran otros autores (Lucarrelli et al., 2016; Strom et al., 2011; Rowntree et al., 2003).

La probabilidad de obtener un matching de alto riesgo en tratamientos con doble donación de gametos, teniendo en cuenta los 100 genes comunes y realizando secuenciación completa del gen, es del 5,5% y del 0,6% -2,7% si aplicáramos los test de genotipado evaluados. Los resultados obtenidos en

nuestro estudio están dentro del rango descrito en otros estudios previos, que han informado tasas de matching de alto riesgo del 3-16% en parejas que se someten a tratamientos de reproducción asistida, ya sea con sus propios gametos o mediante la donación de gametos masculinos o femeninos (Abulí et al., 2016; Martin et al., 2015; Punj et al., 2018). En cambio, los resultados de matching de alto riesgo obtenidos con las pruebas de genotipado están por debajo del rango descrito por otros autores. Esta discrepancia puede ser debida a la menor tasa de detección de individuos portadores cuando se utilizan pruebas de genotipado (Lazarin et al, 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020; Silver et al., 2016).

8. Conclusiones

1. La realización de los test de portadores mediante genotipado, en comparación con la realización de los mismos mediante secuenciación completa de los genes, se asocia a mayor riesgo reproductivo incluso cuando se realiza matching genético.
2. Se recomienda realizar secuenciación completa de los genes, como método de análisis genético, para el cribado de enfermedades recesivas en donantes de gametos.
3. Para disminuir el riesgo reproductivo de fibrosis quística en todo su espectro clínico, cuando se realiza matching genético, se recomienda realizar estudio completo del gen CFTR y análisis no dirigido de variantes.

4. Es necesario que las sociedades científicas establezcan criterios claros sobre las enfermedades recesivas que se deben incluir en los test de portadores y sobre las variantes que deben analizarse en cada gen, especialmente en el gen CFTR.
5. Cada tratamiento de reproducción asistida con donación de gametos debe ser acompañado de una consulta de asesoramiento genético pretest y postest.

Introducción

1. Técnicas de reproducción asistida con donación de gametos

En los países desarrollados la necesidad de recurrir a técnicas de reproducción asistida con donación de gametos va en aumento debido principalmente al retraso en el deseo reproductivo como consecuencia, entre otros factores, de la incorporación de la mujer al mercado laboral. Esto ha llevado a que la edad media de las mujeres que se realizan tratamientos de reproducción asistida en España esté en torno a los 38 años. Con el aumento de la edad de la mujer existe una disminución de la reserva ovárica, acompañada de una disminución de la calidad ovocitaria, lo que conlleva una disminución de la capacidad reproductiva y un aumento del riesgo de aborto y alteraciones fetales. En Europa los tratamientos de reproducción asistida con gametos de donante han aumentado significativamente en los últimos 5 años, especialmente la donación de ovocitos, ayudada por los avances en la vitrificación ovocitaria. En Europa, en este periodo de tiempo, se han duplicado los tratamientos de reproducción asistida (TRA) con ovocitos donados (Gliozheni et al., 2016; Wyns et al., 2020).

Por otro lado, en los países desarrollados también se observa una mayor necesidad del uso de semen de donante debido principalmente al aumento de mujeres con deseo de maternidad en solitario y al deseo reproductivo de parejas lesbianas.

La donación de gametos en España y en Europa es, por tanto, una necesidad cada vez mayor. Según las estadísticas de la Sociedad Española de

Fertilidad (SEF) los tratamientos de reproducción asistida con donación de gametos suponen el 38% de todos los tratamientos de reproducción asistida que se realizan en España. En base a los datos obtenidos en el registro nacional de la SEF de 2019, se han llevado a cabo más de 29.000 ciclos con donación de ovocitos y más de 27.000 ciclos con donación de semen (Informe Registro Nacional SEF, 2019)

2. Regulación de la donación de gametos

Los donantes de gametos son seleccionados aplicando rigurosos programas de cribado, que siguen la normativa legislativa vigente y las recomendaciones de las diferentes sociedades científicas, tanto nacionales como internacionales, buscando no solamente el éxito de embarazo, sino reducir el riesgo de enfermedad genética en la descendencia.

2.1 Regulación legislativa española

En España, la donación de gametos está regulada por la ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida (Ley 14/2006) y el Real Decreto-Ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humano (RD-Ley 9/2014). Recientemente, la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA, 2021) ha publicado un documento sobre el estudio básico de donantes de gametos (femeninos y masculinos), en

el que manifiestan una serie de recomendaciones y criterios relacionados con el protocolo de estudio básico en donantes de gametos y sobre los motivos por los que no pueden ser aceptados los aspirantes a donantes de gametos.

Teniendo en cuenta las leyes y recomendaciones anteriormente mencionadas, el cribado de donantes de gametos deberá cumplir los siguientes criterios:

- Chlamydia y Gonococo en orina (PCR) → Negativos
- Test serológicos → Enfermedad no activa
 - o HIV 1 y 2: anticuerpos HIV-1, 2 y antígeno p24
 - o Hepatitis B: antígenos HBs / Anticuerpos anti HBc.
 - o Hepatitis C: Anticuerpos Anti VHC.
 - o Sífilis: Prueba reagínica (RPR) en combinación con prueba treponémica (TPHA-*Treponema pallidum Haemagglutination*-)
 - o Test adicionales a valorar según factores riesgo: HTLV-I y II, Malaria, Toxoplasma, Tripanosoma cruzi, dengue, virus Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV)....
- Evaluación del riesgo de transmisión de enfermedades genéticas → Donantes con bajo riesgo de transmisión de enfermedades genéticas.
 - o Se debe revisar y evaluar la historia médica personal y familiar de los donantes, de forma que nos permita identificar cualquier factor que pueda representar un riesgo para la salud de terceros, como la existencia de antecedentes familiares de enfermedades con herencia dominante o asociadas a alta susceptibilidad genética y que puedan afectar a la descendencia. Para ello, se recoge la

historia clínica personal y familiar de 4 generaciones para cada candidato a donante, de forma que nos permita evaluar el riesgo de este tipo de patologías.

- Se llevará a cabo una evaluación de la carga genética en relación a la existencia de genes autosómicos recesivos de acuerdo al conocimiento científico y a la prevalencia conocida en la etnia del donante. La evaluación genética de este tipo de enfermedades actualmente se realiza mediante test de portadores de enfermedades recesivas.
- Según las recomendaciones de la SEF (Castilla et al., 2020) y de la CNRHA (CNRHA, 2021), se debe realizar un estudio básico (“screening básico”) obligatorio en todos los donantes de gametos, que incluye el análisis de CFTR, GJB2, HBA1, HBA2, HBB, SMN1 y FMR1, este último gen únicamente en las donantes de ovocitos.

De forma que:

- Donantes de gametos portadores de variantes patogénicas en los genes incluidos en el screening básico: deberán ser asignado obligatoriamente mediante matching genético.
 - Donantes de gametos no portadores de variantes patogénicas en los genes incluidos en el screening básico: pueden ser asignados sin matching genético.
- Cabe destacar que ni la SEF, ni la CNRHA, ni la ley indican específicamente cómo debe realizarse el estudio de los genes incluidos en el screening básico de donantes de gametos, si

mediante el análisis dirigido de variantes (genotipado) o mediante el análisis completo de los genes.

- Por otro lado, se recomienda realizar el estudio del cariotipo en todos los donantes de gametos para valorar posibles alteraciones cromosómicas.

3. Conceptos básicos de genética

El genoma hace referencia al conjunto completo de ácido desoxirribonucleico (DNA) de un organismo, un compuesto químico que contiene las instrucciones genéticas necesarias para desarrollar y dirigir las actividades de cada organismo. Las moléculas de DNA nuclear en células eucariotas son lineales, están compuestas por dos cadenas que se enrollan entre sí de forma antiparalela para generar una estructura de doble hélice.

Cada hebra está formada por un esqueleto de grupos azúcar-fosfato unidos cada uno de ellos a una base nitrogenada, adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C). Cada una de estas unidades, formadas por el grupo azúcar + fosfato + base nitrogenada, se les denomina nucleótidos y se unen entre sí mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar a un polímero lineal que conforma la estructura primaria del DNA.

La estructura secundaria del DNA fue propuesta por James Watson y Francis Crick y la llamaron el modelo de doble hélice de DNA. Este modelo está formado por dos hebras de nucleótidos, situadas de forma antiparalela, es decir, una orientada en sentido $5' \rightarrow 3'$ y la otra de $3' \rightarrow 5'$ y enrolladas de forma helicoidal en torno a un eje imaginario. Ambas hebras se unen formando puentes

de hidrógeno entre las bases nitrogenadas que se enfrentan de forma específica, una A siempre se empareja con una T y una C siempre con una G (Figura I).

Figura I. Estructura secundaria del DNA, doble hebra antiparalela con las bases nitrogenadas, A-T y G-C, enfrentadas.

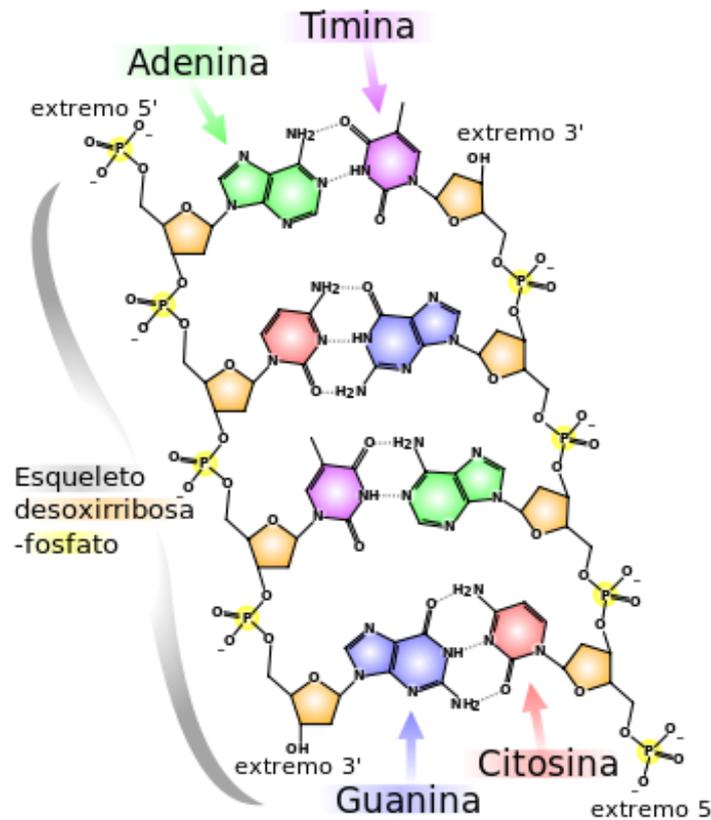


Figura I. Magalhães, 2021. <https://www.todamateria.com.br/dna/>

El DNA es una molécula de gran extensión que se encuentra ubicada dentro del núcleo, cuya dimensión es mucho menor. Para ello, el DNA sufre un proceso de empaquetamiento gracias a la estructura terciaria y cuaternaria que adopta esta molécula. La doble hélice de DNA se enrolla alrededor de una estructura proteica formada por un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4), generando la formación del nucleosoma, estructura terciaria del DNA. Los nucleosomas se compactan aún más, pasando por una estructura cuaternaria,

para conseguir la compactación de la cromatina interfásica de 300 nm o la compactación de 1400 nm cuando la célula entra en la etapa de metafase en la división celular, estructura típica conocida del cromosoma analizado en los cariotipos (Figura II).

Figura II. Empaquetamiento de la cromatina. Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria del DNA.

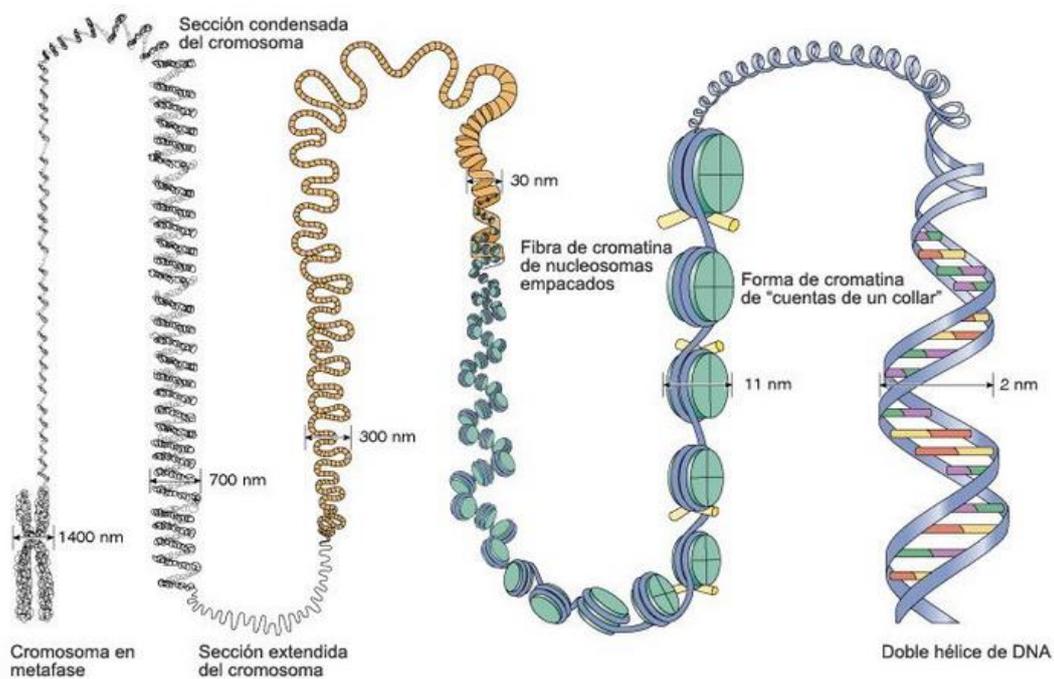


Figura II. Kumar, 2002. Clinical Medicine. 5th edition. W. B. Saunders Company.

El orden de secuencia de las bases nucleotídicas en el DNA determina, mediante el proceso de transcripción, la secuencia de bases nucleotídicas del RNA mensajero (RNAm). La secuencia de bases en el RNAm define, mediante el proceso de traducción, cuál será la secuencia de aminoácidos en la proteína que se va a sintetizar. Cada triplete de nucleótidos (codón) determinará la señal de inicio de síntesis de la proteína, la incorporación de un determinado

aminoácido o la señal de final de la secuencia, todo ello definido por el código genético (Figura III y Figura IV).

Figura III. Proceso de transcripción de DNA a RNAm y proceso de traducción del RNAm a proteína.

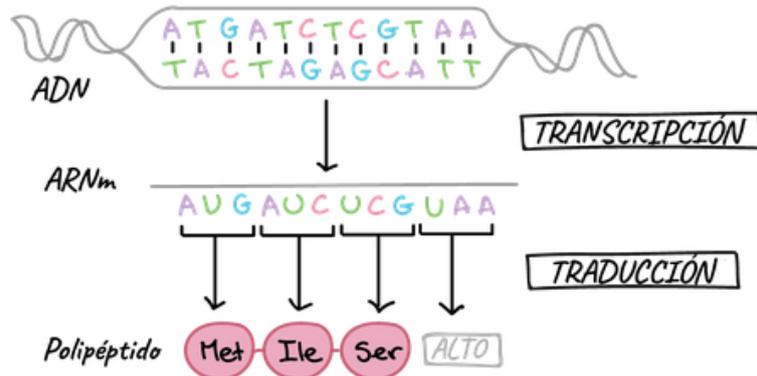


Figura III. Khan Academy. Etapas de la transcripción.
<https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/transcription-and-rna-processing/a/overview-of-transcription>

Figura IV. Código genético. Combinaciones posibles de tripletes en el RNAm que determinan las señales de inicio y fin de la síntesis de la proteína y la incorporación de los diferentes aminoácidos.

		Segunda Letra								
		U		C		A		G		
Primera Letra	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP	A
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	STOP	UGG	Try	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	
A	AUU	Iso	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	
	AUC	Iso	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C	
	AUA	Iso	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	
										Tercera Letra

Figura IV. Bioinnova. El código genético. <https://www.innovabiologia.com/biodiversidad/diversidad-animal/el-codigo-genetico/>

El genoma nuclear humano contiene aproximadamente 3 mil millones de pares de bases, que residen en los 23 pares de cromosomas, dentro del núcleo de cada una de nuestras células. Cada cromosoma puede contener de cientos a miles de genes, que llevan las instrucciones para producir proteínas o transcritos. Se estima que genoma humano contiene aproximadamente 30.000 genes, cada uno de los cuales produce un promedio de 3 proteínas. En los seres humanos la suma de todos los genes representa aproximadamente el 2% de nuestro genoma.

El gen es la unidad funcional y física básica de la herencia, que contiene la información necesaria para codificar una determinada proteína o un RNA

funcional. El gen presenta una región promotora, situada aguas arriba de la unidad transcripcional. La unidad transcripcional de un gen está constituida fundamentalmente por regiones que podemos dividir en dos grupos, los exones y los intrones. Los exones hacen referencia a las regiones del DNA que se podrán mantener en el RNAm maduro y que podrán ser traducidas a proteínas. En cambio, las regiones intrónicas, son las regiones de la secuencia del gen que no codifican directamente para proteínas, sino que son eliminadas durante el proceso de maduración del mRNA mediante el llamado splicing o empalme, proceso en el que principalmente los intrones, y a veces algunos exones, son eliminados (Figura V).

Figura V. Estructura de un gen en el DNA, proceso de transcripción de DNA, proceso de splicing en RNA primario, maduración del RNAm y traducción del RNAm a proteína.

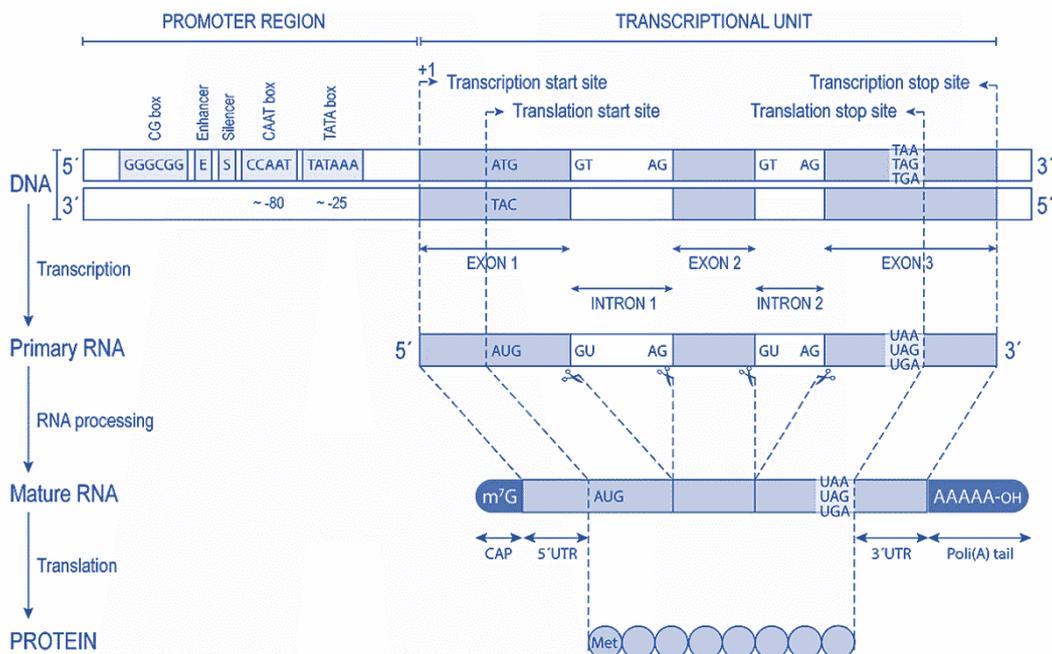


Figura V. Calvo, 2017. Estructura del gen. <https://www.diegocalvo.es/definicion-de-gen/estructura-del-gen/>

Gracias al fenómeno de splicing alternativo un mismo gen puede producir diferentes proteínas. Se cree que entre el 30-60% de los genes humanos sufren el proceso de splicing alternativo. Mediante este proceso, algunos exones pueden ser eliminados junto con los intrones que los flanquean, de forma que se crean diferentes versiones de ARN mensajeros, y con ello diferentes proteínas, a partir de un mismo gen. Cabe anotar que el proceso de splicing alternativo, no es de ninguna manera un proceso aleatorio, sino que se trata de un proceso estrictamente regulado que ha evolucionado de manera que las diferentes proteínas así creadas sean todas funcionales.

Actualmente, se conoce que las regiones intrónicas son regiones activas ya que influyen en la regulación de la expresión del DNA, afectando a los niveles de transcripción, exportación nuclear, estabilidad de la transcripción, etc, tal y como se ha demostrado en varias publicaciones (Morgan et al., 2019; Parenteau et al., 2019; Shaul et al., 2017; Eghbalnia et al., 2020).

En relación con el proceso de splicing, es importante resaltar que más del 60% de las mutaciones que causan enfermedades en los seres humanos están relacionadas con errores de empalme, en lugar de errores en las secuencias de codificación (exones).

El estudio y la determinación de la secuencia del DNA nos ayuda a identificar cambios en la secuencia que pudieran estar vinculados con el desarrollo de diferentes patologías. Para poder valorar el cambio en la secuencia del DNA, ésta debe ser comparada con una secuencia de referencia (hg19). El proyecto Genoma Humano, desarrollado durante un periodo de 13 años, nos

permitió conocer la secuencia completa del genoma humano. Iniciado en 1990 y finalizado en abril de 2003, cuando el Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma Humano anunció una versión esencialmente terminada de la secuencia del genoma humano, que posteriormente ha sido mejorada y actualizada. La finalización de este proyecto no solo marcó el comienzo de una nueva era en la medicina, sino que también condujo a avances significativos en los tipos de tecnología utilizados para secuenciar el ADN, además proporciona casi toda la información necesaria para realizar investigaciones utilizando el genoma completo (<https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-sequencing-technologies-key-to-the-human-828/>).

4. Tipos de variantes o mutaciones

4.1 Alteraciones genéticas

Este tipo de mutaciones hacen referencia a cambios que se producen en la secuencia del DNA.

4.1.1 Mutaciones puntuales (SNPs)

Se consideran mutaciones puntuales o SNPs (de sus siglas en inglés *single-nucleotide polymorphism*) aquellos cambios de sustitución de una sola base que altera la secuencia de nucleótidos del DNA. Estos cambios que se producen en la secuencia del DNA pueden llevar a la sustitución de la secuencia de aminoácidos en las proteínas resultantes. En base a ello, las mutaciones puntuales se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Mutación silenciosa o sinónima: se considera una mutación neutral, ya que el cambio de nucleótido en la secuencia de DNA no supone un cambio en la secuencia de aminoácidos en la proteína resultante, debido a la degeneración del código genético (diferentes codones que codifican para un mismo aminoácido) (Figura VI).

Figura VI. Mutación silenciosa. Cambio en el DNA de una adenina por una timina, sin cambio en la secuencia de aminoácidos en la proteína.

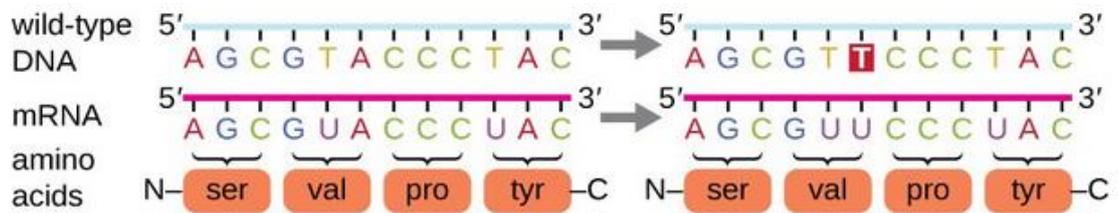


Fig VI. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mutations/#return-footnote-542-3>

- Mutación *missense* o con cambio de sentido: se produce el cambio de un único nucleótido que provoca la aparición de un nuevo codón que codifica para un aminoácido diferente al original (Figura VII).

Figura VII. Mutación missense. Cambio en el DNA de una citosina por una adenina, que provoca el cambio de una prolina por una treonina en la proteína.

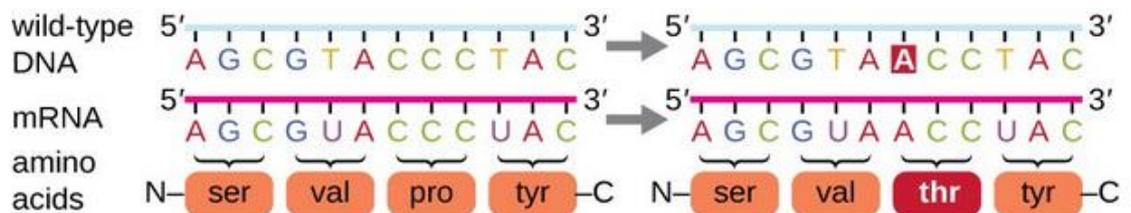


Fig VII. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mutations/#return-footnote-542-3>

- Mutación *nonsense* o sin sentido: se produce el cambio de un único nucleótido que provoca la aparición de un codón de terminación donde antes había un codón que codificaba para un aminoácido, de tal forma que causa la terminación prematura de la proteína, por lo que será más corta a la original y probablemente no funcional (Figura VIII).

Figura VIII. Mutación nonsense. Cambio en el DNA de una citosina por una guanina, que provoca el cambio de una tirosina por una señal de parada de síntesis de la proteína.

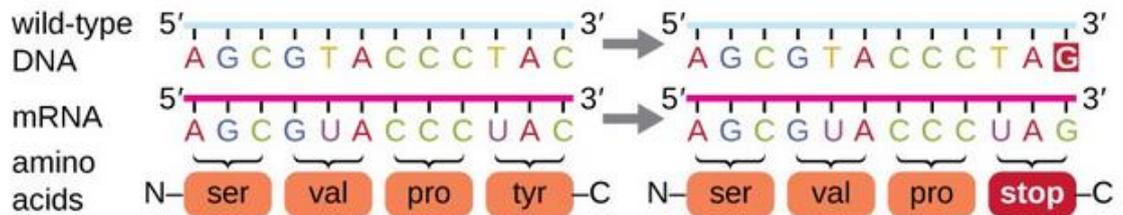


Fig VIII. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mutations/#return-footnote-542-3>

4.1.2 Inserciones y deleciones (Indels)

Este tipo de mutaciones suponen la incorporación o eliminación de nucleótidos en la secuencia de DNA. El número de nucleótidos que se incorporan o eliminan determina el efecto que tendrá sobre la proteína resultante. La incorporación o eliminación de 3 nucleótidos o múltiplo de 3, supondrá la elongación o acortamiento de la proteína, ya que cada 3 nucleótidos (codón) se codifica un aminoácido.

En cambio, la incorporación o eliminación de un número de nucleótidos no múltiplo de 3, supone un cambio en el marco de lectura de la secuencia, que comienza en el punto en donde se produce la inserción o deleción y a partir de

la cual la proteína resultante será totalmente diferente. Estas mutaciones también son conocidas como *frameshift* (Figura IX).

Figura IX. Mutación Frameshift. Delección de dos nucleótidos de la secuencia de DNA original, que provoca cambio en la secuencia de aminoácidos en la proteína resultante a partir de punto en el que se produce la delección.

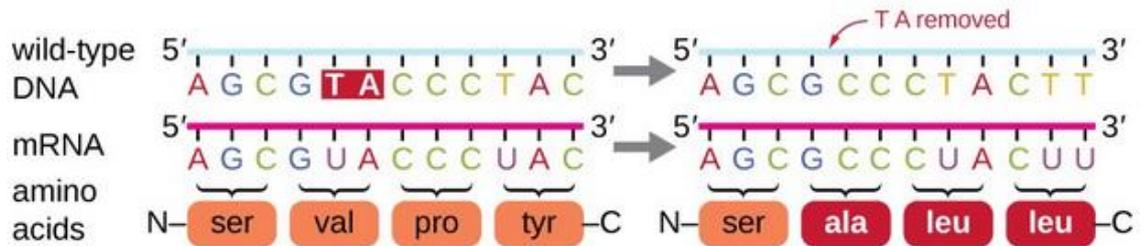


Fig IX. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/mutations/#return-footnote-542-3>

4.1.3 Mutaciones dinámicas (expansión de tripletes)

Este tipo de mutaciones se asocian a la amplificación de secuencias formadas por la repetición en tándem de un trinucleótido (triplete). Existen cuatro tipos de tripletes cuya expansión resulta especialmente patogénica en seres humanos: CGG/GCC, CAG/GTC, CTG/CAG y GAA/CTT. Las expansiones de tripletes pueden causar diferentes efectos: desde la inactivación de un gen hasta alteraciones en el transporte del ARN mensajero y/o en la síntesis proteica.

Desde un punto de vista molecular presenta peculiaridades que justifican que sean enmarcarlas en otro grupo de mutaciones, las denominadas mutaciones dinámicas, ya que presentan inestabilidad de una generación a la siguiente, pudiendo aumentar o disminuir el número de tripletes durante el proceso de la gametogénesis. A este proceso se le asocia el fenómeno de anticipación, fenómeno por el que los signos y síntomas de algunas afecciones

genéticas se tornan más graves o aparecen en edades más tempranas a medida que el trastorno pasa de una generación a la siguiente, asociado a la expansión de tripletes de una generación a la siguiente.

4.2 Alteraciones cromosómicas

Se refiere a aquellas alteraciones que provocan variaciones en el número o en la estructura normal de los cromosomas.

Dependiendo de si existe pérdida o ganancia de material genético o no, las alteraciones cromosómicas se pueden clasificar como:

- Alteraciones desequilibradas: suponen la pérdida o ganancia de material genético y por ello se suelen asociar a manifestaciones fenotípicas relacionadas con los genes implicados en la alteración. En este grupo podemos incluir a las deleciones, duplicaciones, cromosomas en anillo e isocromosomas.
- Alteraciones equilibradas: se trata de cambios en la localización o posición de un segmento cromosómico en las que normalmente no hay pérdida o ganancia de material genético y no se suelen asociar a efectos fenotípicos en los portadores de la alteración, excepto en algunos casos en los que presentan alteraciones fenotípicas asociadas a cambios en la posición. En este grupo podemos incluir a las inversiones, translocaciones e inserciones.

4.2.1 Alteraciones cromosómicas numéricas

Suponen la pérdida o la ganancia de uno o varios cromosomas. Pudiendo afectar tanto a los cromosomas sexuales (gonosomas) como a los autosomas.

4.2.1.1 Monosomías

El término monosomía se utiliza para describir la ausencia de uno de los miembros de un par de cromosomas homólogos. La única monosomía compatible con la vida es la monosomía del cromosoma X, conocido como síndrome de Turner (45, XO) (Figura X).

Figura X. Cariotipo de síndrome de Turner.

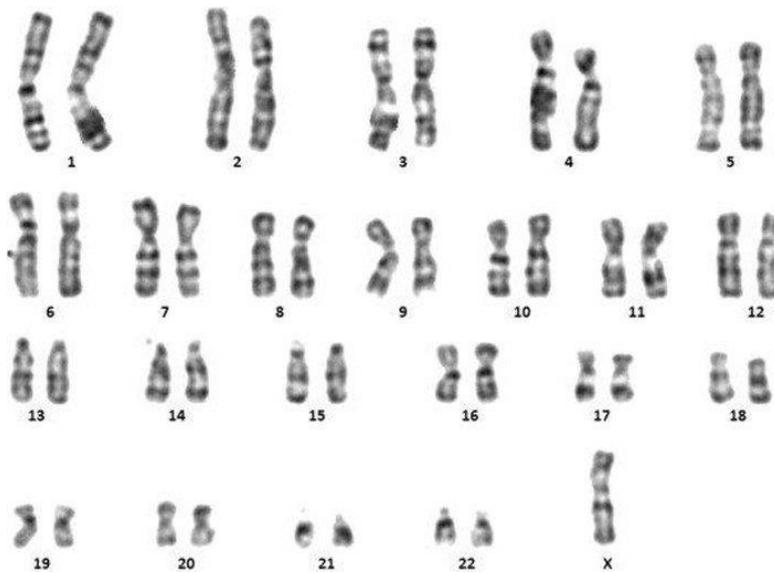


Figura X. Cabrera, 2020. A propósito de una paciente con síndrome de Turner: Reporte de Caso. <https://revistamedica.com/sindrome-de-turner-2/>

4.2.1.2 Trisomías

El término trisomía se utiliza para describir la presencia de tres cromosomas homólogos, en lugar del par de homólogos habitual. Las trisomías compatibles con la vida son la trisomía del cromosoma 21 o síndrome de Down

(47,XX,+21) (Figura XI), la trisomía del cromosoma 18 o síndrome de Edwards (47,XX,+18) y la trisomía del cromosoma 13 o síndrome de Patau (47,XY,+13). Normalmente este tipo de alteraciones se deben a errores en la meiosis de los gametos, principalmente femeninos, asociados a edad materna avanzada.

Figura XI. Cariotipo Síndrome de Down

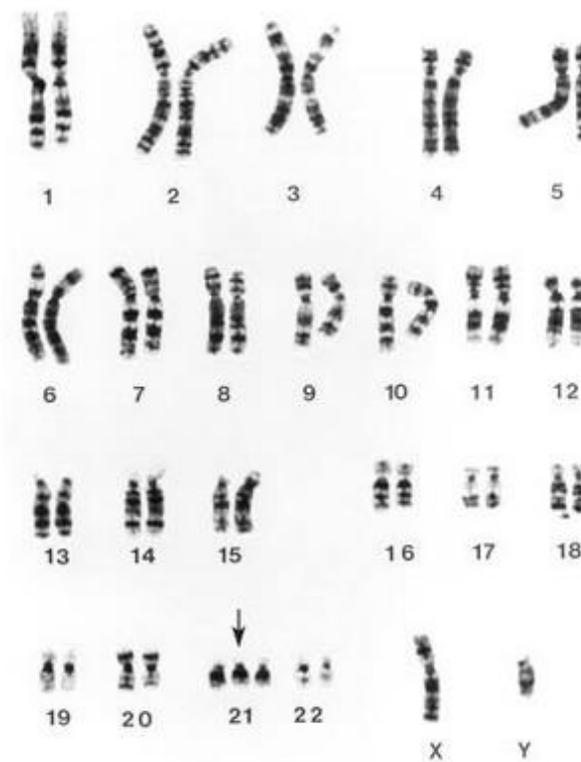


Figura XI. Willat, 2018. East anglia regional genetics service/science photo library. https://www.msmanuals.com/es-es/professional/multimedia/image/v39680845_es

4.2.2 Alteraciones cromosómicas estructurales

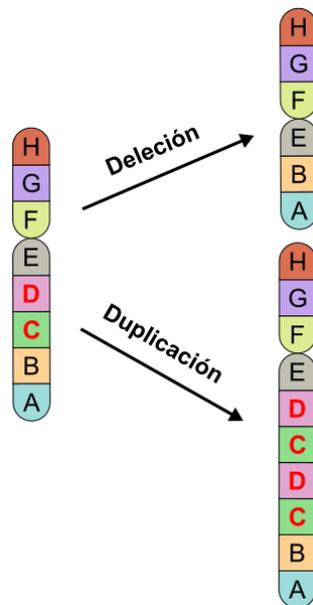
4.2.2.1 Variación en el número de copias (CNVs)

Las CNVs suponen la pérdida o ganancia desde cientos hasta cientos de miles o millones de bases de nuestro DNA. También se conocen como grandes

reordenamientos (grandes inserciones o deleciones) y muchas de ellas son causantes de enfermedades hereditarias (Figura XII).

Habitualmente este tipo de mutaciones son estudiadas mediante técnicas alternativas a las de secuenciación del DNA, como la técnica MLPA-Multiplex (de sus siglas en inglés Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, amplificación de sondas tras ligación múltiple) o array-CGH (Comparative genomic hybridization). Aunque si el tamaño de la pérdida o ganancia de material genético es elevado (>4-5Mb), puede ser detectado mediante la realización del cariotipo.

Figura XII. Cambio en el número de copias (CNVs). Delección y duplicación de fragmentos de DNA.

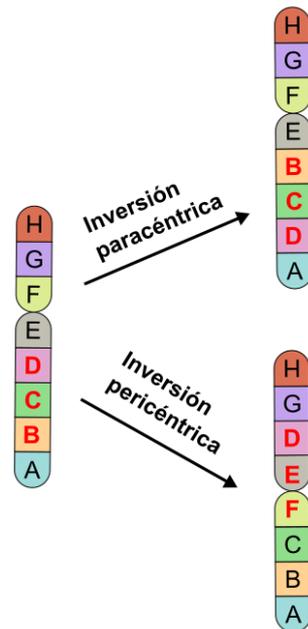


4.2.2.2 Inversiones

Reordenamiento cromosómico en el que el segmento se fragmenta y vuelve a ser incorporado en su posición, pero con la orientación invertida en

180°C. Las inversiones pueden clasificarse como pericéntricas o paracéntricas, dependiendo de si el fragmento incluye el centrómero cromosómico o no, respectivamente (Figura XIII).

Figura XIII. Inversión pericéntrica y paracéntrica.



4.2.2.3 Translocaciones

Tipo de anomalía en la que se produce la ruptura de un cromosoma en particular y el segmento, producto de la ruptura, se une en un cromosoma diferente (Figura XIV).

Puede haber translocaciones recíprocas, en las que dos cromosomas intercambian regiones entre sí (Figura XV), y translocaciones robertsonianas, que se producen por la fusión de dos cromosomas acrocéntricos por sus centrómeros, que a menudo van acompañadas de la pérdida de los brazos cortos de los cromosomas implicados (Figura XVI).

Figura XIV. Translocación no recíproca

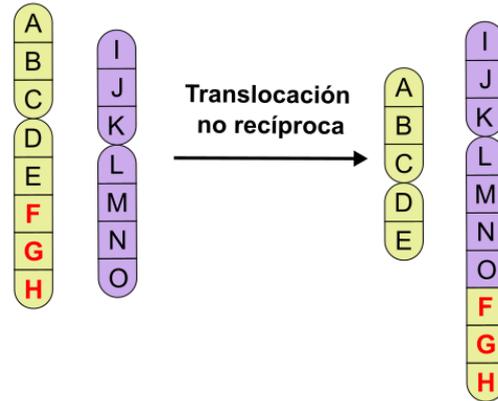


Figura XV. Translocación recíproca, en la que se produce intercambio cromosómico entre dos

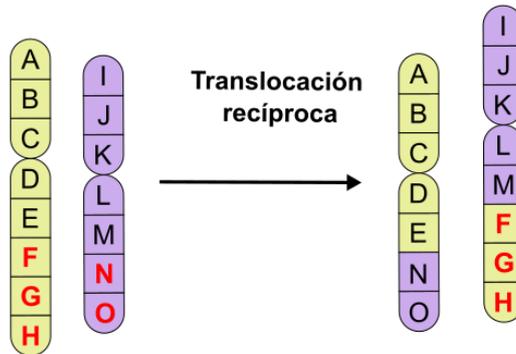
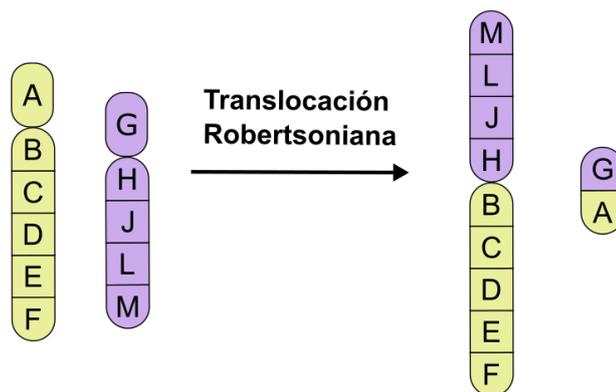


Figura XVI. Translocación Robertsoniana, entre dos cromosomas acrocéntricos no homólogos.



4.2.2.4 Otras alteraciones cromosómicas estructurales

- Cromosomas en anillo: se forma cuando ambos extremos de los brazos de un mismo cromosoma se unen entre sí. Para ello, es necesario que los extremos de ambos brazos se pierdan para que puedan unirse, por lo que se pierde la información genética contenida en ambos extremos.

- Marcadores cromosómicos: pequeño fragmento cromosómico extra de origen indeterminado.

- Isocromosomas: uno de los brazos originales del cromosoma se pierde y el otro se encuentra duplicado. Se pierde una copia de la información genética del brazo perdido, mientras que la información genética del isocromosoma se encuentra triplicada en el individuo.

5. Patrones de herencia genética

El cariotipo humano está constituido por 46 cromosomas, 23 pares de cromosomas heredados de cada progenitor.

- Dos de los cromosomas, el X y el Y, llamados cromosomas sexuales, que van a determinar el sexo masculino (XY) y femenino (XX).
- Y 22 pares de cromosomas homólogos, autosomas o cromosomas somáticos, en los que cada par de cromosomas homólogos contiene los mismos genes, pudiendo cada gen contener una información diferente en cada cromosoma, que es lo que se conoce como alelo.

El tipo de herencia viene determinado, entre otros factores, por la localización del gen:

- Herencia Autosómica: gen presente en los autosomas, los individuos de sexo masculino y femenino presentan dos copias del gen de interés.
- Herencia ligada al cromosoma X: gen presente en el cromosoma X. Debido a que mujeres (XX) y varones (XY) presentan dos o una copia del cromosoma X, respectivamente. El riesgo de manifestar la enfermedad o el riesgo reproductivo dependerá del sexo del individuo portador.

Hay dos conceptos sobre genética que son importantes a la hora de valorar el riesgo de enfermedades hereditarias en la elaboración de los árboles genealógicos y que nos ayuda a evaluar el riesgo reproductivo de una determinada enfermedad:

- Penetrancia: hace referencia al porcentaje de individuos que presentando una mutación patogénica específica en un gen (genotipo), manifiestan la clínica de la enfermedad asociada a esa mutación (fenotipo). La penetrancia es completa cuando el 100% de las personas con la mutación tienen las características de la enfermedad e incompleta cuando no todas las personas con la mutación manifiestan el fenotipo correspondiente.
- Expresividad variable: se refiere al rango o espectro de manifestaciones clínicas observadas en individuos que presentan un genotipo determinado. Así, un grupo de individuos genéticamente idénticos para una condición patológica pueden presentar manifestaciones fenotípicas en diferente grado.

5.1 Herencia monogénica

Este tipo de herencia se debe a la presencia de variantes en un solo gen, se conocen como enfermedades mendelianas, por transmitirse a la descendencia según las leyes de Mendel.

5.1.2 Herencia autosómica

5.1.2.1 Autosómica dominante

La herencia autosómica dominante se caracteriza porque el gen de interés se encuentra en uno de los 22 cromosomas no sexuales y solo una de las dos copias del gen alterada es suficiente para que se exprese la enfermedad, a pesar de que la copia del otro alelo sea normal. La copia alterada ejerce un efecto dominante sobre la copia normal del gen.

En este tipo de herencia, si alguno de los progenitores presenta la enfermedad, tendrán una probabilidad de 50% de descendencia afectada y 50% de descendencia sana, independientemente del sexo de la descendencia y del sexo del progenitor afectado (Figura XVII). Enfermedades con este tipo de herencia suelen manifestarse en varias generaciones de la misma familia.

Figura XVII. Patrón de herencia autosómica dominante

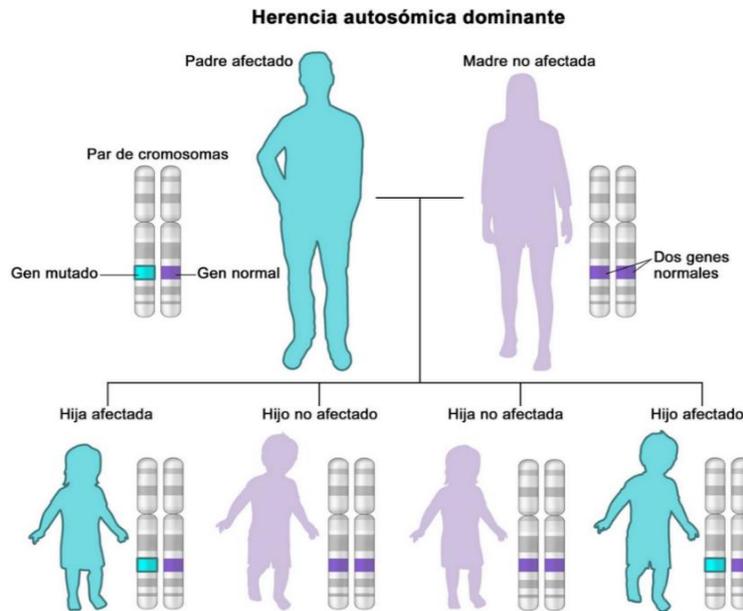
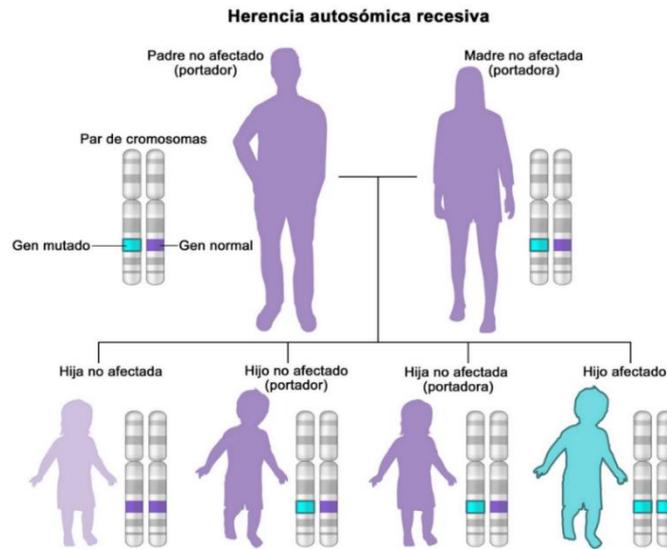


Figura XVII. NIH. Instituto Nacional del Cáncer.

5.1.2.2 Autosómica recesiva

En este tipo de herencia, el gen también se encuentra en uno de los 22 cromosomas no sexuales, sin embargo, es necesario que las dos copias del mismo gen estén alteradas para que se exprese la enfermedad. Si solo una de las copias está alterada se considera que el individuo es portador sano.

Las enfermedades con este tipo de herencia se manifiestan normalmente en descendencia de progenitores no afectados, pero que ambos son portadores de una mutación en un mismo gen (Figura XVIII). En estos casos, la probabilidad de descendencia afecta es del 25%, el 50% de la descendencia serán portadores sanos y el 25% restante serán sanos no portadores. En familias con este tipo de enfermedades es típico que haya aparición de un individuo afecto sin presentar antecedentes familiares previos.

Figura XVIII. Patrón de herencia autosómica recesiva*Figura XVIII. NIH. Instituto Nacional del Cáncer.*

5.1.3 Herencia ligada al cromosoma X

5.1.3.1 Ligada al X dominante

En este tipo de herencia, el gen se encuentra en el cromosoma X y la copia alterada del gen ejerce un efecto dominante sobre la copia normal. Por ello, tanto los individuos de sexo masculino como femenino serán afectados de la enfermedad si tienen una copia del gen alterada.

En este tipo de herencia, si alguno de los progenitores es afecto con una copia del gen alterada, tendrán una probabilidad de 50% de descendencia afecta y 50% de descendencia sana, independientemente del sexo de la descendencia (Figura XIX). Enfermedades con este tipo de herencia suelen manifestarse en varias generaciones de la misma familia, afectando por igual a ambos sexos. Todas las hijas de varones afectados serán afectas y el 100% de los hijos varones

sanos. Mientras que, si se trata de una mujer afecta, el 50% de la descendencia será afecta y el otro 50% será sana.

Figura XIX. Patrón de herencia dominante ligada al cromosoma X.

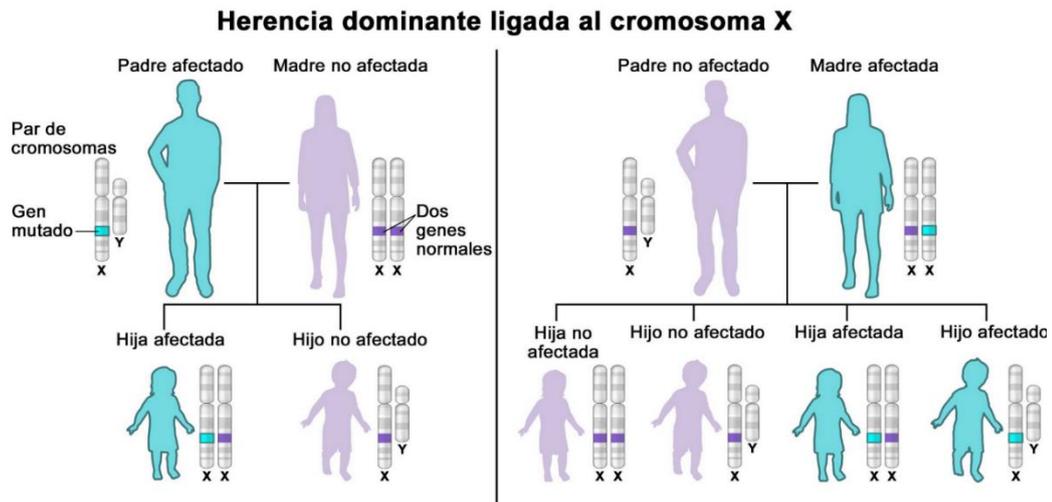


Figura XIX. NIH. Instituto Nacional del Cáncer.

5.1.3.1 Ligada al X recesiva

En este caso el gen también se encuentra en el cromosoma X, pero es necesario que ambas copias del gen estén alteradas para que se manifieste la enfermedad, ya que la copia normal dominaría sobre la copia alterada. Es por ello, que estas enfermedades se manifiestan con mayor frecuencia en hombres, que tienen un solo cromosoma X (hemocigosis) y si heredan el gen mutado manifestarán la enfermedad. Sin embargo, las mujeres al tener dos cromosomas X, si heredan una copia del gen alterado serán portadoras, pero *a priori* no manifestarán la enfermedad.

Los varones afectos no transmitirán la enfermedad a sus hijos varones, pero el 100% de sus hijas serán portadoras. En cambio, si una mujer es

portadora, el 50% de sus hijos varones serán afectados y el 50% de sus hijas serán portadoras sanas, el resto serán sanos no portadores (Figura XX). El árbol genealógico típico en este tipo de enfermedades se observa la presencia de descendencia masculina afectada, procedente de progenitores no afectados. En cambio, la descendencia de los varones afectados no son afectados de la enfermedad. Y las mujeres no son afectadas de la enfermedad.

Figura XX. Patrón de herencia recesiva ligada al cromosoma X.

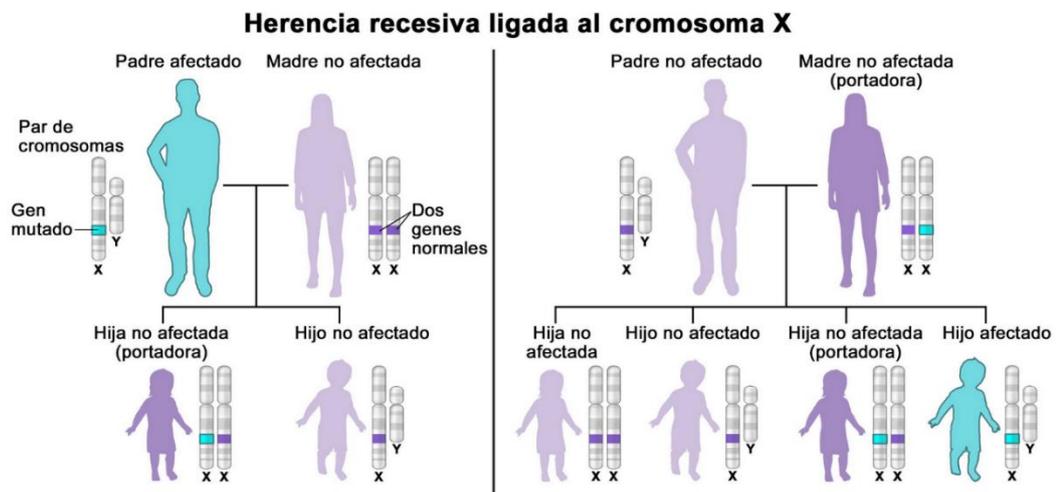


Figura XX. NIH. Instituto Nacional del Cáncer.

5.2 Herencia multifactorial

Hace referencia a enfermedades que están determinadas por la acción conjunta de más de un gen y que, además, están influenciadas por factores ambientales. Es por ello, que la predicción del riesgo reproductivo para este tipo de patologías de herencia multifactorial es complicado.

5.3 Otros tipos de herencia

5.3.1 Mitocrondrial

Asociada a defectos en el DNA mitocondrial, no DNA nuclear. Expresadas en individuos de sexo masculino y femenino, pero que se transmiten con un patrón de herencia característico por vía materna, debido a que casi no hay mitocondrias presentes en el espermatozoide, por ello se considera que el DNA mitocondrial heredado es principalmente por vía materna.

5.3.2 Epigenética

La epigenética hace referencia a los cambios en el patrón de expresión génica que no se deben a cambios en la secuencia del DNA y que son heredados.

5.3.3 Disomía uniparental

Hace referencia a la situación en la que las dos copias de un mismo cromosoma provienen del mismo progenitor. El resultado es la duplicación de los genes de un progenitor y ninguna representación de los genes del otro progenitor. La disomía uniparental puede dar lugar a problemas de salud cuando los cromosomas implicados contienen genes cuya expresión se encuentra regulada por la impronta genética (tanto en los casos de heterodisomía, como isodisomía). Dependiendo del tipo de impronta, nos encontramos genes que solo se expresan en el cromosoma paterno, encontrándose silenciados en el materno, y viceversa. Esto puede resultar en la pérdida de función de aquellos genes que se encuentren silenciados en el cromosoma paterno (o materno) si

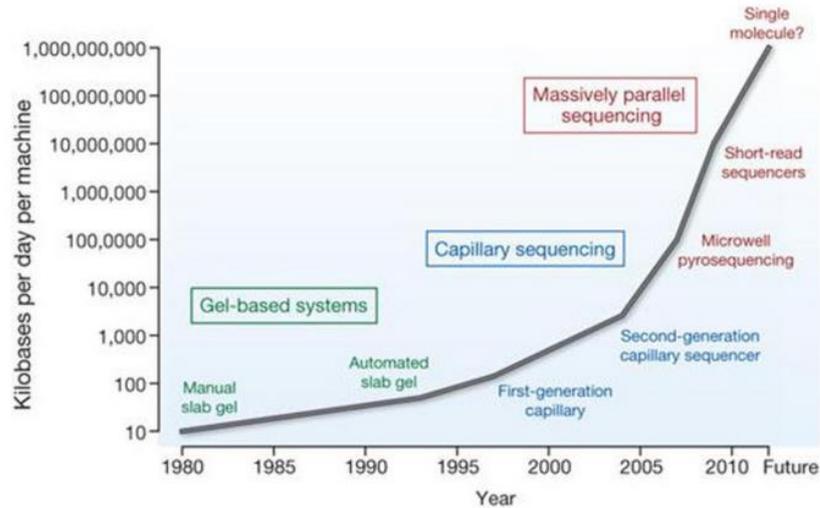
las dos copias son heredadas del mismo progenitor; lo cual puede ocasionar problemas médicos.

6. Evolución de las técnicas de secuenciación de DNA

Desde el desarrollo de la secuenciación Sanger en 1980 por el bioquímico inglés Frederick Sanger y A.R Coulson, pasando por la incorporación de la primera comercialización de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS) en 2005, hasta ahora, se ha producido una revolución en el ámbito de la investigación de genómica básica y aplicada. Las técnicas de secuenciación del DNA han mejorado a lo largo de los años, la evolución e incorporación de nuevas técnicas moleculares ha permitido aumentar la capacidad de lectura de la secuencia de DNA a kilobases por día (Gráfica I). La técnica de NGS ha permitido incorporar el análisis en paralelo de multitud de secuencias en plataformas manejables, por lo que estos métodos de secuenciación también reciben el nombre de secuenciación masiva en paralelo. Además, el avance tecnológico ha ido acompañado de una disminución considerable de los costes invertidos por secuenciación de cada genoma humano (Gráfica II).

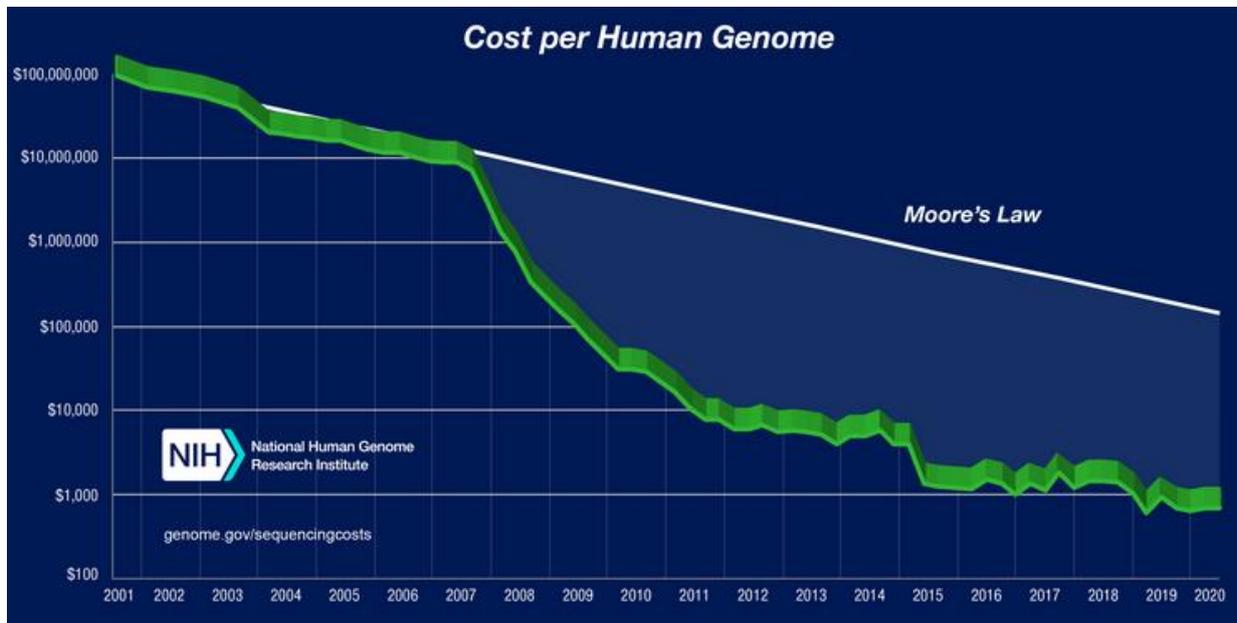
Gráfica I. Mejora en la capacidad de lectura de la secuencia de DNA (kilobases por día) con el desarrollo de la tecnología de secuenciación genética.

DNA sequencing rate



Gráfica I. Stratton et al, 2009. Improvements in the rate of DNA sequencing over the past 30 years and into the future. Nature.

Gráfica II. Disminución de los costes de secuenciación por genoma humano con las mejoras técnicas de secuenciación masiva.



Gráfica II. DNA Sequencing Costs: Data. National Human Genome Research Institute

7. Secuenciación masiva (NGS)

Las técnicas de secuenciación masiva hacen referencia a las nuevas plataformas de secuenciación denominadas de alto rendimiento, nueva generación o NGS (de sus siglas en inglés Next-Generation Sequencing) capaces de generar paralelamente, y de forma masiva, millones de fragmentos de DNA en un único proceso de secuenciación, permitiendo secuenciar de forma simultánea gran cantidad de genes, elevando así significativamente el rendimiento a un menor coste y ofreciendo ventajas significativas respecto a los sistemas convencionales.

La tecnología NGS nos permite detectar cualquier cambio de nucleótido en la secuencia, además de otros cambios a nivel estructural. Los cambios detectados en la secuencia de DNA deben ser posteriormente analizados para categorizarlos y poder clasificarlos según su patogenicidad.

7.1 Clasificación de variantes genéticas

La estandarización y uso de las recomendaciones clínicas es fundamental para que todos los laboratorios clasifiquen las variantes de la misma forma. En 2015, el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (American College of Medical Genetics, ACMG) junto con la Asociación de Patología Médica (Association of Medical Pathology, AMP) publicaron una guía que incluye algunas recomendaciones para la clasificación de variantes (Richards et al., 2015).

No solo es importante que todos los laboratorios usen los mismos criterios a la hora de clasificar variantes, sino que es imprescindible que empleen la misma nomenclatura. Se recomienda usar las pautas de la Sociedad de Variación de Genética Humana (Human Genome Variation Society (HGVS) <http://www.hgvs.org/>).

El estudio de variantes génicas implica normalmente el uso de no uno, sino varios criterios, patogénicos (P) o benignos (B) a distintos niveles de evidencia y el cómputo de todos ellos nos permite clasificar las variantes en 5 clases distintas:

- Benigna (Clase 1),
- Probablemente benigna (Clase 2),
- De significado incierto (Clase 3),
- Probablemente patogénica (Clase 4),
- Patogénica (Clase 5).

Los criterios establecidos por la ACMG para determinar la patogenicidad de una variante son, entre otros, la búsqueda de evidencia de las variantes en bases de datos, criterios sobre el efecto de la variante en la función proteica, descripción de la variante en la literatura científica y predicciones bioinformáticas sobre el efecto en la estructura proteica.

8. Paneles de portadores

Los paneles de portadores son test que realizan el análisis genético de un número determinado de genes asociados a enfermedades de herencia recesiva,

tanto en genes autosómicos como ligados al cromosoma X, lo que nos permite conocer el estado de portador para las diferentes enfermedades que han sido incluidas en el panel.

Según la forma en la que se analizan los datos existen principalmente dos tipos de test de portadores en el mercado.

8.1 Test de genotipado

Este tipo de paneles, independientemente de la técnica que utilicen para secuenciar el DNA, realiza un análisis dirigido de variantes. Es decir, las variantes genéticas que pueden ser detectadas por el test son establecidas previamente al análisis molecular. Así, el resultado que podemos obtener en los test de genotipado son la presencia o ausencia de aquellas variantes definidas de forma previa al análisis de la muestra.

Actualmente existen diferentes paneles de genotipado que son ampliamente utilizados en el ámbito de la reproducción humana asistida. Algo que cabe destacar es que estos paneles de genotipado son muy heterogéneos en cuanto al número y tipo de genes que analiza y en relación al número y tipo de variantes que incluye en sus estudios (Lazarin et al., 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020; Molly et al., 2021)

8.2 Test de secuenciación de gen completo o análisis no dirigido de variantes

Este tipo de paneles utilizan la secuenciación masiva como método de estudio del gen completo y realiza posteriormente el análisis no dirigido de

variantes halladas. A diferencia del anterior, no define previamente qué variantes de interés quiere detectar, sino que analiza todas las variantes encontradas en el proceso de secuenciación de gen completo (regiones codificantes) e informan de todas aquellas variantes que tienen un potencial papel patogénico (variantes clasificadas como patogénicas y/o probablemente patogénicas). Debido a que realiza un análisis no dirigido de variantes, esta técnica presenta mayor capacidad de detectar individuos portadores que los paneles de genotipado (Lazarin et al., 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020).

8.3 Recomendaciones del cribado de portadores según las sociedades científicas

Actualmente, la mayoría de las sociedades científicas recomiendan el cribado genético ampliado en donantes de gametos. Pero la realidad a la que nos enfrentamos se complica debido a que se estima que existen aproximadamente 2880 enfermedades hereditarias recesivas, teniendo en cuenta las enfermedades autosómicas y las ligadas al cromosoma X (OMIM®) y, además, estudios recientes del exoma completo han revelado que todos los individuos somos portadores de entre 2 y 8 variantes patogénicas asociadas a este tipo de enfermedades (Gao Z et al., 2015). Teniendo en cuenta que tecnológicamente tenemos la capacidad de analizar el genoma completo gracias a las plataformas de NGS, existe la necesidad de que las sociedades científicas establezcan unos criterios claros que definan qué enfermedades se deben analizar y cómo realizar el análisis de dichos genes.

Por un lado, la mayoría de las sociedades científicas recomiendan que los paneles de cribado genético ampliados de portadores solo informen de las variantes que afecten claramente a la función del gen (variantes patogénicas y probablemente patogénicas) y que las VUS (Variants of Unknown Significance) no sean reportadas (Edwards et al., 2015; Castilla et al., 2020; CNRHA, 2021).

El documento de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), sobre el cribado genético en donación de gametos (Castilla et al., 2020), ha establecido una serie de recomendaciones focalizadas en el análisis de los estudios genéticos de cribado en los programas de donación de gametos, lo que introduce un matiz importante, ya que incluye la elegibilidad de un/a donante idóneo/a. En este contexto, recopilando la información de documentos previos de otras sociedades: [ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics 2021; Grody et al., 2013), ESHG (European Society of Human Genetics, 2003, Henneman et al., 2016), ESHRE (European Society of Human Reproduction and Genetics, Dondorp et al., 2014), ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologist, 2017), PQF (Perinatal Quality Foundation), SMFM (Society for Maternal-Fetal Medicine) (Edwards et al., 2015) y SEF (Sociedad Española de Fertilidad) (Castilla et al., 2020).], establecen que el estudio de cribado debe incluir:

- Enfermedades hereditarias autosómicas recesivas y recesivas ligadas al cromosoma X, prevalentes y graves
- Enfermedades crónicas, severas y/o progresivas con afectación sensorial, motora o intelectual y con un fenotipo claramente establecido.

- Variantes de significado biológico claro descritas como patogénicas y probablemente patogénicas.

- Variantes de distribución panétnica, "universal", independientemente del origen geográfico del/la donante.

Por otro lado, existe una serie de situaciones que no cumplen los criterios anteriores y serían los criterios de exclusión:

- Variantes de enfermedades de las que apenas existen publicados casos, con poca información sobre supervivencia, con variabilidad en su expresión y penetrancia incompleta.

- Genes que se asocian con un espectro de manifestaciones clínicas, especialmente cuando no existe correlación fenotipo/genotipo y además existen distintas manifestaciones dentro de la misma familia.

- Variantes de factores de riesgo: son variantes patogénicas de baja penetrancia que condicionan un aumento en el riesgo relativo para desarrollar una enfermedad.

- Enfermedades de herencia dominante.

- Enfermedades de herencia mitocondrial.

- Enfermedades de herencia no mendeliana.

- Enfermedades poligénicas.

- Variantes relacionadas con enfermedades benignas.

- Variantes relacionadas con rasgos físicos no patológicos.

- Variantes de significado incierto o sin evidencias clínicas sobre su efecto patogénico.

El desarrollo de las nuevas técnicas de NGS ha permitido elaborar paneles de portadores ampliados de aplicación universal, a coste y tiempo razonables, para todos los donantes de gametos, independientemente a su origen étnico (Arjunan et al., 2016; Azimi et al., 2016; Nazareth et al., 2015; Prior et al., 2014). A pesar de los avances tecnológicos en las técnicas de análisis genético, actualmente no existe un consenso que determine cuáles son las enfermedades que se deben incluir en los test de portadores aplicados a donantes de gametos, ni la forma en que se deben analizar dichos genes, si mediante genotipado o mediante el análisis completo de los genes (Castilla et al., 2020).

Sin embargo, la SEF ha presentado un listado de las 50 enfermedades hereditarias graves de herencia autosómica recesiva y ligada al cromosoma X más comunes en nuestro entorno, que tiene un valor, como indica la propia SEF, meramente aproximado (Tabla I).

Tabla I. Listado enfermedades recesivas graves más comunes en nuestro entorno, según la SEF.

Enfermedad	Gen	Enfermedad	Gen
Déficit de alfa-1 antitripsina	<i>SERPINA1</i>	Enfermedad de Wilson	<i>ATP7B</i>
Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	Enfermedad de Stargardt	<i>ABCA4</i>
Síndrome de Omenn (inmunodeficiencia combinada grave)	<i>DCLRE1C</i>	Síndrome de insensibilidad androgénica	<i>AR</i>
Sordera neurosensorial no sindrómica	<i>GJB2</i>	Miotonía de Thomsen	<i>CLCN1</i>
Hemoglobinopatías y alfa talasemia	<i>HBA1</i>	Tirosinemia tipo 1	<i>FAH</i>
Alfa talasemia	<i>HBA2</i>	Enfermedad de Pompe	<i>GAA</i>
Beta talasemia y drepanocitosis	<i>HBB</i>	Albinismo oculocutáneo tipo 1	<i>TYR</i>
Hiperplasia adrenal congénita	<i>CYP21A2</i>	Enfermedad de Tay-Sachs	<i>HEXA</i>
Déficit de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	<i>G6PD</i>	Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva tipo 2A	<i>CAPN3</i>
Fenilcetonuria	<i>PAH</i>	Homocistinuria	<i>CBS</i>
Atrofia muscular espinal	<i>SMN1</i>	Epidermolisis bullosa distrofica	<i>COL7A1</i>
Paraparesia espástica	<i>SPG7</i>	Amaurosis congénita de Leber	<i>CRB1</i>
Albinismo oculocutáneo tipo II	<i>OCA2</i>	Síndrome del cromosoma X frágil	<i>FMRI</i>
Síndrome de Alport	<i>COL4A3</i>	Mucopolisacaridosis tipo IVa	<i>GALNS</i>
Síndrome de Alport	<i>COL4A4</i>	Enfermedad de Gaucher tipo 1	<i>GBA</i>
Síndrome de Pendred/Sordera	<i>SLC26A4</i>	Hipogonadismo hipogonadotrofo	<i>GNRHR</i>
Déficit de acil-coenzima A deshidrogenasa de cadena media	<i>ACADM</i>	Mucopolisacaridosis tipo IIIC (San Filippo)	<i>HGSNAT</i>
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	<i>DHCR7</i>	Síndrome de Usher 1b	<i>MYO7A</i>
Poliquistosis renal autosómica recesiva	<i>PKHD1</i>	Neuropatía auditiva/sordera	<i>OTOF</i>
Trastorno congénito de la glicosilación 1A	<i>PMM2</i>	Enfermedad de Oguchi/Retinitis pigmentosa	<i>SAG</i>
Enfermedad de Niemann-Pick	<i>SMPD1</i>	Sordera no sindrómica autosómica recesiva	<i>TMPRSS3</i>
Intolerancia a la fructosa	<i>ALDOB</i>	Hipotiroidismo	<i>TSHR</i>
Fiebre mediterránea familiar	<i>MEFV</i>	Hemofilia A	<i>F8</i>
Retinitis pigmentosa autosómica recesiva/ Síndrome Usher tipo 2	<i>USH2A</i>	Hemofilia B	<i>F9</i>
Déficit de acil-coenzima A deshidrogenasa de cadena larga	<i>ACADVL</i>		

Tabla I. Castilla et al. (2020). Genetic screening in gamete donation: Recommendations from SEF, ASES, AEBM-ML, ASEBIR and AEGH.

9. Matching genético

El proceso mediante el que se compara la información genética de ambos progenitores y se establece el riesgo reproductivo se conoce como matching genético. Los test de portadores son estudios genéticos de cribado, dirigidos a conocer el estatus de portador/no portador de determinadas enfermedades de herencia autosómica recesiva o recesiva ligada al cromosoma X, lo que nos va a permitir evaluar el riesgo que presenta la descendencia en relación con las enfermedades incluidas en el estudio. La exactitud y precisión del emparejamiento, va a depender de la cantidad y tipo de genes analizados y de las variantes patogénicas incluidas para cada gen.

El matching genético con gametos de donante se puede clasificar como emparejamiento de alto o de bajo riesgo para la descendencia, en base al siguiente criterio:

- Matching de bajo riesgo: se considera que el matching es de bajo riesgo reproductivo cuando los individuos que aportan los gametos no presentan variantes en genes coincidentes o en genes asociados a la misma condición genética (enfermedades digénicas). En estos casos se podrá proceder a la asignación del gameto de donante, habiendo reducido el riesgo de tener descendencia afecta de enfermedades hereditarias incluidas en el panel. Aun así, siempre existe un riesgo residual de transmitir las enfermedades incluidas en el estudio, debido a la limitación de la técnica aplicada, este riesgo residual dependerá en cada caso del panel de portadores aplicado y de cómo se realice el análisis de variantes.

- Matching de alto riesgo: se considera matching de alto riesgo, cuando los individuos que aportan los gametos presentan variantes patogénicas en genes coincidentes, o en la misma condición genética. En este caso el emparejamiento no se podría realizar, el/la donante no deberá ser asignado y se debe valorar el matching con otro donante de gametos hasta encontrar uno de bajo riesgo.

En el caso particular de la donación de ovocitos, si la donante es portadora de una variante patogénica en un gen de herencia ligada al cromosoma X, se considera una donante de alto riesgo genético. Estas donantes deberían ser descartadas, ya que presentan riesgo de descendencia afecta en caso de tener descendencia masculina, independientemente a la realización del proceso de matching genético.

La elevada heterogeneidad de los paneles disponibles en el mercado determina que exista una alta heterogeneidad de los riesgos reproductivos dependiendo del panel que apliquemos (Lazarin et al., 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020; Molly et al., 2021). Así se demuestra en diferentes estudios en los que la probabilidad de matching genético de alto riesgo presenta grandes variaciones oscilando entre 3-16% (Molina et al., 2020; Martin et al., 2015; Punj et al., 2018).

Es por ello, que es fundamental determinar la influencia que tiene la elección de un determinado test de portadores en el cálculo de los riesgos reproductivos, para poder transmitir esta información de forma clara a las parejas

o pacientes que se dirigen a tratamientos de reproducción asistida con donantes de gametos.

La SEF y la CNRHA recomiendan informar a las mujeres o parejas que necesitan utilizar técnicas de reproducción asistida con donación de gametos de las posibles estrategias existentes para disminuir el riesgo reproductivo de la descendencia y de las limitaciones de las pruebas genéticas aplicadas.

No obstante, hemos de asumir, que dado el carácter sensible y singular de la información genética (que permite la caracterización individual, es permanente, predictiva y puede afectar a parientes biológicos), puede ocurrir que no todos los pacientes acepten realizarse estudios genéticos. Aun así, en el caso de conocerse por algún otro motivo adicional (antecedentes familiares, etc.) que el receptor es portador de una variante patogénica relacionada con una enfermedad recesiva, el estudio del donante debería incluir obligatoriamente el análisis del gen en cuestión para poder asignar un donante de bajo riesgo para la enfermedad de interés.

La CNRHA recomienda que en el caso de que la receptora acepte realizarse un estudio genético de cribado de portadores de enfermedades recesivas, además del cariotipo al donante, la estrategia recomendada para reducir el riesgo de tener descendencia afectada de una enfermedad hereditaria grave recesiva consistirá en seleccionar un donante que no presente variantes patogénicas en alguno de los genes en los que la receptora haya resultado portadora (matching de bajo riesgo). En esta estrategia, se podrán utilizar donantes portadores de variantes patogénicas siempre y cuando, donante y receptor no presenten las variantes patogénicas en el mismo gen. Con esta

estrategia, la disminución del riesgo de tener un niño afecto de una enfermedad genética recesiva solo se aplicará a las enfermedades que se hayan incluido en el estudio genético del receptor o de la receptora.

Sin olvidar que, a pesar de ello, habrá de advertir del riesgo residual ínfimo, pero existente, de tener descendencia afectada de las enfermedades incluidas en el estudio de cribado realizado, por la posible aparición de mutaciones *de novo*, mosaicismo germinal o a causa de las limitaciones técnicas. También es necesario advertir del riesgo de tener descendencia afectada de enfermedades no incluidas en el test de portadores aplicado.

10. Fibrosis quística

En relación con el estudio de enfermedades recesivas graves con alta prevalencia en nuestra población, cabe destacar el papel de la fibrosis quística (FQ), asociada al gen CFTR. A pesar de que no existe un consenso unánime entre las diferentes sociedades científicas sobre qué enfermedades incluir en el estudio de portadores en donantes de gametos, la fibrosis quística ha sido recomendada por todas las sociedades desde 2001 (Watson et al., 2004; Sims et al., 2010, PMID:17055844).

Con una incidencia aproximada de 1 de cada 2500 nacidos vivos, la FQ es una de las enfermedades autosómicas recesivas severas más frecuente en la población caucásica. Está causada por mutaciones en el gen del conducto regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, OMIM602421) (Rebecca et al., 2003). El gen CFTR, codifica la proteína CFTR que ejerce funciones complejas; primariamente es un canal de cloruro activado por AMPc que se ubica

en la membrana apical de las células epiteliales. Además, participa en el transporte de otros iones y en la regulación de otros canales iónicos, como el canal de sodio epitelial o ENaC. La ausencia o defecto funcional de la proteína altera la hidratación de conductos epiteliales y también predispone a mayor adherencia bacteriana.

El gen CFTR abarca aproximadamente 190 kb de DNA y consta de 27 exones (Figura XXI), codifican para un transcrito maduro de aproximadamente 6.5 kb, el cual se traduce en una proteína de unos 1480 aminoácidos de aproximadamente 168 kDa (Ellsworth et al., 2000; Riordan et al., 1989).

Figura XXI. Estructura gen CFTR

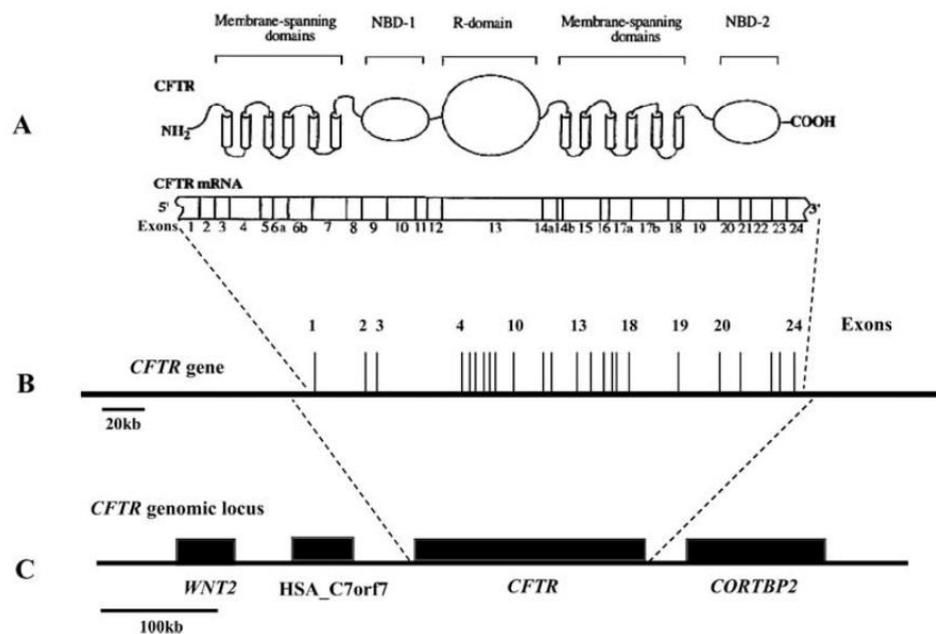


Figura XXI. Rowntree, 2003. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations.

Desde que se clonó el gen CFTR, por primera vez en 1991, localizado en el cromosoma 7q31 (Rommens et al., 1989), más de 2000 variantes de secuencia causantes de enfermedad han sido identificadas gracias a los grandes

avances en las técnicas de biología molecular (Zielenski et al, 1991; Mitchell et al., 2012). La mayoría de las mutaciones son raras, con una frecuencia poblacional $< 0.01\%$.

Si bien existen manifestaciones clásicas y comunes entre los pacientes con FQ (obstrucción pulmonar, insuficiencia pancreática, elevados niveles de cloruro en sudor e infertilidad en hombres), la heterogeneidad clínica es muy amplia entre individuos (O'Sullivan et al., 2009) o incluso hermanos (Castaldo et al., 2006) que comparten el mismo genotipo. Hay pacientes diagnosticados antenatalmente por alteraciones que son aparentes en la vida intrauterina, otros individuos tienen manifestaciones típicas de compromiso crónico de los tractos respiratorios y digestivo y son diagnosticados en la edad pediátrica y otros son identificados como adultos con presentaciones oligosintomáticas como sinusitis crónica, azoospermia o pancreatitis recurrente. Además de estas diferencias en presentación inicial, el curso de la enfermedad es muy variable entre cada grupo. Actualmente se diagnostica FQ cuando se presenta síntomas clínicos clásicos de FQ y una de estas dos situaciones: concentración de cloruro en sudor ≥ 60 mmol/L, o entre 30-59 mmol/L y además se es portador de dos variantes en el gen CFTR causantes de FQ (Farrell et al., 2017). Como vemos puede diagnosticarse de FQ aunque no se detecten variantes en el gen CFTR (Farrell et al., 2017b).

Esta heterogeneidad ha llevado a que se utilicen términos como “FQ no clásica” o “atípica” o de “aparición tardía” para aquellos pacientes que tienen solo un síntoma clásico de fibrosis quística. El consenso actual recomienda

abandonar estos términos, y propone denominar a aquellos pacientes que no cumplen con los criterios diagnósticos de FQ, pero que tienen un único síntoma (agenesia de conductos deferentes/pancreatitis/bronquiectasias) asociado a alteración funcional de CFTR como “Trastornos Relacionados con CFTR” (CFTR-RD). Además, debido a la generalización de los programas de cribado neonatal de FQ, actualmente se considera otra entidad denominada “Síndrome metabólico relacionado con CFTR” (CRMS). El cual se define en niños que tienen un test de cribado neonatal de FQ positivo y además tienen una concentración de cloruro en el sudor <30 mmol/L y 2 variantes en el gen CFTR, siendo al menos una de ellas de consecuencias fenotípicas inciertas o con una concentración de cloruro en el sudor de 30-59 mmol/L y una o ninguna mutación causante de FQ (Farrell et al., 2017).

Esta gran heterogeneidad clínica se puede deber en gran parte al tipo de variantes en el gen CFTR, a la posible influencia de variantes en otros genes diferentes al CFTR y a la interacción de factores ambientales (Lay-Son et al., 2010).

Hasta la fecha, se han descrito aproximadamente 2000 variantes de secuencia en el gen CFTR, repartidos en los 27 exones de codificación y las regiones flanqueantes, más algunas variantes intrónicas profundas, varias reordenamientos grandes y alelos complejos (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>). El consorcio internacional de análisis genético de FQ (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium) inició un estudio destinado a correlacionar todas las variantes con información completa,

actualizada y revisada por expertos, sobre los aspectos funcionales y las consecuencias clínicas de toda mutación listada en su base de datos.

La prevalencia de la FQ en la población caucásica muestra una gran variabilidad entre países (Figura XXII). Para la población caucásica se asume una prevalencia de 1:2500 a 1:6400 (Farrell et al., 2008) que implica una frecuencia de portadores de 1:25 a 1:40.

Figura XXII. Variabilidad de la prevalencia de FQ entre países

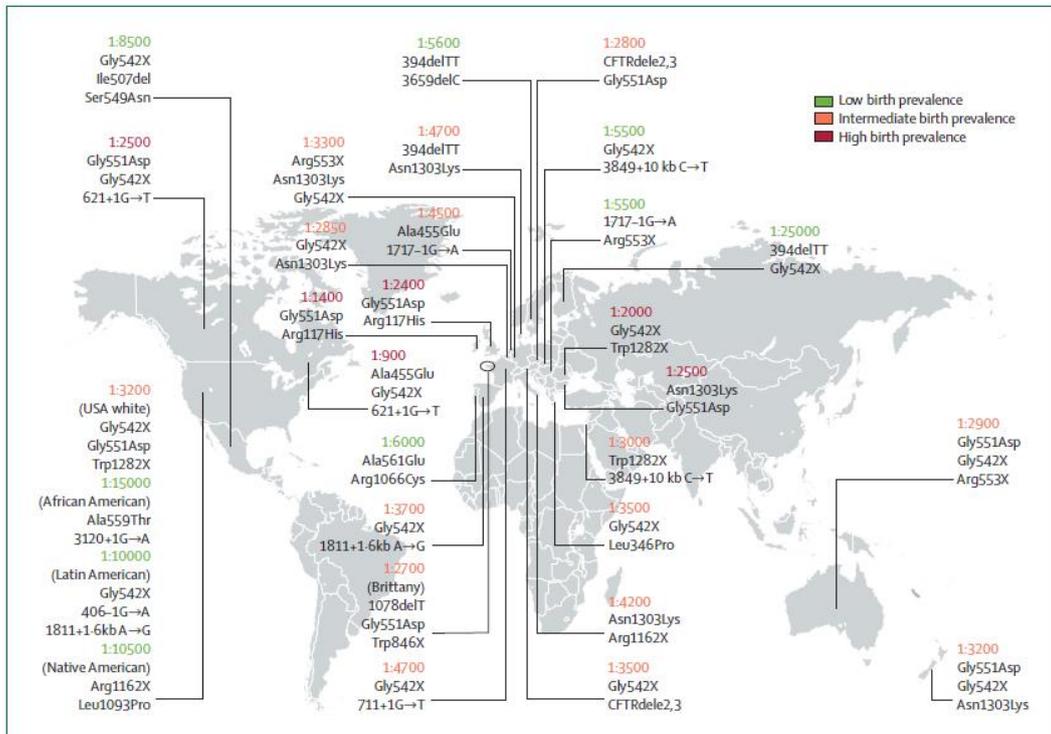


Figura XXII. O'Sullivan. (2009) Incidencia aproximada de FQ en el mundo.

Incluso en España, se han descrito incidencias muy diferentes en varias poblaciones. Estas incidencias varían desde 1/2800 en Asturias (Telleria et al., 2002) y 1/5.905 en Baleares (Gil et al., 2003), pasando por 1/4510 en Castilla León (Telleria et al., 2002) y 1/5.532 en Cataluña (Gartner et al., 2003). La

asociación española de cribado neonatal (AECNE) publicó, en 2016, los resultados del cribado neonatal realizado a 14.117.113 niños durante 16 años. De los resultados se desprendía una incidencia para la FQ de 1/5305 (http://aecne.es/pdf/datos_acumulados_2016.pdf), lo que supone una frecuencia de portadores sanos en torno a 1 de cada 36 personas

La mutación F508del es, de largo, la mutación más prevalente en todas las poblaciones estudiadas en Europa de pacientes con FQ. Sin embargo, su frecuencia depende de la zona geográfica (figura XXIII). En España, el porcentaje relativo de F508del varía desde alrededor del 80% en Asturias (Coto et al., 1994) hasta el 50% en poblaciones mediterráneas (Alonso et al., 2006). Todo indica a que, como se describe en varios trabajos, en la península ibérica se sigue el gradiente de frecuencia relativa de F508del de norte a sur, de mayor a menor frecuencia relativa, tal y como se describe para la población europea (Castellani et al., 2008; Bobadilla et al., 2002). Por todo lo anterior, se estima que la frecuencia de portadores de la variante F508del en la población general es de 1 cada 70 individuos.

- GitHub (<https://github.com/eulaf/CFseq>)
- CFTR-France Database (<https://cftr.iurc.montp.inserm.fr/cgi-bin/home.cgi?>)
- CF Genetic Analysis Consortium (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)

De manera resumida podemos decir que la FQ se asocia con variantes CFTR causantes de FQ “severas”, mientras que CFTR-RD son causadas por combinaciones de una mutación “leve” con una mutación “severa” o combinación de dos mutaciones “leves” (Castellani et al., 2003). Sin embargo, la frontera entre FQ y CFTR-RD puede ser difícil de establecer y la enfermedad se reconoce cada vez más como un continuo de presentaciones clínicas. La clasificación de variantes como de FQ o de CFTR-RD no es absoluta, ya que algunas variantes pueden asociarse con un amplio rango de manifestaciones fenotípicas y ser considerado como causa de FQ y CFTR-RD (Dequeker et al., 2009).

Por todo lo anteriormente mencionado, por el gran número de variantes descritas y su variabilidad genética y fenotípica, el estudio de portadores de FQ en población sana es una tarea compleja. Existe una amplia variedad de paneles de mutaciones del gen CFTR que estudian un número limitado de variantes, dirigidas al estudio de diferentes poblaciones y grupos étnicos. Teóricamente estos paneles incorporan distintas variantes en base a criterios de frecuencia poblacional y gravedad fenotípica. Dada la gran diversidad de variantes descritas en el gen CFTR, la detección de individuos portadores de fibrosis quística utilizando estos paneles dirigidos es limitada. Esta limitación es especialmente

aparente en subpoblaciones como la hispánica, en la que las mutaciones no están suficientemente bien caracterizadas a pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho (Anja Kammesheidt et al., 2006). Además, si consideramos la existencia de diferentes clasificaciones de las formas clínicas de FQ reconocidas, como la forma clásica, trastornos relacionados con la FQ (enfermedad pulmonar sin enfermedad pancreática, pancreatitis aislada, sinusitis crónica, y/o enfermedad pulmonar en adultos) y la ausencia bilateral congénita de vasos deferentes de forma aislada (Rebecca et al., 2003; Charles et al., 2011), un mismo test genético puede tener diferentes tasas de detección, dependiendo de si su aplicación va dirigida hacia alguna forma clínica determinada (Marco et al., 2016).

Debido a la alta prevalencia de FQ, todas las sociedades científicas recomiendan el cribado de fibrosis quística en donantes de semen (Charles et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de ellas no especifican de forma detallada los siguientes aspectos: en primer lugar, qué variantes deben ser incluidas en el estudio y cuáles no, en segundo lugar, si el screening debe ir dirigido hacia una forma clínica determinada o a todo el espectro de síntomas clínicos asociados a fibrosis quística, y en tercer lugar, tampoco especifican si el gen CFTR debe estudiarse por secuenciación completa y análisis no dirigido de variantes o bien si debe estudiarse mediante un panel de variantes dirigido, también conocido como test de genotipado. Actualmente, la CNRHA, en sus recomendaciones sobre el estudio de donantes de gametos, indica que el cribado de CFTR debe incluir variantes patogénicas con elevada frecuencia y que presenten evidente

asociación al desarrollo de fenotipo grave de fibrosis quística, pero no especifica cuáles son esas variantes (CNRHA, 2021).

11. Síndrome X-Frágil (SXF)

El síndrome del X Frágil (OMIM #300624) (SXF) es la causa más común de discapacidad intelectual hereditaria, con una incidencia estimada de aproximadamente 1 de cada 4000 hombres y 1 de cada 5000-8000 mujeres, siendo la principal causa hereditaria conocida de autismo (Hagerman et al., 2002, Biancalana et al., 2015). Los varones afectados presentan retraso mental de leve a severo, con retraso en la adquisición del lenguaje y problemas en el comportamiento. Además de los déficits cognitivos, el fenotipo incluye características dismórficas leves.

Es causado por la expansión inestable de tripletes CGG en la región 5'-UTR del gen FMR1 durante la gametogénesis. Según el número de repeticiones de tripletes CGG, el estado del gen se puede clasificar en 4 grupos (Maddalena, 2001): alelo normal (<45 repeticiones CGG); alelos intermedios (45-54 repeticiones CGG), premutaciones (55-200 repeticiones CGG) y mutación completa (>200 repeticiones CGG).

La presencia de más de 200 repeticiones CGG (mutación completa) resulta en el silencio transcripcional y la consecuente ausencia de la proteína FMR1 (Oberle et al., 1991, Pieretti et al., 1991, Verkerk et al., 1991) y es la que se asocia a fenotipo clásico de SXF. Mientras que el estado de premutación se asocia al desarrollo del síndrome de temblor y ataxia asociado al X Frágil, que

se manifiesta principalmente en varones con temblores, pérdida de coordinación y deterioro de la función mental, y con la insuficiencia ovárica primaria asociada al X Frágil en mujeres.

La inestabilidad de la repetición de tripletes CGG en FMR1 está influenciada por el tamaño de la repetición, su estructura interna, número de interrupciones AGG y el sexo del progenitor transmisor. La transmisión de una mutación completa se produce exclusivamente a partir de mujeres que son portadoras de una mutación completa o de una premutación FMR1 (Biancalana et al., 2015; Nolin et al., 2019). Para mujeres que son portadoras de alelos de premutación, el riesgo de transmitir un alelo en el rango de mutación completa a la descendencia varía en función de la longitud de la repetición (número de tripletes CGG) y del número de interrupciones AGG. Nolin y colegas (Nolin et al., 2003; Nolin et al., 2015), en su estudio revisan la probabilidad de expansión de premutación a mutación completa en más de 1500 transmisiones de mujeres. Un punto clave es que se ha observado que la estructura de repeticiones CGG en el gen FMR1 presenta repeticiones AGG intercaladas (denominada "interrupciones AGG") que al parecer dan estabilidad al gen, mayor estabilidad cuanto mayor es el número de interrupciones AGG. Varios estudios han demostrado que los alelos de premutación sin interrupciones AGG presentan mayor riesgo de expansión en la siguiente generación que aquellas premutaciones que presentan interrupciones AGG (Nolin et al., 2015; Nolin et al., 2013; Yrigollen et al., 2012).

Existen además diferencias notables en los patrones de inestabilidad materna y paterna. En las transmisiones maternas la frecuencia de expansión aumenta en la medida en que aumentan el número de repeticiones CGG, mientras que en las transmisiones paternas se observa que las repeticiones sufren un fenómeno de acortamiento, que es mayor cuanto mayor es el número de repeticiones CGG (Nolin et al., 2019). De manera que el riesgo de transmisión se asocia a la vía materna y es por ello, que el estudio de portadores para el síndrome de X-Frágil solo se realiza en mujeres receptoras y en donantes de ovocitos, mientras que no se recomienda su estudio en donantes de semen o varones (Nolin et al., 2019; Castilla et al., 2020), ya que el riesgo de transmisión asociado a la vía paterna existiría cuando el varón que aporta el gameto presentara el gen FMR1 en estado de mutación completa, con número de repeticiones elevado, lo que haría que el donante de semen presentase clínica de síndrome de X frágil y fuera descartado por presentar la clínica de la enfermedad.

12. Cariotipo

Diferentes sociedades científicas recomiendan, en mayor o menor medida, la realización de cariotipo a donantes de gametos (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology, 2013; Clarke et al., 2019; EDQM, 2019; Health Canada Directive, 2019; Castilla et al., 2020). Sin embargo, la prevalencia descrita de alteraciones cromosómicas en esta población es muy diferente según los autores, habiéndose descrito en donantes de semen una

frecuencia en torno a un 0.6% (Siffroi et al., 2004) y en donantes de ovocitos entre el 0.7% (Siffroi et al., 2004) y un 11.7% (Ravel et al., 2007). Ninguna de estas guidelines establece cómo interpretar los resultados obtenidos, pues es discutido la repercusión de determinadas alteraciones cromosómicas, como los polimorfismos cromosómicos, en la capacidad reproductiva (Tempest y Simpson, 2017; Hastings et al., 2007; Cheng et al., 2017; Akbas et al., 2012).

13. Motivos de exclusión de donantes según el riesgo reproductivo

Entre los motivos de exclusión de un/a donante de gametos en relación con el riesgo genético reproductivo, en base a los resultados de cariotipo y test de portadores, según las recomendaciones de la SEF y de la CNRHA, están:

1. Donantes de ovocitos portadoras de alguna variante patogénica en algún gen de herencia recesiva ligada al cromosoma X. En el caso de donantes de semen con enfermedades ligadas al cromosoma X se descartarán por anamnesis y clínica.
2. Ser portador/a de un reordenamiento cromosómico equilibrado detectado en el cariotipo. Los reordenamientos de riesgo detectables por cariotipo son:
 - a. Translocaciones recíprocas
 - b. Translocaciones Robertsonianas
 - c. Inversiones pericéntricas y paracéntricas
3. Alteraciones cromosómicas numéricas de los cromosomas sexuales (47,XXX, 47 XYY) o mosaicos.

4. Historia clínica personal o familiar que sugiera un aumento del riesgo reproductivo, respecto al poblacional, para alguna enfermedad hereditaria.
5. Aquéllos cuya donación, con arreglo a los antecedentes familiares recogidos o al cribado genético básico realizado, presenten riesgos de transmitir una enfermedad grave en los descendientes que pudieran ser generados a partir de la donación.
6. Aquéllos en los que se haya diagnosticado una enfermedad genética hereditaria en una persona nacida mediante técnicas de reproducción humana asistida en las que se hayan utilizado sus gametos donados y dicha enfermedad sea atribuible al donante.
7. Serán excluidos, a excepción de su uso mediante el mencionado emparejamiento genético, los portadores de:
 - a. Fibrosis quística: portadores de variantes patogénicas con elevada frecuencia y que presenten evidente asociación con el desarrollo de un fenotipo grave de fibrosis quística.
 - b. Sordera neurosensorial no sindrómica (GJB2)
 - c. Hemoglobinopatías (HBA1/HBA2/HBB)
 - d. Atrofia muscular espinal (SMN1)
8. En cuanto a los polimorfismos cromosómicos, el criterio está siendo revisado en el momento actual. Existen datos que indican una relación entre ciertas variantes polimórficas y la ineficacia reproductiva (Tempest y Simpson, 2017). No obstante, el nivel de evidencia sigue siendo débil, no existe un consenso en la comunidad científica sobre si estas variantes afectan de forma directa a la capacidad reproductiva y si tiene algún riesgo

para la descendencia. Asimismo, el estatus de portador/a de un polimorfismo cromosómico puede estar infradocumentado habida cuenta que el estándar en información y manejo de estos reordenamientos recomienda no comunicar estos hallazgos en los informes clínicos (Hastings et al., 2007).

14. Asesoramiento genético a pacientes y donantes

El asesoramiento genético es un proceso comunicativo en el transcurso del cual un profesional especializado proporciona información médica compleja al paciente y / o familiares de forma sencilla respecto a la enfermedad genética, su herencia, el riesgo de recurrencia y las opciones disponibles.

Los profesionales implicados en el proceso de asesoramiento genético pretenden ayudar al paciente y/o familiares a:

- Entender los conceptos médicos de la enfermedad, incluyendo el diagnóstico, curso, causas y manejo clínico.
- Saber cómo la herencia contribuye a la patología y el riesgo de recurrencia u ocurrencia en la familia.
- Entender las alternativas para reducir el riesgo de ocurrencia o recurrencia.
- Elegir la actuación más apropiada en función del riesgo, las opciones disponibles y los principios éticos y / o religiosos.
- En caso de disponer de estudio genético, entender las implicaciones, ventajas y limitaciones del estudio y los resultados que se pueden derivar, así como sus consecuencias.

El objetivo final del proceso de asesoramiento genético es facilitar toda la información necesaria para ayudar a la toma de decisiones de acuerdo con los valores y creencias del paciente y actuar en concordancia con la decisión tomada, sin ejercer presión o coacción sobre la decisión que tomen los pacientes. De forma tradicional se ha definido como un proceso “no directivo”, destinado a proporcionar suficiente información a los pacientes para la toma de decisiones respecto a la realización de un estudio genético, en este caso, para decisiones reproductivas.

Es especialmente relevante destacar que toda esta información debe ser manejada bajo los principios del asesoramiento genético, anterior y posterior al estudio genético, de forma que cada pareja entienda qué tipo de estudio se va a realizar, las limitaciones de este, los resultados que se han obtenido y las posibles alternativas en base al resultado obtenido. Además, se deben valorar la posibilidad de hallazgos inesperados en el momento del estudio o posteriores a lo largo del tiempo, que pudieran tener alguna implicación sobre el propio donante o la descendencia procedente de los gametos de este.

En la mayoría de los casos se puede establecer con claridad la benignidad o patogenicidad de las variantes halladas en los estudios de portadores, pero en ocasiones la secuenciación de un gen conlleva la aparición de variantes cuyo efecto clínico, hoy en día, no podemos interpretar, o bien variantes patológicas no relacionadas con la indicación del estudio. A las primeras se la conoce como variantes de significado incierto o desconocido (VUS, variants of uncertain significance) y a las segundas como hallazgos incidentales o secundarios.

Por otra parte, debemos tener en cuenta que cabe la posibilidad de que tiempo después de haber realizado el estudio aparezca una nueva interpretación de las variantes halladas, o bien que, tras conseguir un embarazo, durante la gestación, tras el parto, o en cualquier otro periodo de la vida del individuo nacido, se descubran resultados genéticos o se diagnostiquen cuadros clínicos que tengan una causa genética hereditaria. En este escenario se plantea la necesidad de recontactar con los individuos que se realizaron el estudio genético de cribado ampliado de portadores, e incluso, si en la técnica de reproducción asistida se usaron gametos de donante, con las mujeres o parejas que utilizaron el mismo donante, a fin de valorar las implicaciones que podría tener esta nueva información en su descendencia actual o futura.

En resumen, el uso de estudios genéticos en el campo de la reproducción humana, unido a las limitaciones de la tecnología y su continuo avance, obliga a los especialistas en reproducción a familiarizarse en su práctica clínica con el manejo e interpretación de la información genética y con situaciones que serán relevantes tanto para los usuarios involucrados como para sus familiares:

1. Variantes de significado incierto o desconocido (VUS)

Dado que su efecto biológico es incierto y por lo tanto su patogenicidad no está demostrada, existe un consenso científico acerca de la conveniencia de no informar de su hallazgo a los portadores (ni pacientes, ni donantes). Se recomienda que no sean reportadas en los informes clínicos que reciben los profesionales. Los usuarios deben saber que dicha interpretación puede variar en el futuro, según el estado del conocimiento, las evidencias y los avances

científicos que ocurran. Así consta en el documento informativo y de consentimiento sobre estudios genéticos publicados por la SEF y por la CNRHA.

2. Hallazgos incidentales o secundarios

La secuenciación completa del exoma y del genoma conlleva un potencial riesgo de hallazgos incidentales, es decir, descubrir resultados que no eran el objetivo primario del estudio, pero que pudieran ser de utilidad para el profesional sanitario y para el propio paciente. Se ha publicado que su frecuencia de aparición oscila entre el 3,4-4,8%. (Green et al, 2013; 2016).

Existe un debate en la comunidad científica sobre si debemos o no informarlos. Aunque en el contexto de la medicina diagnóstica, la presencia de hallazgos incidentales supone un añadido y una oportunidad para el paciente de poder llegar al diagnóstico, en el caso de los individuos sanos, que realizan un estudio genético de cribado ampliado de portadores con una finalidad reproductiva, su manejo supone un desafío. La decisión sobre informar o no sobre los hallazgos incidentales es compleja y podría depender de si revelar el hallazgo tiene una repercusión clínica (variante de enfermedad) y una utilidad (existe tratamiento). El Colegio Americano de Genética y Genómica, “The American College of Medical Genetics and Genomics” (ACMG) en sus recomendaciones publicadas en 2014 (Green et al., 2013) y actualizadas en 2016 (Kalia et al., 2017) establece un listado de 59 hallazgos patogénicos o probablemente patogénicos que deberían ser informados a los pacientes. En cualquier caso, la Ley de Investigación Biomédica establece que debe ser el paciente, antes de realizar el estudio, quien, tras el pertinente asesoramiento

genético, decida mediante un documento de consentimiento si quiere recibir o no esa información. Hay que considerar que el paciente en cualquier momento puede modificar su deseo inicial de ser informado, como consta en el documento informativo y de consentimiento sobre estudios genéticos publicados por la SEF (2017), donde también se prevé que el paciente pueda decidir que la decisión sobre informar o no recaiga en el equipo médico, opción que se antoja aconsejable dada la dificultad para una persona sin conocimientos científicos avanzados de prever todas las implicaciones clínicas de los datos que se obtengan (hay que tener en cuenta que la citada Ley de investigación biomédica se dictó en 2007, antes de que se generalizara la secuenciación masiva y los procedimientos de obtención de información a gran escala).

El mero hecho de contactar de forma inesperada con donantes o pacientes generará en éstos preocupación, desconfianza, inquietud y desasosiego. En el caso de las parejas puede llegar a afectar a su relación o incluso a la relación con su propio hijo, pudiendo generar un sentimiento de rechazo o estigmatización. Por lo que será recomendable contar con un asesoramiento psicológico adecuado.

El Colegio Americano de Genética y Genómica (ACMG) propone que se debe informar a los antiguos pacientes sobre cualquier información genética que afecte a su salud (Wolf et al., 2018). Por otra parte, anima a que los médicos inviten a que los pacientes que hayan realizado algún estudio genético comuniquen a sus genetistas o consejeros genéticos cualquier cambio “relevante” en sus vidas (modelo “joint venture”) (Dheensa et al., 2017). Sin

embargo, hasta la fecha actual no está clara la postura de las diferentes sociedades europeas.

Uno de los pocos trabajos que explora la opinión de los pacientes sobre esta cuestión (Dheensa et al., 2017) muestra cómo la mayoría de los participantes opina que sólo se les debería recontactar si la información que se les va a proporcionar es significativa y además consideran que es un deber por parte de los facultativos que solicitaron la prueba. Por supuesto consideran esencial que se respete su privacidad y confidencialidad.

A la vista de los argumentos anteriores, y teniendo en cuenta también la experiencia clínica, se considera que el criterio para decidir si recontactar o no con los pacientes y donantes estaría claramente por debajo de los casos de “reacción adversa grave” y debería de fijarse en aquellas situaciones con trascendencia clínica significativa para la receptora, la descendencia o para los propios donantes (pensando en su proyecto reproductivo futuro), a juicio del equipo médico. Es decir, que procedería recontactar en aquellos supuestos en los que la patología es relevante para la salud del afectado y, razonablemente, es posible tomar alguna medida preventiva o curativa. Debido a la complejidad de la información genética y a sus numerosas implicaciones, es recomendable que los pacientes (y donantes) deleguen en el equipo médico la decisión sobre cuándo procede recontactarles, tanto para el supuesto de nuevos hallazgos en los estudios personales como en los estudios ampliados de los donantes que, en su caso, se hubieran producido.

El avance en el desarrollo tecnológico y en el conocimiento y el entendimiento de las bases genéticas de las enfermedades obliga a los profesionales que trabajan en el ámbito de la medicina reproductiva a profundizar en el conocimiento de las bases genéticas y a adaptar estos avances a la práctica clínica diaria. Como hemos visto a lo largo de esta introducción, el cribado genético de donantes de gametos, realizado bajo un asesoramiento genético anterior y posterior a los test genéticos aplicados, es fundamental en los bancos de gametos actuales. Siendo uno de los aspectos más controvertidos el cómo implantar las nuevas tecnologías de NGS en dicho cribado con la intención de disminuir el riesgo reproductivo.

Hipótesis

1. Hipótesis

El cribado genético de portadores de enfermedades recesivas, especialmente de fibrosis quística, en donantes de gametos tiene la misma seguridad reproductiva si se realiza mediante la secuenciación completa del gen (NGS) o mediante el análisis dirigido de variantes (genotipado).

Los diferentes test de genotipado utilizados habitualmente como test de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos en el ámbito de reproducción humana asistida en España presenta alta homogeneidad en cuanto a las variantes analizadas en genes comunes.

Justificación y Objetivos

1. Justificación

El cribado genético basado en la historia clínica personal y familiar, cariotipo y test de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos persigue disminuir el riesgo de transmitir enfermedades hereditarias a la descendencia.

En los últimos años, uno de los cambios más relevantes que se han desarrollado en este campo ha sido el avance en las técnicas de secuenciación de DNA y la capacidad de análisis de los datos obtenidos. La llegada y mejora de las técnicas de secuenciación masiva ha supuesto una revolución en el ámbito de la investigación básica y también en la medicina aplicada, su desarrollo ha permitido aumentar su rendimiento tecnológico y disminuir sus costes, por lo que ha facilitado su uso en la práctica clínica diaria de forma general, y en las clínicas de reproducción asistida y en los bancos de gametos, de forma específica.

El problema al que nos enfrentamos es que el avance tecnológico y el avance en el conocimiento científico no van acompañados de una actualización en la legislación que regula estos procesos y, en muchas ocasiones, tampoco en las recomendaciones de práctica clínica publicadas por diferentes sociedades científicas. En el caso del cribado genético en donantes de gametos no existen criterios claramente establecidos de cómo se debe proceder y, como consecuencia, no hay unanimidad en los criterios y en los test genéticos que se aplican en los diferentes bancos de gametos, ni en los test de cribado de portadores que elaboran diferentes compañías genéticas.

La heterogeneidad existente en los criterios y en los test genéticos utilizados en el cribado de portadores en donantes de gametos puede repercutir de forma directa sobre los riesgos reproductivos, incluso cuando los pacientes recurren a tratamientos de reproducción asistida con donantes de gametos seleccionados mediante matching genético, proceso actualmente recomendado por varias sociedades científicas. Cabe destacar el caso de la fibrosis quística, debido a que su estudio en donantes de gametos es recomendado por la mayoría de las sociedades científicas, nacionales e internacionales, y presenta una alta variabilidad genotípica y fenotípica. Estos dos factores dificultan especialmente la interpretación de los datos genéticos obtenidos en el cribado de la fibrosis quística.

Por ello, resulta fundamental analizar, estudiar y evaluar los diferentes test genéticos actualmente disponibles en el mercado y que son utilizados, tanto en España como en el extranjero, como cribado de portadores en donantes de gametos. Existen recomendaciones generales en relación a la elaboración de estos test de portadores, pero se desconoce su rendimiento y la repercusión que puede suponer la aplicación de cada uno de ellos en los tratamientos de reproducción asistida con gametos donados.

2. Objetivos

1. Analizar la frecuencia de portadores de alteraciones y polimorfismos cromosómicos en donantes de gametos.

2. Determinar la frecuencia de portadores de enfermedades recesivas en donantes de gametos que han sido analizados mediante secuenciación completa de los genes y comparar los resultados con los que se habrían obtenido si se hubieran aplicado los 3 test de genotipado que se usan comúnmente como cribado de portadores en los diferentes bancos de gametos en España.
3. Determinar la frecuencia de portadores de fibrosis quística en donantes de gametos en España cuando son analizados mediante secuenciación completa del gen CFTR y comparar los resultados con los que se habrían obtenido si se hubieran aplicado los 4 test de genotipado de CFTR que son ampliamente utilizados en los diferentes bancos de gametos en España.
4. Determinar la probabilidad de matching de alto riesgo en tratamientos de reproducción asistida que utilizan doble donación de gametos cuando se aplican los test de portadores de enfermedades recesivas mediante secuenciación completa del gen y estimar la probabilidad de matching de alto riesgo que se hubiera obtenido aplicando los test de genotipado.

Materiales y Métodos

1. Población

Entre enero de 2017 y agosto de 2020, 5879 personas interesadas en la donación de gametos, con edad comprendida entre 18 y 35 años, se incluyen en un proceso de selección en el programa de donación de gametos, que consta de tres fases secuenciales: en primer lugar, se realiza una entrevista informativa; en segundo lugar, se realiza la recogida de la historia clínica personal y familiar y evaluación psicológica; y en tercer lugar, se realiza una exploración física y análisis de semen o ecografía vaginal, en varones o mujeres, respectivamente.

2. Proceso de selección en el programa de donación (Figura 1):

2.1 Entrevista informativa e historia clínica

Se realiza una entrevista a los 5879 interesados en la donación de gametos, 4125 candidatos a donantes de semen (CDS) y 1754 candidatas a donantes de ovocitos (CDO), y se les informa de las características del proceso de donación y de las implicaciones que puede conllevar cada parte del proceso. Tras informarles y resolver cada una de sus dudas, los candidatos a donantes aceptan o rechazan continuar con el proceso de selección de donantes de gametos. Los candidatos interesados firman un consentimiento informado en el que queda reflejado por escrito toda la información que le ha sido proporcionada en la entrevista. Además, en esta primera entrevista se les informa de que sus datos serán incluidos en el registro nacional de donantes de la plataforma SIRHA, perteneciente al Ministerio de Sanidad. Es en este momento en el que a

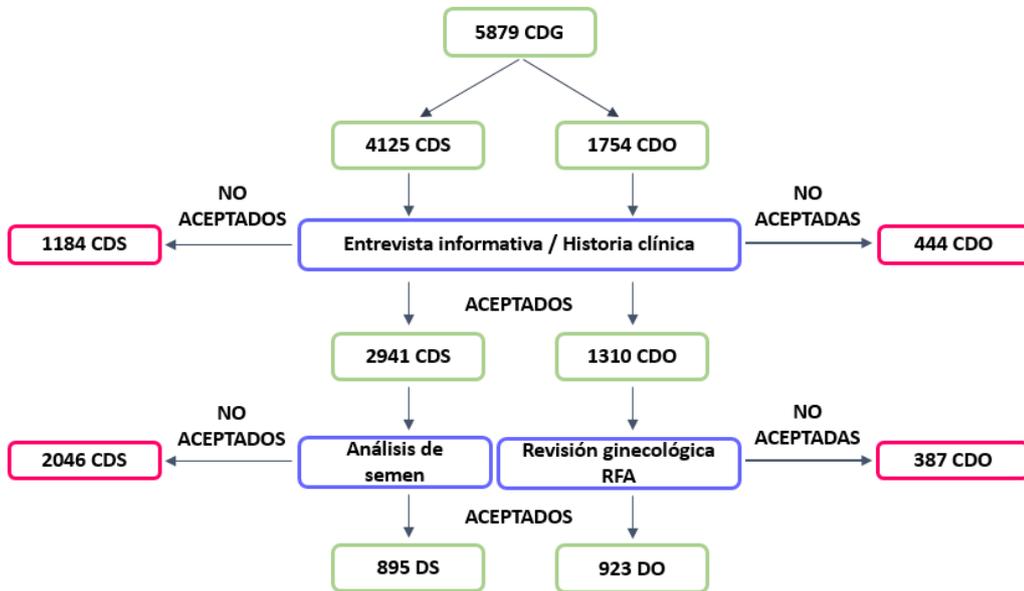
los candidatos se les asigna un código de donante para continuar con el proceso de forma anónima.

A pesar de que los consentimientos informados elaborados en el banco de gametos cumplen con los requerimientos legales en España (Ley 14/2006, del 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida) y con las recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad (<https://www.sefertilidad.net/index.php?seccion=biblioteca&subSeccion=consentimientosESP>), parte de este estudio fue aprobado por el comité de ética (Anexo I).

A los candidatos que aceptan las condiciones en la entrevista informativa previa se les realiza la recogida de la historia clínica personal y familiar en la que se incluye información clínica de 4 generaciones familiares, lo que nos permite descartar donantes afectados de alguna patología y sospechar la presencia de enfermedades con herencia dominante, alteraciones familiares en el cariotipo, o enfermedades multifactoriales que presenten un patrón de agregación familiar y que pudieran conllevar un aumento del riesgo reproductivo, con respecto al riesgo poblacional, para la descendencia. Se descartan aquellos candidatos que presenten una historia clínica personal o familiar que sugiera un aumento del riesgo reproductivo, respecto a las entidades previamente descritas, para la descendencia de estos individuos.

Finalmente, tras la entrevista y recogida de la historia clínica, 2941 candidatos a donantes de semen y 1310 candidatas a donantes de ovocitos siguen en el proceso.

Figura 1. Diagrama de flujo con los criterios de inclusión en el programa de donación de gametos.



CDG = Candidatos a donantes de gametos; CDS = Candidatos a donantes de semen; CDO = Candidatas a donantes de ovocitos; DS = Donantes de semen; DO = Donantes de ovocitos; RFA = Recuento de folículos antrales.

2.2 Análisis de semen

A los 2941 varones que continúan, se les realiza un análisis de semen. Todas las muestras de semen fueron obtenidas en el banco de gametos mediante masturbación tras 3-5 días de abstinencia sexual. Son aceptados los candidatos cuyos parámetros seminales cumplen los criterios de calidad seminal mínimos establecidos por el banco de gametos, los cuales son superiores a los valores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) (Tabla a).

Tabla a. Valores mínimos de calidad seminal establecidos como criterios de aceptación en el programa de donación de semen en nuestro estudio y los valores de referencia establecidos por la WHO (WHO, 2010).

Parámetros Seminales	Criterios aceptación Banco de Semen	Límites referencia WHO 2010 Percentil 5º (95% IC)
Concentración total (millones/mL)	>60	15 (12-16)
Movilidad progresiva (%)	>50	32 (31-34)
Morfología normal (%)	>4.0	4 (3.0-4.0)
Volumen seminal (mL)	>1.5	1.5 (1.4-1.7)

IC = Intervalo de confianza

Las muestras que cumplen los criterios de calidad seminal establecidos son sometidas a un proceso de crioconservación y posterior descongelación, para valorar la concentración de espermatozoides móviles tras la descongelación, si la supervivencia espermática es superior al 50%, los candidatos serán aceptados como donantes de semen.

Tras el análisis seminal y posterior test de descongelación 895 candidatos a donantes de semen son aceptados como donantes de semen (DS).

2.3 Revisión ginecológica y recuento de folículos antrales

Se realiza exploración física y ecografía vaginal para valoración ginecológica a 1310 CDO. Se establece como criterio de selección en base al recuento de folículos antrales (RFA):

- Mujeres con recuento de folículos antrales mayor a 20 (suma de ambos ovarios), será aceptadas.
- Aquellas candidatas con $RFA \geq 12$ y < 20 serán candidatas a realizarse una determinación de AMH. Si esta es ≥ 2 ng/ml se aceptará.
- Candidatas con $RFA < 12$ serán rechazadas.
- Será criterio de exclusión la presencia de imágenes ecográficas que sugieran patología orgánica. En ese caso, la candidata a donante será correctamente derivada a su médico de referencia. En caso de sugerir patología funcional (por ejemplo, persistencia folicular) citaremos para nueva valoración.

Tras la revisión ginecológica 923 candidatas a donantes de ovocitos son aceptadas como donantes de ovocitos (DO).

3. Análisis genético en donantes de gametos

Se realiza el estudio del cariotipo y un test de portadores ampliado de enfermedades recesivas a los 1818 donantes de gametos (DG) que han sido aceptados en el programa de donación, 895 DS Y 923 DO.

3.1 Cariotipo

Los análisis cromosómicos se realizaron en linfocitos de sangre periférica obtenida en tubo de heparina sódica. Se realiza el cultivo por técnica convencional con fitohemaglutinina (PHA) durante 72 horas y sacrificio del cultivo por adición de colchicina durante 2 horas. Se aplicaron técnicas de bandeado GTG usando protocolos estándar y se analizaron un total de 20 metafases con el análisis completo de cinco cariotipos.

En los casos de mosaicismo, se analizan entre 30 y 50 metafases con análisis completo de 10 metafases.

En la descripción de los cariotipos se empleó la nomenclatura sugerida por el ISCN 2016 (Internacional System for Human Cytogenetic Nomenclature 2016) (Simons et al., 2016).

3.1.1 Clasificación de variantes halladas en el cariotipo

Las variantes halladas en los cariotipos se clasifican como alteraciones cromosómicas o polimorfismos en base a los siguientes criterios:

- Alteraciones cromosómicas: aquellas variantes que se han descrito en las bases de datos, o en la bibliografía, asociadas a desarrollo de enfermedad, o aquellas variantes estructurales que pueden producir gametos desequilibrados.
- Polimorfismos: aquellas variantes que presentan alta frecuencia poblacional y que no se han descrito en las bases de datos, ni en la bibliografía asociadas a patología.

3.2 Test de portadores mediante NGS

El test de portadores realizado en nuestro estudio (qCarrier Plus test, qGenomics) utiliza la tecnología de secuenciación masiva (NGS), que realiza el estudio completo de los exones codificantes de cada gen y el análisis no dirigido de variantes, en 302 genes asociados a enfermedades con herencia recesiva (246 genes autosómicos y 57 genes ligados al cromosoma X).

Se realiza el análisis de todas las variantes halladas en los exones codificantes, en las regiones de unión intrón-exón (+/- 5 nucleótidos) y en ciertas regiones reguladoras.

De forma específica, para el análisis del gen CFTR, se realiza la secuencia del gen completo (exones e intrones). Para este gen se analizan, como para el resto de genes, las variantes encontradas en regiones exónicas, regiones de unión intró-exón (+/- 5 nucleótidos) y, además, se analizan aquellas variantes que se encuentran en regiones intrónicas profundas que han sido previamente clasificadas como patogénicas por ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

Para el análisis de los datos, se utilizan las lecturas de alta calidad, con un error de secuencia promedio menor a 1 base de cada 1.000. Esta técnica es capaz de detectar variantes de un solo nucleótido (SNV) y pequeñas inserciones y deleciones (indels) de hasta 9 nucleótidos, con alta sensibilidad (SNV> 99%; indels> 85%) y elevada especificidad analítica (> 99%).

Para obtener este nivel de rendimiento, las muestras se secuencian con valores de cobertura vertical promedio elevados, generalmente > 150X. Esto

asegura que la gran mayoría de las bases secuenciadas (>96%) se lean a una profundidad mínima de 30X. A esta profundidad la probabilidad de no identificar una variante heterocigota es muy baja (0,016%), sensibilidad del 99,984% a 30x. Además, con esta cobertura la probabilidad de que un error de secuenciación sea visto a una fracción por encima de 20% de las lecturas es también muy baja, normalmente por debajo del 1%, controlando así la tasa de falsos positivos.

Por otro lado, se identifican las regiones que han sido secuenciadas con valores de profundidad de 15X, valor que se encuentra dentro del rango de profundidad de 10-20X sugeridos en guías referentes, como la del American College of Medical Genetics. A 15X, la probabilidad de ver una variante heterocigota real que tenga una representación menor del 20% es muy bajo, de 3.6 en 1.000 (0,36%, o sensibilidad del 99,64%)

En el caso de hallar variantes patogénicas conocidas en regiones con lecturas a muy baja profundidad se procede a la validación mediante una técnica alternativa (Sanger).

Se realizan otras técnicas genéticas alternativas al NGS:

- Se confirman las variantes en el número de copias (CNVs), detectadas por NGS mediante un algoritmo interno para los genes SMN1, HBA1, HBA2 y DMD, utilizando los kits comerciales disponibles de MLPA SALSA Kits (P60, P140, P34 and P35) procedentes de MRC-Holland (Netherlands).

- Se utiliza la técnica de triplet repeat Primed-PCR (TP-PCR) para el análisis del triplete GAA en el intrón 1 del gen FXN (9q21.11) y se determina el rango de expansión y número de repeticiones de la siguiente forma: Normal (5-33 repeticiones) y mutación completa (>66 repeticiones).
- Se realiza el análisis de repeticiones CGG en la región 5' no traducida del gen FMR1 en todas las donantes de ovocitos, utilizando el kit Amplidex FMR1 PCR CE-IVD (ref. 780002) obtenido de Asuragen (EE. UU.) y se determinan los siguientes rangos de expansión: normal (5-44 repeticiones), mutación intermedia (45-54 repeticiones), premutación (55-200 repeticiones) y mutación completa (>200 repeticiones). Se informa, además, de la presencia y del número de interrupciones de la estructura triplete (CGG)_n (conocido como interrupciones AGG). El estudio del gen FMR1 no se realiza en donantes de semen.
- Para el gen F8, se realiza el estudio de la inversión recurrente, que afecta al intrón 22 (Inv22), mediante la reacción en cadena de la polimerasa de desplazamiento inverso (IS-PCR).

3.2.1 Interpretación de variantes halladas mediante NGS

Todas las variantes halladas fueron clasificadas en tres categorías: variantes patogénicas, variantes benignas y variantes de significado incierto (VUS), de acuerdo a los siguientes criterios.

- Variantes patogénicas (incluye las variantes patogénicas y/o probablemente patogénicas), se realiza el análisis secuencial de las variantes en las siguientes bases de datos y se clasifican dentro de este grupo las siguientes variantes:
 - Variantes clasificadas como patogénicas y/o probablemente patogénicas por la base de datos ClinVar (criterio clinvar).
 - Variantes asociadas a enfermedad según la bibliografía científica (criterio bibliográfico).
 - Variantes descritas en la base de datos HGMD (criterio HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).
 - Variantes *de novo* que producen efecto truncante en la proteína (variantes nonsense, variantes que afectan al splicing, variantes de tipo frameshift and grandes CNVs) (Proteínas truncadas).
 - Gen FMR1, los alelos intermedios (45-54 repeticiones CGG), premutaciones (55-200 repeticiones CGG) y mutación completa (>200 repeticiones CGG) son reportadas como variantes patogénicas.

Las variantes patogénicas halladas en el gen FMR1 se clasifican posteriormente, según el riesgo de expansión de tripletes CGG a la siguiente generación, como:

- Riesgo bajo: según la bibliografía la expansión a premutación o mutación completa no se ha descrito.

- Riesgo medio: según la bibliografía la expansión a premutación es posible.
- Riesgo alto: según la bibliografía la expansión a premutación o a mutación completa es altamente probable.
- Gen FXN, los alelos premutados y las mutaciones completas son reportadas como variantes patogénicas.
- Variantes benignas/polimorfismos:
 - Reportadas como benignas o probablemente benignas por ClinVar.
 - Variantes presentes en individuos control en las bases de datos de 1000 genomas (<http://1000genomes.org>), Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) y Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org>).
 - Estas variantes aparecen en la población de forma más frecuente a la esperada, están presentes en individuos controles en homocigosis y no han sido previamente descritas en la bibliografía asociadas a enfermedad.
- Variantes de significado incierto: incluye variantes que no han sido previamente descritas como patogénicas en ClinVar o HGMD, que no están descritas asociadas a enfermedad en la literatura científica y que presentan baja frecuencia poblacional.

4. Análisis de variantes

Para cada una de las variantes halladas en nuestro estudio, se recogen los siguientes datos:

- Clasificación según la consecuencia molecular de la variante: Missense, Nonsense, Frameshift, Splicing o Initiator Codon Variant.
- Número de acceso identificativo a la base de datos ClinVar.
- Identificador dbSNP.
- Clasificación de patogenicidad según ClinVar.
- Reseñas bibliográficas que asocian la variante a la enfermedad.

Para las variantes halladas en el gen CFTR se recogen además los siguientes datos:

- Clasificación de las variantes según la base de datos CFTR2:
 - CC = variante causante de FQ.
 - NCC = variante no causante de FQ.
 - VC = variante asociada a clínica relacionada con FQ.
 - SUE = variante bajo evaluación clínica.
 - N/S = variante no descrita en ClinVar.
- Clasificación de la variante según Castellani et al (2015):
 - A = variante asociada a FQ.
 - B = variante asociada a clínica relacionada con FQ.

- C = variante sin consecuencias clínicas.
 - D = Variante desconocida o con relevancia clínica desconocida.
 - N/S = variante no descrita por Castellani et al (2015).
- Frecuencias de variantes en el gen CFTR:
- Frecuencias obtenidas en nuestro estudio.
 - Frecuencias descritas en GenomAD (base de datos referente para consulta de frecuencias poblacionales de variantes genéticas).

5. Análisis de los test ampliados de portadores mediante genotipado

Los test de genotipado, a diferencia de los test de secuenciación completa del gen, realizan un análisis dirigido de variantes. Las variantes que analiza cada test están definidas previamente a la realización del estudio. El resultado será la presencia o ausencia de las variantes preestablecidas por cada test de genotipado, sin analizar, ni informar, otras posibles variantes presentes, pero no incluidas en el test.

De forma general, se analizan los tres test de genotipado más comúnmente utilizados en el ámbito de la reproducción humana asistida en España:

- Panel H (GEN-F-HERES V1 Full Panel F, Full Genomics): analiza 301 genes.

- Panel I (CGT Plus, iGenomix): analiza 306 genes.
- Panel SG (SG Preconception Focus, Sistemas Genómicos): analiza 299 genes.

Para el análisis específico del gen CFTR, se analizan las variantes del gen CFTR incluidas en los 4 test de genotipado más comúnmente utilizados en el análisis del gen CFTR:

- Panel H (GEN-F-HERES V1 Full Panel F, Full Genomics): analiza 147 variantes.
- Panel I (CGT Plus, iGenomix): analiza 319 variantes.
- Panel SG (SG Preconception Focus, Sistemas Genómicos): analiza 339 variantes en el gen CFTR, que dividen en dos grupos:
 - o 238 variantes asociadas a fibrosis quística
 - o 11 variantes asociadas exclusivamente a la ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (ACBVD).
- Panel E (CFEU2v1 + CF Iberian +CF Poly-T, Elucigene]: analiza 69 variantes. El panel E está dirigido específicamente a población europea e ibérica.

La comparación de los resultados obtenidos en nuestro estudio mediante secuenciación completa de los genes y los que se hubieran obtenido con los test de genotipado se realiza únicamente a nivel teórico. Se determina si los genes o variantes halladas en los donantes de gametos están incluidos en los diferentes

test de genotipado, considerando que si están incluidos en el test hubieran sido detectados y si no están incluidos, no hubieran sido detectados:

- Los genes o variantes detectadas en nuestro estudio, que están incluidos en todos los test de genotipado analizados fueron denominados “genes comunes” o “variantes comunes”, respectivamente.
- Aquellos genes o variantes detectados en nuestro estudio, que están incluidos únicamente en uno de los test de genotipado analizados fueron denominados “genes específicos” o “variantes específicas”.

6. Matching genético

El matching genético es el proceso que permite realizar el emparejamiento de gametos en base a la información genética obtenida en los test de portadores. Consideramos matching de alto riesgo cuando el donante de semen y la donante de ovocitos son portadores de variantes patogénicas en un mismo gen o en una misma condición recesiva, teniendo en cuenta las enfermedades digénicas incluidas en el test realizado en nuestro estudio (PCDH15/CDH23, BBS1/BBS2, GJB2/GJB3/GJB6, SLC3A1/SLC7A9).

La probabilidad de matching genético de alto riesgo es calculada en base a las frecuencias de portadores que hemos hallado en nuestra población para cada uno de los genes analizados. En este cálculo no se incluyen las variantes patogénicas ligadas al cromosoma X, ya que los donantes de gametos portadores de variantes patogénicas en genes ligados al cromosoma X son

descartados del programa de donación, con la excepción de que para el gen FMR1 solo son descartadas las donantes de ovocitos que presentan riesgo de expansión a la siguiente generación. A pesar de ello, el gen FMR1 de las donantes de ovocitos no se ha tenido en cuenta a la hora de calcular el riesgo de matching genético, ya que las variantes que presentan las DO aceptadas se consideran de bajo riesgo, casi nulo, de ampliación a mutación completa a la siguiente generación.

En base a esta información, también hemos calculado el riesgo de embrión afecto como la probabilidad de que un embrión herede las dos copias alteradas de un determinado gen o condición genética recesiva.

7. Sensibilidad diagnóstica y sensibilidad clínica

Para valorar la capacidad que tienen los test de genotipado para detectar variantes patogénicas y donantes portadores, teniendo en cuenta únicamente los genes comunes, se realizan las siguientes determinaciones:

- Sensibilidad diagnóstica para variantes totales: número total de variantes que hubieran sido detectadas por el test de genotipado/número total de variantes detectadas mediante secuenciación completa del gen.
- Sensibilidad diagnóstica para variantes diferentes: número de variantes diferentes que hubieran sido detectadas por el test de genotipado/número de variantes diferentes detectadas mediante la secuenciación completa del gen.

De forma específica, para el gen CFTR, se determina:

- Sensibilidad diagnóstica: número de variantes diferentes que hubieran sido detectadas en el gen CFTR por el test de genotipado/número de variantes diferentes detectadas en el gen CFTR mediante secuenciación completa del gen.
- Sensibilidad clínica: número de donantes portadores en el gen CFTR que hubieran sido detectados por el test de genotipado/número total de donantes portadores en el gen CFTR detectados mediante secuenciación completa de CFTR.
 - Para el panel SG, que diferencia variantes del gen CFTR asociadas a fibrosis quística (FQ) y otras variantes asociadas a la ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (ACBVD), se determina además:
 - Sensibilidad diagnóstica/clínica total: teniendo en cuenta todas las variantes del gen CFTR.
 - Sensibilidad diagnóstica/clínica de FQ: teniendo en cuenta las variantes que el panel SG asocia a fibrosis quística.
 - Sensibilidad diagnóstica/clínica de ACBVD: teniendo en cuenta las variantes que el panel SG asocia a la ausencia bilateral congénita de conductos deferentes.

8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS y MedCalc. Las variables cualitativas se describen mediante frecuencias absolutas y relativas. Para la comparación de dichas variables entre los diferentes grupos, la comparación de sensibilidades diagnósticas y clínicas de los test de genotipado y la comparación entre frecuencia de portadores de CFTR descritas en GenomAD y observadas en nuestro estudio, se utilizó el test de chi cuadrado o test de Fisher, con un nivel de significación de $p < 0.05$. Los test de genotipado se compararon gráficamente utilizando diagramas de Venn.

Los parámetros de calidad seminal fueron analizados en escala logarítmica para normalizar la distribución. Para comparar los parámetros de calidad seminal entre el grupo de donantes de semen portadores de al menos una variante en el gen CFTR frente a los donantes de semen no portadores de variantes en este gen se utilizó la prueba t de Student, con un nivel de significación de $p < 0.05$.

Resultados

1. Análisis de variantes halladas en el cariotipo

1.1 Alteraciones cromosómicas

La prevalencia de alteraciones cromosómicas que se encontraron en donantes de semen fue 0.34% (3/895) (Tabla 1). En las donantes de ovocitos, las alteraciones cromosómicas se observaron en el 0.7% (6/923) (Tabla 2) de los cariotipos estudiados. Las alteraciones cromosómicas más frecuentemente encontradas en donantes de gametos fueron alteraciones estructurales en autosomas. En donantes de semen fueron las translocaciones robertsonianas con un caso 45,XY,rob(13;14)(q10;q10) y otro 45,XY,rob(14;21)(q10;q10), y en donantes de ovocitos la translocación del cromosoma 2, siendo un caso de 46,XX,t(2,3)(p12;q26.1) y otro de 46,XX,t(2;7)(p24;p21).

Tabla 1. Alteraciones cromosómicas encontradas en donantes de semen.

Gonosomas	0
Autosomas	3
Estructurales	3(100%)
Translocaciones	2(67%)
45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	
45,XY,rob(14;21)(q10;q10)	
Inversiones	1(33%)
46,XY,inv(4)(p14q21)	
Numéricas	0

Tabla 2. Alteraciones cromosómicas encontradas en donantes de ovocitos.

Gonosomas	1	
Estructurales	0	
Numéricas	1(100%)	
46,XX[44]/45,X[6]		1
Autosomas	5	
Estructurales	5(100%)	
Translocaciones		4(80%)
45,XX,rob(13;14)(q10;q10)		
46,XX,t(4;12)(q28;q12)		
46,XX,t(2;3)(p12;q26.1)		
46,XX,t(2;7)(p24;p21)		
Inversiones		1(20%)
46,XX,inv(7)(q11.2q22)		
Numéricas		0

1.2 Variantes polimórficas

En donantes de semen encontraron 1.2% (11/895) de cariotipos con polimorfismos cromosómicos (Tabla 3), y en donantes de ovocitos este porcentaje fue del 1.08% (10/923) (Tabla 4). No se observaron diferencias significativas entre estas poblaciones. El polimorfismo que se encontró con más

frecuencia fue la inv(9)(p11q13) tanto en donantes de semen como de ovocitos (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Polimorfismos cromosómicos en donantes de semen.

Gonosomas	1	
Inversiones		1(100%)
46,XY,inv(Y)(p11.2q11.23)		
Autosomas	1	
Estructurales		11(100%)
Inversiones		10(91%)
46,XY,inv(9)(p11q13)		
46,XY,inv(9)(p13q21)		
Otras		1(9%)
46,XY,15ph+		

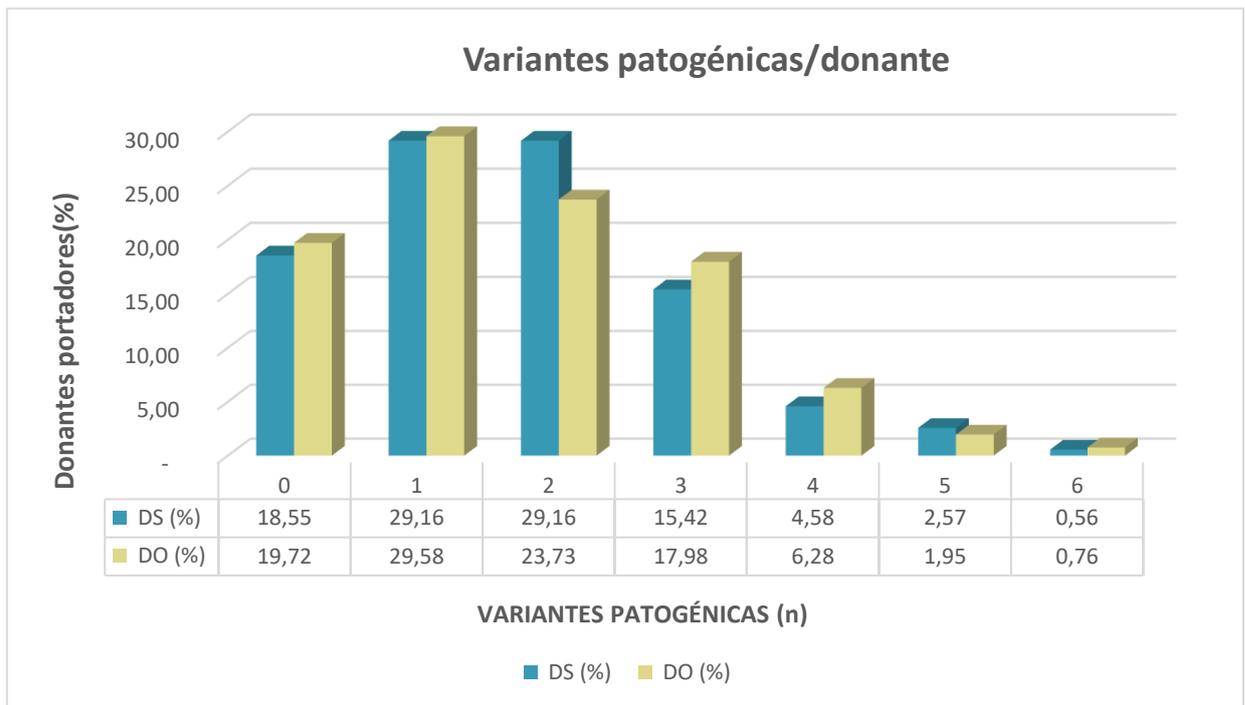
Tabla 4. Polimorfismos cromosómicos en donantes de ovocitos.

Gonadosomas	0	
Autosomas	11	
Estructurales		11(100%)
Inversiones		9(81.8%)
46,XX,inv(9)(p11q13)		
46,XX,inv(9)(p13q21)		
Otras		2(18.2%)
46,XX,15ph+		
46,XX,14ps+		

2. Análisis de variantes y de la frecuencia de portadores de donantes de gametos mediante el test qCarrier Plus.

De los 1818 donantes de gametos aceptados en el programa de donación (923 donantes de ovocitos y 895 donantes de semen), 1470 (80,86%) fueron portadores de al menos una variante patogénica (729 donantes de semen y 741 donantes de ovocitos), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones. La media de variantes patogénicas por donante fue de aproximadamente 1,69 (1,68 en donantes de semen y 1,7 en donantes de ovocitos) (Gráfica 1).

Gráfica 1. Frecuencia de donantes de semen y donantes de ovocitos portadores de 0 a 6 variantes patogénicas en los 302 genes estudiados mediante qCarrier Plus en los 1818 donantes de gametos analizados.



DS = donantes de semen; DO = donantes de ovocitos. No existen diferencias significativas entre ambas poblaciones.

De los 302 genes analizados, se detectaron variantes patogénicas en 236 genes diferentes (196 en donantes de semen y 197 en donantes de ovocitos), 14 de los cuales son genes ligados al cromosoma X (2 en donantes de semen y 14 en donantes de ovocitos) (Tabla 5).

Tabla 5. Genes ligados al cromosoma X en los que se hallaron variantes patogénicas en los 895 donantes de semen y 923 donantes de ovocitos analizados mediante el test qCarrier Plus.

Genes ligados al X	DS	DO
AR	0	1
DMD	0	1
F8	6	3
F9	0	1
FMR1	0	23
G6PD	10	19
GLA	0	2
IDS	0	1
IL1RAPL1	0	1
PQBP1	0	1
PR2	0	1
RS1	0	1
THOC2	0	2
TSPAN7	0	1
Total	16 (1,8%)	58 (6,3%)

*DS = donantes de semen; DO = donantes de ovocitos. * Existen diferencias significativas entre ambas poblaciones.*

De las 23 variantes halladas en el gen FMR1, se obtuvieron 19 alelos intermedios y 4 premutaciones, solo 7 de las 23 DO portadoras de FMR1 fueron descartadas del programa de donación (Tabla 6).

Tabla 6. Número de repeticiones CGG e interrupciones AGG halladas en el gen FMR1 y riesgo de expansión a la siguiente generación.

DO	nº CGG (+/- 1 triplete)	nº AGG	Riesgo expansión	Conclusión
1	45	1	Bajo (+/-1) (1 a 2)	Aceptada
2	45	1	Bajo (+/-1) (1 a 2)	Aceptada
3	45	1	Bajo (+/-1) (1 a 2)	Aceptada
4	45	1	Bajo (+/-1) (1 a 2)	Aceptada
5	45	2	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
6	46	2	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
7	46	1	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
8	47	2	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
9	47	2	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
10	47	3	Bajo (0) (--)	Aceptada
11	48	2	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
12	49	1	Bajo (+/-1) (1 a 2)	Aceptada
13	49	2	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
14	49	2	Bajo (+/-1) (-1 a 2)	Aceptada
15	50	1	Bajo (+/-1) (-20 a 4)	Aceptada
16	50	1	Bajo (+/-1) (-20 a 4)	Aceptada
17	52	2	Medio (+/-2) (1 a 4)	Rechazada
18	53	2	Medio (+/-2) (1 a 4)	Rechazada
19	54	2	Medio (+/-2) (1 a 4)	Rechazada
20	55	2	Medio (+/-1) (-2 a 1)	Rechazada
21	56	1	Medio (+/-2) (-2 a 8)	Rechazada
22	62	2	Alto (+/-1) (-17 a 24)*	Rechazada
23	64	1	Alto (+/-4) (-4 a 10)*	Rechazada

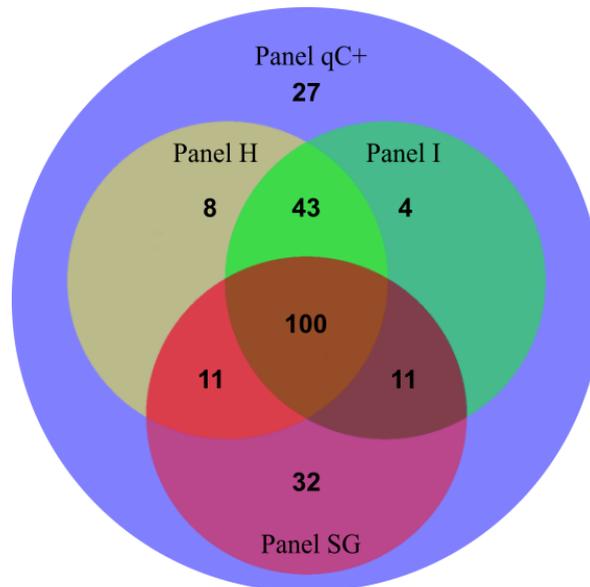
* Bibliografía que describe casos de pacientes con ese número de repeticiones CGG que han amplificado a mutación completa (Nolin et al., 2011).

En estos 236 genes se hallaron un total de 3079 variantes patogénicas (1506 en donantes de semen y 1573 en donantes de ovocitos).

3. Rendimiento de los test de genotipado.

De los 236 genes en los que se detectaron variantes patogénicas mediante el test qCarrier Plus, 162 genes son estudiados por el panel H, 156 por el panel SG y 159 por el panel I (Tabla suplementaria 1). Sin embargo, solamente 100 de los 236 genes son estudiados de forma común por los tres test de genotipado analizados (Genes comunes) (Figura A).

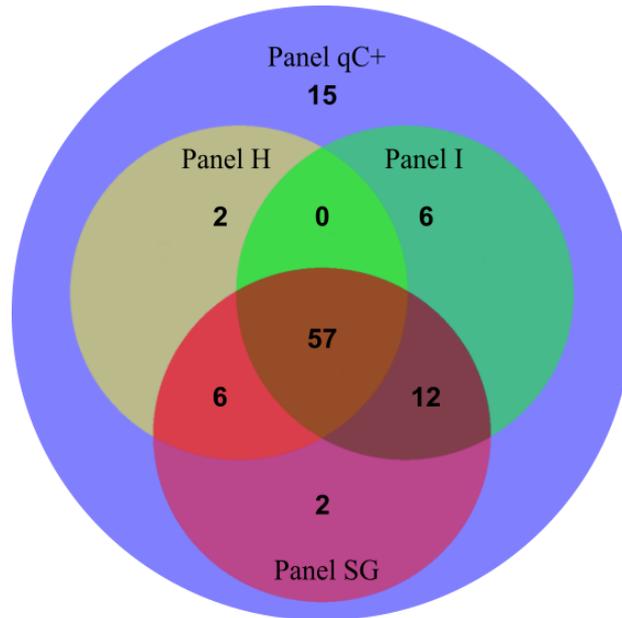
Figura A. Genes en los que se hallaron variantes patogénicas en nuestro estudio mediante qCarrier Plus y que son estudiados por los diferentes test de genotipado (Panel H, Panel SG y Panel I).



Teniendo en cuenta las variantes patogénicas detectadas con el test qCarrier Plus considerando únicamente los 100 genes, los paneles H, SG e I solo habrían detectado variantes en 65, 78 y 75 de los genes comunes,

respectivamente. Habiéndose detectado variantes por los tres test de genotipado únicamente en el 55% de los genes comunes (Figura B).

Figura B. Genes comunes, en los que se detectaron variantes patogénicas con qCarrier Plus, que habrían sido detectadas por los diferentes test de genotipado (Panel H, Panel SG y Panel I).



Para poder profundizar en el rendimiento de los test de genotipado, evaluamos las 1741 variantes patogénicas totales (entre las que se detectan 607 variantes diferentes) que fueron halladas en los 100 genes comunes mediante el test de qCarrier Plus. Con el panel H habrían sido detectadas 632 variantes totales (164 variantes diferentes); con el panel SG habrían sido detectadas 996 variantes totales (259 variantes diferentes); y con el panel I habrían sido detectadas 809 variantes totales (281 variantes diferentes).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad diagnóstica de variantes diferentes entre el panel H respecto a los

paneles SG e I. En cambio, en la sensibilidad diagnóstica para variantes totales se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres paneles, siendo el panel SG el que detecta mayor cantidad de variantes totales con mayor significación estadística (Tabla 7) (Figura C).

Figura C. Variantes patogénicas diferentes detectadas por NGS mediante qCarrier Plus, que habrían sido detectadas por los diferentes test de genotipado (Panel H, Panel SG y Panel I).

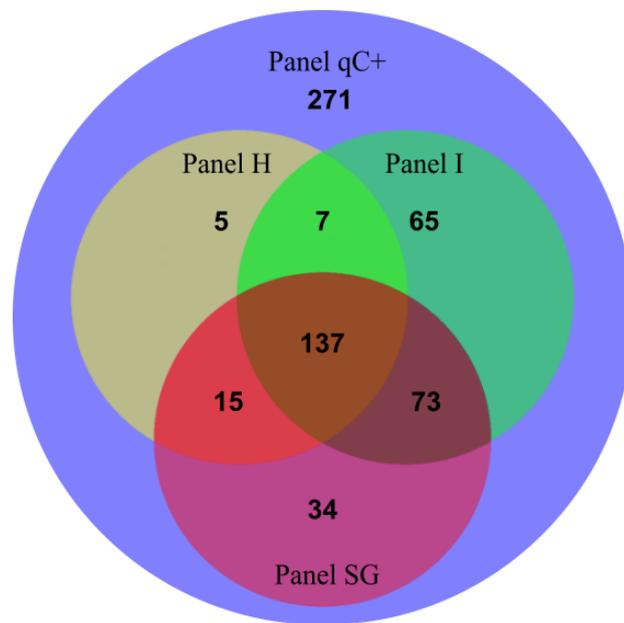


Tabla 7. Sensibilidad diagnóstica para variantes totales y variantes diferentes de los 100 genes comunes en los distintos test de genotipado.

Test genotipado	Sensibilidad diagnóstica Variantes totales (n=1741)	Sensibilidad diagnóstica Variantes diferentes (m=607)
Panel H	632/1741 (36.3%) ^{b,c}	164/607 (27%)
Panel SG	996/1741 (57.2%) ^{a,c}	259/607 (42.7%) ^a
Panel I	809/1741 (46.5%) ^{a,b}	281/607 (46.3%) ^a
Panel H-SG-I (variants comunes)	545/1741 (31.3%)	137/607 (22.6%)

Sensibilidad diagnóstica para variantes totales = número total de variantes detectadas por el test de genotipado / número total de variantes detectadas por NGS; Sensibilidad diagnóstica para variantes diferentes = número de variantes diferentes detectadas por el test de genotipado / número de variantes diferentes detectadas por NGS; n = número de variantes totales detectadas en nuestro estudio mediante NGS; m = número de variantes diferentes detectadas en nuestro estudio mediante NGS; a = p<0.05 vs panel H; b = p<0.05 vs panel SG; c = p<0.05 vs panel I.

Tabla 8. Número de variantes totales y diferentes que no habrían sido detectadas por cada uno de los test de genotipado analizados.

Test genotipado	Variante totales no detectadas (n=1741)	Variante diferentes no detectadas (m=607)
Panel H	1109/1741 (63.7%) ^{a,b}	443/607 (73%) ^{a,b}
Panel SG	745/1741 (42.8%) ^b	348/607 (57.3%)
Panel I	931/1741 (53.48%)	325/607 (53.54%)
Panel H-SG-I	627/1741 (36%)	271/607 (44.7%)

n = número de variantes totales detectadas en nuestro estudio mediante NGS; m = número de variantes diferentes detectadas en nuestro estudio; a = p<0.05 vs panel SG; b = p<0.05 vs panel I.

En total, 545 variantes totales (31,3%) y 137 variantes diferentes (22,6%) habrían sido detectadas por los 3 test de genotipado (Figura C) (Tabla 7) (Tabla suplementaria 2). Por el contrario, 627 variantes totales (36%) y 271 variantes diferentes (44,7%) no habrían sido detectadas por ninguno de los tres test de genotipado (Figura C) (Tabla 8) (Tabla suplementaria 2).

4. Análisis de la clasificación de variantes patogénicas.

De las 607 variantes patogénicas diferentes detectadas en nuestro estudio con qCarrier Plus, 378 habrían sido clasificadas como patogénicas/probablemente patogénicas por ClinVar. De las 229 restantes, 102 variantes producirían proteínas truncadas y 150 variantes habrían sido descritas en la literatura asociadas a enfermedades. Cabe destacar que 124 de las

variantes patogénicas halladas en nuestro estudio no habrían sido descritas por ClinVar, dando lugar el 76.6% de las mismas a proteínas truncadas (Tabla 9) (Tabla suplementaria 2).

Tabla 9. Criterios de patogenicidad de las 607 variantes diferentes clasificadas como patogénicas en nuestro estudio.

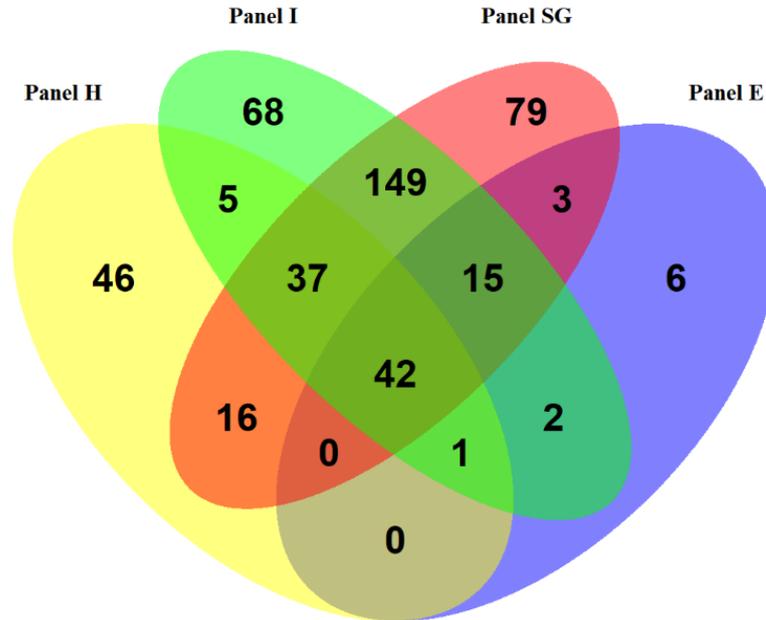
	Clasificación por CLINVAR	Criterios bibliográficos	Proteína truncada	Criterios HGMD
	P/LP (n=378) (62.27%)	--	--	--
	V (n=95) (15.65%)	91	5	
	LB/B (n=10) (1.65%)	10	2	
	NA (n=124) (20.43%)	49	95	11
Total	607 (100%)			

P = patogénica; LP = probablemente patogénica; V = variante de significado incierto; LB = probablemente benigna; B = benigna; NA = no descritas; n = número de variantes diferentes

5. Análisis de variantes en el gen CFTR

Los paneles H, I, SG y E analizan 147, 319, 339 y 69 variantes respectivamente. Solo 42 de las variantes son estudiadas de forma común por los 4 test de genotipado, y 46, 68, 79 y 6 variantes son analizadas de forma exclusiva por el test de genotipado H, I, SG y E, respectivamente (Figura D) (Tabla 10).

Figura D. Variantes analizadas del gen CFTR en los diferentes test de genotipado (Panel H, Panel SG, Panel I y Panel E).



De los 1818 donantes de gametos, 350 fueron portadores de al menos una variante patogénica en el gen CFTR (178 en DS y 172 en DO). Siendo la frecuencia de portadores aproximadamente de 1 de cada 5 en ambas poblaciones (Tabla suplementaria 2).

En total, se hallaron 59 variantes diferentes en el gen CFTR (41 en DS y 42 en DO), todas ellas en heterocigosis, de las cuáles 45 de tipo missense, 6 nonsense, y 7 que alteran el splicing y 1 que cambia el marco de lectura (Tabla suplementaria 3).

Según Castellani et al. (2015), 25 de las 59 variantes habrían sido clasificadas como clase A o B, de las que solo 12 variantes (48%) habrían sido detectadas por los cuatro test de genotipado analizados para el gen CFTR.

El análisis de los test de genotipado muestra que tan solo 13 de las 59 variantes diferentes (22%) halladas en el gen CFTR, están incluidas en los 4 test de genotipado analizados. Y que 1 y 9 variantes serían estudiadas de forma exclusiva por el Panel I y SG, respectivamente. Por otro lado, 32 de las variantes no serían analizadas por ninguno de los test de genotipado, de las que 6 (18,75%) serían clasificadas como A o B por Castellani et al. (2015), 16 de ellas (50%) habrían sido clasificadas por ClinVar como patogénicas y/o probablemente patogénicas y 8 variantes estarían clasificadas como causantes de clínica variada asociada a fibrosis quística o bajo evaluación según la base de datos CFTR2 (Tabla suplementaria 3).

No existen diferencias significativas observadas en la sensibilidad diagnóstica de los diferentes test de genotipado evaluados. Sin embargo, existen diferencias en la sensibilidad clínica de los paneles I, H y SG respecto al panel E, el cuál es claramente más sensible con respecto a los otros 3 test para variantes asociadas a fibrosis quística (Tabla 11).

Tabla 10. Porcentaje de variantes comunes y específicas incluidas en los diferentes paneles de genotipado para el gen CFTR.

% Variantes	Panel E (n=69)	Panel I (n=319)	Panel H (n=147)	Panel SG (n=339)
Comunes	60,89% (42/69)	13,17% (42/319)	28,57% (42/147)	12,39% (42/339)
Específicas	8,7% (6/69)	21,32% (68/319)	31,29% (46/147)	23,3 (79/339)

Tabla 11. Sensibilidad diagnóstica y clínica en los diferentes test de genotipado para el gen CFTR.

Sensibilidad	Panel E (n=69)	Panel I (n=319)	Panel H (n=147)	Panel SG(n=339)
Diagnóstica	28,81% (17/59)	30,51% (18/59)	28,81% (17/59)	Total 44,07% (26/59) FQ 33,9% (20/59) ACBVD 10,17 % (6/59)
Clínica	49,43% (173/350)	15,43% (54/350) ^a	15,14% (53/350) ^a	Total 64,57% (226/350) FQ 18,86% (66/350) ^a ACBVD 45,71% (160/350)

Sensibilidad Clínica = número de donantes portadores en el gen CFTR que hubieran sido detectados por el test de genotipado/número total de donantes portadores en el gen CFTR detectados por NGS; Sensibilidad diagnóstica = número de variantes en el gen CFTR que hubieran sido detectadas por el test de genotipado/número de variantes detectadas en el gen CFTR por NGS. n = número de variantes incluida en cada panel de genotipado; Total = variantes totales, incluyendo las asociadas a fibrosis quística y a la ausencia bilateral congénita de conductos deferentes; FQ = Variantes asociadas a fibrosis quística; ACBVD = Variantes asociadas a la ausencia bilateral congénita de conductos deferentes. a = diferencias estadísticas en la sensibilidad clínica ($p < 0,05$) de los diferentes paneles vs. al panel E.

De las variantes patogénicas halladas con mayor frecuencia en el gen CFTR, la variante c.1210-34TG(11,12)T(5) habría sido detectada por los paneles E y SG, en cambio el Panel SG la incluye dentro de variantes no asociadas a fibrosis quística, incluyéndola dentro del grupo de variantes asociadas ausencia bilateral congénita de conductos deferentes. La variante c.224G>A no habría sido detectada por ningún test de genotipado, la variante c.2991G>C habría sido detectada únicamente por el panel SG (dentro de la clasificación variante asociada a ACBVD y no a FQ) y la variante c.1521_1523delCTT, que habría sido detectadas por los 4 test de genotipado.

Para 13 de las 59 variantes diferentes halladas en el gen CFTR, la frecuencia hallada en nuestro estudio fue estadísticamente superior a la descrita en la base de datos de GenomAD (Tabla suplementaria 3).

No se observan diferencias estadísticamente significativas para los diferentes parámetros de calidad seminal analizados, entre el grupo de donantes de semen no portadores de variantes patogénicas en CFTR y los donantes de semen portadores de alguna variante patogénica en CFTR (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de los diferentes parámetros de calidad seminal para el grupo de donantes de semen, y para aquellos portadores/no portadores de variantes patogénicas en CFTR.

	DS Total N= 895	DS CFTR (+) N=178	DS CFTR (-) N=717	p Valor
Volumen (mL)	3.84 ±1.37 (2-9)	3.93 ±1.34 (2-9)	3.82 ±1.37 (2-9)	p = 0.354
Concentración (Mill/mL)	85.77 ±28.75 (50-191)	84.34 ±26.23 (50-190)	86.06±29.11 (50-191)	p = 0.493
Movilidad (%)	55.77 ±4.59 (50-77)	56.19 ±4.76 (50-73)	55.68 ±4.09 (50-77)	p = 0.16
Recuento Móviles Totales (Mill/mL)	177.43 ±74.67 (58.3-538.24)	180.46 ±69.82 (61.71-473.04)	176.81 ±75.43 (58.3-538.24)	p = 0.57
Morfología (Formas Normales %)	10.50 ±3.99 (4-18)	9.95 ±3.87 (4-18)	10.61 ±3.99 (4-17)	p = 0.057

DS = Donantes de semen.

6. Análisis de matching genético y probabilidad de embriones afectos con doble donación de gametos.

Habiendo excluido al 6,3% de las donantes de ovocitos y al 1,8% de los donantes de semen por ser portadores de una variante patogénica en algún gen ligado al cromosoma X, la probabilidad de encontrar un matching de alto riesgo en la asignación donante de semen-donante de ovocitos fue del 6,92%, debido principalmente a los genes CFTR, GJB2, HBA2, ATP7B, PAH y PKHD1 (Tabla suplementaria 2). Según estos datos, la probabilidad de embrión afecto de una de las enfermedades recesivas testadas en qCarrier Plus sería del 1,73%. Para poder comparar nuestros resultados con los que se hubieran obtenido si se hubieran aplicado los test de genotipado analizados, realizamos el análisis con los 100 genes comunes. En este caso, la probabilidad de matching de alto riesgo con qCarrier Plus fue del 5,6%, mientras que la de embrión afectos sería del 1,4%. Si se hubieran aplicado los tres test de genotipado se habrían obtenido probabilidades de matching de alto riesgo del 0,6%, 2,7% y 0,8% y probabilidades de embrión afectos del 0,2%, 0,7% y 0,2% para los paneles H, SG e I, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Probabilidad (%) de matching de alto riesgo y de embrión afecto en tratamientos con doble donación de gametos cuando se realiza NGS mediante qCarrier Plus o si se aplicaran test de genotipado.

Test de portadores	Matching de alto riesgo (%)	Embrión afecto (%)
Panel qG +	5.54	1.39
Panel H	0.59	0.15
Panel SG	2.71	0.68
Panel I	0.81	0.2

Discusión

Actualmente, en el cribado genético de los donantes de gametos, además de la realización de una historia médica, en la que se recogen datos clínicos personales y familiares de al menos cuatro generaciones que permite evaluar la posible detección de riesgo de enfermedades de herencia dominante o multifactorial con patrón de agregación familiar, se debe realizar el análisis del cariotipo y el cribado de enfermedades recesivas más frecuentes y graves.

En cuanto a las alteraciones cromosómicas encontradas en el cariotipo, es de destacar que se observaron el doble de alteraciones en donantes de ovocitos que en donantes de semen (0,7% vs 0,34%), lo que coincide con lo observado en otros estudios (Ananthapur et al., 2010) y puede ser debido a las diferencias existentes en el protocolo de cribado entre DS y DO. En los DS, previo a la realización del cariotipo, se realiza un análisis de semen para valorar la calidad espermática. En caso de resultados alterados en el análisis de semen los DS son rechazados, pudiéndose deber muchas de las alteraciones halladas en el análisis de semen a alteraciones cromosómicas. Sin embargo, el cribado de DO no dispone de una prueba similar, por lo que es lógico que la prevalencia de alteraciones cromosómicas en esta población resulte más elevada que en DS.

La prevalencia de alteraciones cromosómicas que se halló en donantes de semen coincide con el observado por Ravel et al. (2006), que obtuvieron un 0.38%, en cuyo estudio también consideraron que los candidatos portadores de alteraciones cromosómicas deberían ser excluidos en el proceso de selección de donantes de semen. Sin embargo, la frecuencia de donantes de semen

portadores de alteraciones cromosómicas fue menor a la encontrada por Siffroi et al. (2004), con un 0.6% de alteraciones cromosómicas. Esto fue debido a que ellos en su estudio sí incluyeron polimorfismos como la inv(Y) y la inv(9), a diferencia de nosotros que, siguiendo la recomendación de la European Cytogeneticists Association (Hastings et al., 2007; Hastings et al., 2012; Lloveras et al., 2013), no los incluimos y procedimos a analizarlos de forma independiente.

En las donantes de ovocitos, las alteraciones cromosómicas se observaron en el 0.7% de los cariotipos estudiados, al igual que observaron Siffroi et al. (2004) con un 0.7%, los cuales también decidieron que estas donantes fueran excluidas del programa de donación. Por el contrario, Ravel et al. (2007) encontraron una frecuencia de 11.7% de alteraciones cromosómicas en las donantes de ovocitos. Esta alta frecuencia puede ser explicada, según los autores, por un sesgo de selección de las donantes, ya que en Francia la donación de ovocitos es altruista y no perciben ninguna compensación económica por la misma, por ello el perfil de donante de ovocitos es de mujeres con historia familiar de esterilidad o una historia personal de retraso en la concepción, lo que para ellas representa una fuerte motivación para someterse a los tratamientos necesarios para la donación de ovocitos, a pesar de sus inconvenientes. Estas donantes, por tanto, podrían pertenecer a familias con mayor riesgo de presentar alteraciones cromosómicas.

La alteración cromosómica observada con más frecuencia en donantes de semen y de ovocitos fueron las translocaciones, siendo la translocación robertsoniana (13;14) la única coincidente en ambos grupos de donantes y la

más frecuente, al igual que observaron otros autores (Nielsen et al., 1991; Siffroi et al., 2004). Las translocaciones robertsonianas presentan una prevalencia del 0,1% en población general y del 1% en población infértil y se originan como consecuencia de una translocación entre dos cromosomas acrocéntricos no homólogos (ej. 13, 14, 15, 21, 22), de forma que se genera un cromosoma generalmente dicéntrico que contiene el brazo largo de los dos cromosomas implicados y que implica la pérdida de los brazos cortos, siendo los portadores generalmente compatibles con fenotipo normal, pero con un mayor riesgo de descendencia con desequilibrios cromosómicos o con disomía uniparental, ya que puede dar lugar a errores de segregación durante la gametogénesis (Poot et al., 2021).

Además, en el grupo de donantes de semen se observó la translocación robertsoniana (14;21), otra de las translocaciones robertsonianas clasificada como “común” junto a la translocación rob(13;14), la cual se asocia también a mayor riesgo de descendencia afecta de desequilibrios cromosómicos, entre ellos a descendencia afecta de síndrome de Down (Kolgeci et al., 2015).

En este grupo de donantes también se ha hallado la inv(4)(p14q21), la cual es una inversión pericéntrica que se acompaña de un riesgo de descendencia cromosómicamente desequilibrada como consecuencia de la formación de recombinantes durante la meiosis (Warburton, 1991), es decir, los puntos de ruptura pueden provocar deleciones o duplicaciones en la meiosis.

Por otro lado, en el grupo de donantes de ovocitos, se halló un mosaicismo de Turner, la donante portadora presentó función ovárica normal, probablemente

porque al ser mosaico, la línea celular 46,XX preserva la función ovárica (Kaneko et al., 1990; Tara et al., 1998) y no presentó antecedentes familiares relacionados, ya que el mosaicismo no es heredado, sino que ocurre como un evento aleatorio durante la etapa de división celular en el desarrollo fetal temprano del individuo afecto. Las portadoras de mosaicismo Turner presentan un riesgo aumentado de producir gametos desequilibrados y descendencia afectada de síndrome de Turner.

La frecuencia de polimorfismos cromosómicos en donantes de semen y en donantes de ovocitos fue similar, con 1.2% y 1.8%, respectivamente. Debido a la falta de acuerdo, los criterios de identificación, la relevancia clínica y el riesgo de interpretación errónea por personas sin suficiente formación citogenética, la European Cytogeneticists Association (ECA) recomienda no incluir los polimorfismos en los informes citogenéticos (Hastings et al., 2007; Hastings et al., 2012; Lloveras et al., 2013). Sin embargo, como veremos a continuación, la existencia de evidencias de un efecto negativo de los polimorfismos cromosómicos en Reproducción Asistida (Wyandt et al., 2014; Madon et al., 2005; Minocherhomji et al., 2009; Sahin et al., 2008; Yakin et al., 2005; Uehara et al., 1992; Serra et al., 1990), sugiere que se debe tener en cuenta en el cribado genético de donantes de gametos.

En donantes de gametos, la inv(9) fue el polimorfismo más prevalente (0.55-0.57%), aunque con una frecuencia menor que la descrita para la población general (1-3%) según algunos autores (Reindollar et al., 1981; Meza-Espinosa et al., 2008; Nielsen et al., 1991; Teo et al., 1995; Rao et al., 2006). Esta inversión

es de interés y estudiada por distintos autores por varias razones: son fáciles de reconocer y analizar en comparación con variaciones en la longitud de la heterocromatina, para las cuales los análisis pueden ser más o menos subjetivos; y en general, las inversiones son potencialmente peligrosas porque pueden interferir con el apareamiento meiótico (Wyandt et al., 2014). Varios autores han observado una posible asociación entre la inversión pericéntrica del cromosoma 9 e infertilidad (Uehara et al., 1992), esquizofrenia (Nanko et al., 1993) y un mayor riesgo de descendencia con síndrome de Down (Serra et al., 1990). Más recientemente, varios estudios han registrado una incidencia mayor estadísticamente significativa de polimorfismos (incluyendo la anteriormente citada inversión del 9) entre personas con pobre historia reproductiva (Madon et al., 2005; Minocherhomji et al., 2009; Sahin et al., 2008; Yakin et al., 2005), probablemente por ello se ha detectado con menor frecuencia en los candidatos a donantes que en población general.

Al igual que ocurre en los estudios comentados hasta ahora, que analizaron la relación entre polimorfismos cromosómicos y reproducción natural, también existe controversia en la relación de estos polimorfismos con los resultados en los tratamientos de reproducción asistida. Así, en 2005, Yakin et al., investigaron a hombres de parejas estériles que estaban involucrados en tratamiento ICSI, encontrando una frecuencia de embarazos clínicos e implantación embrionaria significativamente más bajos en aquellos que presentaron polimorfismos. Sin embargo, este estudio solo estudiaba parejas estériles en las cuales la pareja masculina presentaba una oligospermia severa

o azoospermia, por lo que el estudio no reflejaba realmente el impacto de los polimorfismos en el resultado de estas técnicas de tratamiento. Por el contrario, Hong et al. (2011) que incluyeron a parejas estériles con diversas etiologías tratadas con ciclos de tratamiento IVF/ICSI, no encontraron un efecto adverso de la presencia de las variantes polimórficas en el resultado de los tratamientos IVF/ICSI.

En base a los resultados e investigaciones previas consideramos que los donantes con alteraciones y polimorfismos cromosómicos no deben ser aceptados en el programa de donación. De forma que, podamos adaptarnos a la mayor seguridad que se exige legalmente a las técnicas de reproducción asistida con gametos donados y a mayores tasas de éxito en los TRA.

Además del cariotipo comentado hasta ahora, dentro del cribado genético se debe realizar también el estudio de portadores de enfermedades recesivas.

Nuestros resultados demuestran que la mayoría de los donantes de gametos son portadores de al menos una variante patogénica en uno o varios de los genes analizados por NGS. En nuestro estudio este porcentaje fue superior al 80%, similar a lo observado en otros estudios que utilizan, al igual que nosotros, secuenciación completa del gen y análisis no dirigido de variantes (Ceyhan-Birsoy et al., 2019; Martin et al., 2015; Punj et al., 2018). En cambio, el porcentaje obtenido en nuestro estudio es superior a los observados por grupos que utilizaron genotipado y obtuvieron frecuencias de portadores de un 24% y un 56% (Abulí et al., 2016; Lazarin et al., 2013).

En nuestro estudio, un total de 58 donantes de ovocitos (6,3%) resultaron portadoras de una variante patogénica en alguno de los genes analizados asociados al cromosoma X, que es significativamente superior al 1,7% y al 2% informado en estudios anteriores (Abulí et al., 2016; Martin et al., 2015), probablemente porque se analizaron diferente número de genes asociados al cromosoma X en cada uno de los estudios. Para poder compararlos, consideramos solo los genes vinculados al cromosoma X que se analizaron de forma común en los tres estudios, es decir, F8 y FMR1, y no hubo diferencias significativas en la frecuencia de portadores obtenida.

En relación con el gen FMR1, 23 de las 925 DO (2,4%) presentaron 45 o más repeticiones CGG (alelos con posible riesgo de expansión en la descendencia). Para la evaluación del riesgo de expansión a la siguiente generación, se tuvieron en cuenta tanto el número de repeticiones CGG, como el número de interrupciones AGG en cada DO. Las combinaciones que, según la bibliografía, pudieran dar lugar a premutaciones (clasificadas como riesgo medio) o las combinaciones que, según la bibliografía, pudieran dar lugar con alta probabilidad a premutaciones o mutaciones completas (clasificadas como riesgo alto) fueron excluidas del programa. Así, 7 de las 23 DO portadoras (30,4%) no fueron aceptadas en el programa de donación, ya que presentaban mayor riesgo de expansión a mutación completa o a estado de premutación en la siguiente generación y por lo tanto se asociaban a un mayor riesgo reproductivo de descendencia afecta de síndrome de X frágil o al desarrollo del síndrome de temblor y ataxia asociado al X Frágil, tal y como muestran estudios

previos (Nolin et al., 2003; Nolin et al., 2013; Yrigollen et al., 2012; Nolin et al., 2015; Biancalana et al., 2015; Nolin et al., 2019).

De los 236 genes en los que se hallaron variantes patogénicas en nuestro estudio, solo 100 de ellos estaban incluidos en los 3 test de genotipado analizados (genes comunes). Hubo 27 genes que no eran estudiados por ninguno de los tres test de genotipado y 8, 32 y 4 genes que se estudiaban de forma exclusiva por los paneles, H, SG e I, respectivamente. Esto muestra la marcada heterogeneidad presente entre los diferentes paneles de genotipado disponibles en el mercado y previamente descrita por Molly et al. (2021) y otros autores (Ben-Shachar et al., 2019; Chokoshvili et al., 2018; Molina et al., 2021). Debido a ello, para poder evaluar los 3 test de genotipado, hemos tenido en cuenta solo los 100 genes comunes.

Cabe destacar que en los 100 genes comunes se hallaron 607 variantes patogénicas diferentes, el 44.7% de estas variantes no habrían sido detectadas por ningún test de genotipado y solo el 22,6% de las mismas habrían sido detectadas por los tres test de genotipado. Nuestros resultados muestran la gran heterogeneidad que presentan los test de genotipado en cuanto a las variantes patogénicas incluidas para cada gen incluso cuando evaluamos los genes que son comunes en los tres test analizados. Nuestro hallazgo corrobora investigaciones anteriores al respecto (Molina et al., 2020; Ben-Shachar et al., 2019; Amendola et al., 2016). Además, nuestros resultados muestran que los resultados obtenidos mediante genotipado subestiman la frecuencia de donantes portadores y se asocian a un mayor riesgo residual de ser portador ante un

resultado negativo del test, tal y como demuestran otros estudios (Abulí et al., 2016; Lazarin et al., 2013; Molina et al., 2020; Silver et al., 2016). En esta misma línea, Punj et al (2018), en su estudio realizado en un contexto reproductivo preconcepcional, subrayan la necesidad de realizar secuenciación completa del gen para obtener datos más fiables y poder detectar variantes patogénicas previamente no descritas en bases de datos o en la bibliografía, ya que la clasificación de las variantes está en continuo cambio. Además, coinciden con nosotros en que, en comparación a los test de genotipado, los test de secuenciación de gen completo son mucho mejores para detectar variantes raras y variantes patogénicas nuevas en población pan-étnica.

Por otro lado, existe cierta controversia con respecto a la consistencia de la clasificación de las variantes en la base de datos de ClinVar (Yang et al., 2017; Amendola et al., 2016). Nuestro análisis registró un alto porcentaje de variantes patogénicas no descritas en ClinVar, de las cuales el 76,6% (95/124) eran disfuncionales. Este hallazgo coincide con el descrito por Silver et al. (2016), quienes informaron que dos tercios de las variantes disfuncionales encontradas en su estudio en donantes de semen no estaban registrados en la base de datos de Clinvar.

En relación con el gen CFTR, nuestros resultados han puesto en relieve que la frecuencia de portadores de variantes patogénicas en este gen en donantes de gametos (1 de cada 5, 19.3%) está muy por encima de lo descrito en estudios previos realizados en población caucásica europea (1 en 29) (Grody et al., 2001). Esto puede deberse a que nuestro estudio fue realizado mediante

secuenciación completa del gen CFTR y análisis no dirigido de variantes, mientras que la frecuencia de la población descrita en la literatura se basa en el uso de paneles que incluyen un número limitado de variantes del gen CFTR o son datos obtenidos de estimaciones a partir de población afecta de FQ.

Algunas publicaciones han informado tasas de portadores de FQ en donantes de semen, pero estos estudios han sido realizados con test de genotipado que analizan un número limitado de variantes en el gen CFTR. En consecuencia, la tasa de portadores obtenida es menor a la que se hubiera obtenido si el análisis se hubiera realizado mediante secuenciación completa del gen (Silver et al., 2016).

Además, dependiendo de las variantes del gen CFTR que incluyen en el estudio obtienen diferentes tasas de portadores. Así, según Landaburu et al. (2013), la tasa de portadores de FQ en donantes de semen es 1,3%. Sin embargo, otro estudio de donantes de semen informa una tasa de portadores de un 4.6% cuando la variante Poly 5T se excluye del análisis, y el 7,8% cuando se incluye (Urbano et al., 2018).

En base a nuestro estudio, solamente el 22% de las diferentes variantes halladas en el gen CFTR (13 de las 59 variantes diferentes halladas) están incluidas en los 4 test de genotipado analizados, lo que muestra la poca homogeneidad existente entre los diferentes test de genotipado previamente ya descrita por otros autores (Molina et al., 2020; Ben-Shachar et al., 2019; Amendola et al., 2016; Kanavakis et al., 2003).

La sensibilidad clínica y diagnóstica obtenida de los test de genotipado para el gen CFTR, muestra las limitaciones de estos test para detectar portadores de FQ, corroborando hallazgos de investigaciones previas (Kammesheidt et al., 2006; Simpson et al., 2019).

A excepción del panel E, que está dirigido específicamente a la población europea e hispana, los paneles I, H y SG han sido validados de acuerdo con las normas y directrices del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica. A pesar de ello, se utilizan frecuentemente como test de portadores en España. Quizás es por eso que estos 3 test detectan una menor tasa de portadores de FQ en nuestra población en comparación a lo que detecta el test de Elucigene, a pesar de que este último test incluye un menor número de variantes de CFTR. Los hallazgos obtenidos en nuestro estudio están en línea con los obtenidos anteriormente en poblaciones del sur de Europa, que presentan alta heterogeneidad molecular y en el que los paneles comerciales cubren del 50% al 75% de los alelos (Molina et al., 2020; Ben-Shachar et al., 2019; Amendola et al., 2016; Kanavakis et al., 2003).

Por otro lado, el análisis de las variantes halladas en el gen CFTR muestra la escasa homogeneidad existente en cuanto a los criterios que se tienen en cuenta a la hora de clasificar las variantes según la bibliografía o las diferentes bases de datos, ya que solo 25 de las 59 variantes halladas son clasificadas como clase A o B por Castellani et al. (2015) y solo 12 de esas 25 variantes son clasificadas como causantes de FQ por CFTR2.

Además, cabe destacar cómo el test SG presenta una sensibilidad clínica de un 64,57% para detectar número de donantes portadores de variantes en CFTR, pero muestra una sensibilidad clínica de solo un 18,86% para las variantes que el test de SG considera realmente causantes de FQ. Estos datos están en consonancia con lo descrito previamente en otros estudios, los cuales muestran que un mismo test genético puede tener diferentes tasas de detección, dependiendo de si su aplicación va dirigida hacia alguna forma clínica determinada de FQ (Lucarrelli et al., 2016; Strom et al., 2011; Rowntree et al., 2003).

La alta frecuencia de portadores de FQ observada en nuestro estudio, debido a que realizamos el análisis del gen completo de CFTR, muestra la gran repercusión que supondría, sobre la disponibilidad de muestras en el banco de gametos, si todos los donantes portadores fueran excluidos del programa de donación, tal y como sugieren algunas sociedades científicas, que recomiendan la exclusión de donantes portadores de FQ por suponer un riesgo en los tratamientos de reproducción asistida (Retinformation, 2015a, 2015b; Arbeitskreises fur Donogene Insemination, 2006; Boggio et al., 2017). En cambio, en Europa existe una gran discrepancia y variación entre las pautas y regulaciones vigentes relacionadas con el uso de donantes que son portadores. En España, por ejemplo, en el caso de que los pacientes no deseen realizar matching genético, la SEF y el CNRHA recomiendan asignar un donante que no presente variantes patogénicas en el gen CFTR que se consideren frecuentes en nuestra población y claramente asociadas a fenotipo grave de FQ (Castilla et

al., 2020; CNRHA, 2021). De esta forma, los donantes de semen portadores no deben ser eliminados del programa de donación, sino que permite que estos donantes puedan donar y organizar el uso de estas muestras, dependiendo de si se asignan con o sin matching genético. Por otro lado, el análisis completo del gen CFTR permite disminuir el riesgo reproductivo de FQ en todo su espectro clínico cuando se realiza asignación de donantes mediante matching genético.

La Sociedad Americana de Medicina Reproductiva enfatiza en la importancia de proporcionar a los pacientes un adecuado asesoramiento genético e informarles sobre los riesgos residuales de la prueba genética, sobre los riesgos poblacionales de ser portador de una enfermedad recesiva y sobre la posibilidad de reducir el riesgo reproductivo realizando la selección de un donante mediante matching genético (Pfeifer et al., 2013). El riesgo reproductivo de tener un hijo con una enfermedad genética recesiva analizada depende del origen étnico del receptor, de las pruebas realizadas tanto en el receptor como en el donante de gametos, de los resultados obtenidos en esas pruebas y los criterios de exclusión aplicados a los donantes. En consecuencia, el riesgo reproductivo debe ser evaluado individualmente, caso por caso (Zenke et al., 2002), especialmente en el caso de la FQ, donde los test de portadores muestran tanta heterogeneidad entre ellos, debido en parte a la gran cantidad de variantes descritas y a su gran heterogeneidad tanto clínica y genética (Rowntree et al., 2003; Drumm et al., 2012; Kammesheidt et al., 2006; Strom et al., 2011).

La probabilidad de obtener un matching de alto riesgo en tratamientos con doble donación de gametos, según los resultados de nuestro estudio y teniendo

en cuenta los 100 genes comunes, analizados por los tres test de genotipado, es del 5,5% con secuenciación completa de los genes (qCarrier Plus) y del 0,6%-2,7% con los test de genotipado. Los resultados obtenidos con qCarrier Plus están dentro del rango descrito en otros estudios previos, que han informado tasas de matching de alto riesgo del 3-16% en parejas que se someten a tratamientos de reproducción asistida, ya sea con sus propios gametos o mediante la donación de gametos masculinos o femeninos (Abulí et al., 2016; Martin et al., 2015; Punj et al., 2018). La probabilidad de emparejamiento de alto riesgo reproductivo, según el cribado qCarrier Plus, se debe principalmente a los genes CFTR, GJB2, HBA2, ATP7B, PAH y PKHD1, un hallazgo nada sorprendente que concuerda con la alta frecuencia de portadores descrita para estas enfermedades en nuestra población (Lazarin et al., 2013; Abuli et al., 2016).

Por otro lado, los resultados de matching de alto riesgo obtenidos con las pruebas de genotipado en el presente estudio están por debajo del rango descrito por otros autores. Esta discrepancia se debe a la menor tasa de detección de individuos portadores cuando se utilizan pruebas de genotipado (Lazarin et al, 2013; Abulí et al., 2016; Molina et al., 2020; Silver et al., 2016).

Dada la baja tasa de detección que presentan los diferentes test de genotipado, la heterogeneidad que presentan en cuanto a los genes y variantes incluidas en cada panel y las diferencias estadísticamente significativas existentes en su capacidad de detección de variantes totales, se hace necesaria la identificación de los riesgos residuales asociados a los test de portadores

realizados y la transmisión de toda esta información a los interesados. Por ello, cada tratamiento de reproducción asistida con donación de gametos debe estar acompañado de la consulta de asesoramiento genético para que los pacientes puedan entender toda la información y tener la capacidad de escoger aquella opción que mejor se adapte a su caso particular. Ya que, dependiendo del panel elegido, los riesgos reproductivos son muy variados.

Aunque el costo inicial de los paneles de secuenciación completa de los genes es más alto que el de la genotipificación, se ha demostrado que cuando se aplica esta técnica para la detección de portadores de enfermedades recesivas resulta más rentable que utilizar paneles de genotipado (Azimi et al., 2016), por lo que recomendamos el uso de secuenciación completa del gen y análisis no dirigido de variantes para el análisis genético en donantes de gametos, con la intención de mejorar las tasas de portadores y disminuir el riesgo reproductivo cuando se llevan a cabo tratamientos con donación de gametos.

Entre las limitaciones de nuestro estudio está el hecho de que la prueba qCarrier Plus considera solo 302 genes asociados con enfermedades recesivas, de los más de 1.300 que se han descrito (Henneman et al., 2016). En consecuencia, nuestros resultados podrían subestimar el riesgo reproductivo, detectando una menor frecuencia de portadores de las enfermedades no analizadas y, por tanto, un menor riesgo reproductivo al real. Otra limitación de nuestro estudio sería que la población analizada es procedente del área mediterránea, lo que significa que los resultados obtenidos probablemente no serían aplicables a poblaciones de diferente origen étnico. Además, otra

limitación a tener en cuenta es que antes de realizar el estudio de cribado genético, los donantes de gametos han sido seleccionados tras un proceso de cribado previo mediante la recogida de historia clínica personal y familiar, por lo que los datos podrían estar subestimados. Además, muchas personas interesadas en la donación de gametos, que presenten antecedentes familiares, ya sean o no causa de exclusión del programa de donación, pueden no acudir a los bancos de gametos por desconocimiento o miedo a no ser aceptados en el programa, por lo que esto también podría influir en nuestros resultados de forma que obtengamos menor frecuencia de portadores respecto a la frecuencia poblacional real.

En resumen, los estudios genéticos realizados en el cribado genético en donantes de gametos, historia clínica personal y familiar, cariotipo y test de portadores de enfermedades recesivas, han demostrado ser de gran utilidad para evitar malos resultados reproductivos y disminuir el riesgo de descendencia afecta de enfermedades recesivas. No obstante, es necesario que las sociedades científicas establezcan criterios homogéneos sobre el cribado genético que se debe aplicar a los donantes de gametos y disminuir la gran heterogeneidad existente entre los diferentes test de portadores de enfermedades recesivas utilizados en los tratamientos de reproducción asistida con donantes de gametos.

Conclusiones

1. La mayor prevalencia de alteraciones cromosómicas observada en donantes de ovocitos que en donantes de semen parece deberse a diferencias en la secuencia de pruebas que se realizan en el protocolo de cribado entre donante de semen y donante de ovocitos.
2. La realización de los test de portadores mediante genotipado, en comparación con la realización de los mismos mediante secuenciación completa de los genes, se asocian a mayor riesgo reproductivo incluso cuando se realiza matching genético.
3. Se recomienda realizar secuenciación completa de los genes como método de análisis genético para el cribado de enfermedades recesivas en donantes de gametos.
4. Para disminuir el riesgo reproductivo de fibrosis quística en todo su espectro clínico, cuando se realiza matching genético, se recomienda realizar estudio completo del gen CFTR.
5. Es necesario que las sociedades científicas establezcan criterios claros sobre las enfermedades recesivas que se deben incluir en los test de portadores y sobre las variantes que deben analizarse en cada gen, especialmente en el gen CFTR, asociado a fibrosis quística.
6. Cada tratamiento de reproducción asistida con donación de gametos debe ser acompañado de una consulta de asesoramiento genético pretest y postest.

Bibliografía

Abulí A, Boada M, Rodríguez-Santiago B, Coroleu B, Veiga A, Armengol L, et al. NGS-Based Assay for the Identification of Individuals Carrying Recessive Genetic Mutations in Reproductive Medicine. *Hum Mutat.* 2016;37:516–23.

Akbas H, Isi H, Oral D, Turkyilmaz A, Kalkanli-Tas S, Simsek S, et al. Chromosome heteromorphisms are more frequent in couples with recurrent abortions. *Genet Mol Res.* 2012;11:3847–51.

Alonso MJ, Suñer H, Calvo MJ, J Rosell, J Giménez, M D Ramos, et al. Spectrum of Mutations in the CFTR Gene in Cystic Fibrosis Patients of Spanish Ancestry. *Ann Human Genet.* 2006;71:194–201.

Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD, et al. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet.* American Society of Human Genetics. 2016;98:1067–76.

Ananthapur V, Avvari S, Tella S, Nallari P, Akka J. A Robertsonian Translocation rob (14;15) (q10;q10) in a Patient with Recurrent Abortions: A Case Report. *J Reprod Infertil.* 2010;11:197-200.

Anja K, Martin Ki, Steve G, Suzanne Y, Michelle P, Charles D et al. Comprehensive genetic analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from dried blood specimens – Implications for newborn screening. *Genet Med.* 2006;8:557-62.

Arbeitskreises für Donogene Insemination. Richtlinien des Arbeitskreises für Donogene Insemination zur Qualitätssicherung der Behandlung mit Spendersamen in Deutschland. 2006.

Arjunan A, Litwack K, Collins N, Charrow J. Carrier screening in the era of expanding genetic technology. *Genet Med.* 2016;18:1214–7.

Armas H, González CM, González NL, Milena A, Doménech E. Screening neonatal de fibrosis quística mediante tripsina inmunorreactiva sérica. *An Esp Pediatr* 1994;41:261-6.

Azimi M, Schmaus K, Greger V, Neitzel D, Rochelle R, Dinh T. Carrier screening by next-generation sequencing: Health benefits and cost effectiveness. *Mol Genet Genomic Med.* 2016;4:292–302.

Ben-Shachar R, Svenson A, Goldberg JD, Muzzey D. A data-driven evaluation of the size and content of expanded carrier screening panels. *Genet Med.* 2019;21:1931–9.

Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:417-25.

Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations. Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Hum Mutat.* 2002;19:575-606.

Boggio A. The legalisation of gamete donation in Italy. *Eur J Health Law.* 2017;24:85–104.

Castaldo G, Tomaiuolo R, Vanacore B, Ferrara P, del Vecchio S, Carnovale V, et al. Phenotypic discordance in three siblings affected by atypical cystic fibrosis with the F508del/D614G genotype. *J Cyst Fibros*. 2006;5:193-5.

Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman J, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2008;7:179–96.

Castilla JA, Abellán F, Alamá F, Aura M, Bassas LI, Clúa E, et al. Genetic screening in gamete donation: Recommendations from SEF, ASES, AEBM-ML, ASEBIR and AEGH. *Med Reprod Embriol Clin*. 2020;7:1–4.

Charles A. Sims, Pamela Callum, Marilyn Ray, Jennifer Iger and Rena E. Falk. Genetic testing of sperm donors: survey of current practices. *Fertil Steril*. 2010;94:126-9.

Charles M. Strom, Joy B. Redman and Mei Peng. The dangers of including nonclassical cystic fibrosis variants in population-based screening panels: p.L997F, further genotype/phenotype correlation data. *Genet Med*. 2011;13:1042–4.

Cheng R, Ma Y, Nie Y, Qiao X, Yang Z, Zheng R, Xu L. Chromosomal polymorphisms are associated with female infertility and adverse reproductive outcomes after infertility treatment: a 4-year retrospective study. *Reprod. Biomed. Online* 2017;35:72–80

Chokoshvili D, Vears D BP. Expanded carrier screening for monogenic disorders: where are we now? *Prenat Diagn*. 2018;38:59–66.

Clarke H, Harrison S, Perez MJ, Kirkman-Brown J. UK guidelines for the medical and laboratory procurement and use of sperm, oocyte and embryo donors (2019). *Hum Fertil.* 2019;1-13.

CNRHA (Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida). Estudio básico de donantes de gametos (femeninos y masculinos). 2021. Disponible en: https://cnrha.sanidad.gob.es/documentacion/comision/pdf/Estudio_Donantes_de_Gametos.pdf

Coto E, Bousoño C, Menéndez MJ, Cue R, Toral JF, Benavides A, et al. Cystic Fibrosis in Asturias: an elevated frequency of the deltaF508 mutation. *Med Clin.* 1994;103:681-3.

Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:51–65.

Dheensa S, Carrieri D, Kelly S, Clarke A, Doheny S, Turnpenny P, et al. A 'joint venture' model of recontacting in clinical genomics: challenges for responsible implementation. *Eur J Med Genet.* 2017;60:403-9.

Dondorp W, De Wert G, Pennings G, Shenfield F, Devroey P, Tarlatzis B, et al. ESHRE Task Force on Ethics and Law 21: Genetic screening of gamete donors: Ethical issues. *Hum Reprod.* 2014;29:1353–9.

Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:267–82.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe). Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. Strasbourg: 4^o ed Council of Europe 2019. <https://register.edqm.eu/freepub>

Edwards JG, Feldman G, Goldberg J, Gregg AR, Norton ME, Rose NC, et al. Expanded carrier screening in reproductive medicine-points to consider: a joint statement of the American College of Medical Genetics and Genomics, American College of Obstetricians and Gynecologists, National Society of Genetic Counselors, Perinatal Quality Foundation, and Society for Maternal-Fetal Medicine. *Obstet Gynecol.* 2015;125:653-62.

Ellsworth R. E., Jamison D. C., Touchman J. W., Chissoe S. L., Braden Maduro V. V., Bouffard G. G. et al. (2000). Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:1172-7.

Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros* 2008;7:450–3

Farrell PM, White TB, Howenstine MS, Munck A, Parad RB, Rosenfeld M et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Screened Populations. *J Pediatr.* 2017;181S:S33-S44.

Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017;181S:S4-S15.

Fujikura K. Global Carrier Rates of Rare Inherited Disorders Using Population Exome Sequences. *PLoS One*. 2016;11:e0155552

Gartner S, Cobos N, Maya A, Casals T, Séculi J.L., Asensio O, *et al.* Neonatal screening for cystic fibrosis in Cataluña, Spain. *Pediatr Pulmonol*. 2003;25:221.

Gao Z., Waggoner D, Stephens M, Ober C, Przeworski *et al.* An Estimate of the Average Number of Recessive Lethal Mutations Carried by Humans. *GENET*. 2015;199:1243-54.

Gil JA, Amo R, Rosell A, Figuerola J, Heine D, Román JM. Resultados del programa de detección precoz de FQ en las Islas Baleares. *Pediátrika*. 2003;23:27.

Gliozheni O, Hambartsoumian E, Strohmer H, Petrovskaya E, Tishkevich O, Bogaerts K, *et al.* ART in Europe, 2016: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open*. 2020;3:1–17.

Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med* 2001;3:149-54

Hagerman RJ, Hagerman PJ: The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev*. 2002,12:278 –83

Haque IS, Lazarin GA, Kang HP, Evans EA, Goldberg JD, Wapner RJ. Modeled fetal risk of genetic diseases identified by expanded carrier screening. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;316:734–42.

Hastings RJ, Howell R, Dagna F, Kristoffersson U, Cavani S. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:525-7

Health Canada Directive. Technical requirements for conducting the suitability assessment of sperm and ova donors. Ottawa (Canada): Health Canada 2019. Available at: www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/publications/drugs-health-products/technical-directive-sperm-ova-donors/technical-directive-sperm-ova-donors-en.pdf

Henneman L, Borry P, Chokoshvili D, Cornel MC, van El CA, Forzano F et al. Responsible implementation of expanded carrier screening. *Eur J Hum Genet.* 2016;24:e1–e12.

Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2019. Registro Nacional de Actividad 2019-Registro SEF. Disponible en: https://www.registrosef.com/public/docs/sef2019_IAFIVm.pdf

Kammesheidt A, Kharrazi M, Graham S, Young S, Pearl M, Duncop C et al. Comprehensive genetic analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from dried blood specimens – Implications for newborn screening. *Genet Med.* 2006;8:557-62.

Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Duodounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetis M. Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet.* 2003;63:400–9.

Kaneko N, Kawagoe S, Hirio M. Turner's syndrome: review of the literature with referenceto a successful pregnancy outcome. Gynecol Obstet Invest. 1990;29:81-7

Kolgeci S, Kolgeci J, Azemi M, Daka A, Shala-Beqiraj R, Kurtishi I et al. Dermatoglyphics and Reproductive Risk in a Family with Robertsonian Translocation 14q;21q. Acta Inform Med. 2015;23:178-83.

Landaburu I, Gonzalvo MC, Clavero A, Ramírez JP, Zamora S, Martinez L, et al. Genetic testing of sperm donors for cystic fibrosis and spinal muscular atrophy: evaluation of clinical utility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;170:183-7.

Lay-Son G, Repetto G. Genética y fibrosis quística: Desde el gen CFTR a los factores modificadores. Neumología pediátrica 2010;5:4-9.

Lazarin GA, Haque IS, Nazareth S, Lori K, Patterson AS, Jacobson JL, et al. An empirical estimate of carrier frequencies for 400+ causal Mendelian variants: Results from an ethnically diverse clinical sample of 23,453 individuals. Genet Med. 2013;15:178–86.

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. «BOE» núm. 126, de 27 de mayo de 2006, páginas 19947 a 19956. Disponibles en: <https://www.boe.es/eli/es/l/2006/05/26/14/dof/spa/pdf>

Lucarelli M, Bruno S.M, Pierandrei S, Ferraguti G, Testino G, Truglio G, et al. The Impact on Genetic Testing of Mutational Patterns of CFTR Gene in

Different Clinical Macrocategories of Cystic Fibrosis. *J Mol Diagn.* 2016;18:554-65.

Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, Brothman A, Desnick RJ, Grier RE, et al. Technical standards and guidelines for fragile X: The first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet in Medic.* 2001;3:200–5.

Martin J, Asan, Yi Y, Alberola T, Rodríguez-Iglesias B, Jiménez-Almazán J, et al. Comprehensive carrier genetic test using next-generation deoxyribonucleic acid sequencing in infertile couples wishing to conceive through assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2015;104:1286–93.

Mitchell L. Drumm, Assem G. Ziady, Pamela B. Davis. Genetic Variation and Clinical Heterogeneity in Cystic Fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:267–82.

Molina M, Yoldi A, Navas P, Gañán M, Vaquero Á, del Pico JL, et al. Carriers of cystic fibrosis among sperm donors: complete CFTR gene analysis versus CFTR genotyping. *Fertil Steril.* 2020;114:524–34.

Nazareth SB, Lazarin GA, Goldberg JD. Changing trends in carrier screening for genetic disease in the United States. *Prenat Diagn.* 2015;35:931–5.

Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* 1991;87:81-3.

Nolin SL, Sha S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, et al. Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am J Med Genet.* 2013;161:771–88.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* 2003;72:454–64.

Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med.* 2015;17:358–64.

Nolin SL, Glicksman A, Tortora N, Allen E, Macpherson J, Mila M, et al. Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation alleles. *Am J Med Genet A.* 2019;179:1148-56.

Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* 1991;252:1097–102

OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®). <http://omim.org>

O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373:1891-904.

Payne MR, Skytte AB, Harper JC. The use of expanded carrier screening of gamete donors. *Hum Reprod.* 2021;36:1702-10.

Pfeifer S, Goldberg J, McClure R, Lobo R, Thomas M, Widra E et al. Recommendations for gamete and embryo donation: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2013;99:47-62.

Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 1991;66:817– 22.

Poot M, Hochstenbach R. Prevalence and Phenotypic Impact of Robertsonian Translocations. *Mol Syndromol.* 2021;12:1-11.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. 2006 Guidelines for Gamete and Embryo Donation. *Fertil Steril.* 2006;86:S38-50.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Recommendations for gamete and embryo donation: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2013;99:47-62.

Prior TW. Next-generation carrier screening: Are we ready? *Genome Med.* 2014;6:1–3.

Punj S, Akkari Y, Huang J, Yang F, Creason A, Pak C, et al. Preconception Carrier Screening by Genome Sequencing: Results from the Clinical Laboratory. *Am J Hum Genet.* 2018;102:1078–89.

Ravel C, Letur H, Le Lannou D, Barthélémy C, Bresson JL, Siffroi JP. High incidence of chromosomal abnormalities in oocyte donors. *Fertil Steril*. 2007;87:439-41.

Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. «BOE» núm. 163, de 5 de julio de 2014, páginas 52716 a 52763. Disponible en <https://www.boe.es/boe/dias/2014/07/05/pdfs/BOE-A-2014-7065.pdf>

Retsinformation. Vejledning om kvalitet og sikkerhed ved donation og testning af væv og celler. 2015a. <https://www.retsinformation.dk/eli/retsinfo/2015/9356>.

Retsinformation. Vejledning om sundhedspersoners og vævscentres virksomhed og forpligtelser i forbindelse med assisteret reproduction. 2015b. <https://www.retsinformation.dk/eli/retsinfo/2015/9351>.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405-24.

Rink B, Romero S, Biggio JR, Saller DN, and Giardine R. (ACOG) COMMITTEE OPINION. Carrier Screening for Genetic Conditions. *Obstet Gynecol.* 2017;129:e41-e55.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. 1989;245:1066–73.

Rommens JM, Lannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989;245:1059-65.

Ropers HH. On the future of genetic risk assessment. *J Community Genet* 2012;3:229–36.

Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Annals of Human Genetics.* 2003;67:471–85.

Siffroi J-P, Commission de Génétique de la Fédération Française des CECOS. Le caryotype systématique chez les donneurs et donneuses de gamètes: utilité réelle ou simple sécurité? *Gynecol Obstet Fertil.* 2004;32:803–12.

Silver AJ, Larson JL, Silver MJ, Lim RM, Borroto C, Spurrier B, et al. Carrier Screening is a Deficient Strategy for Determining Sperm Donor Eligibility and Reducing Risk of Disease in Recipient Children. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2016;20:276–84.

Sims CA, Callum P, Ray M, Iger J, Falk RE. Genetic testing of sperm donors: survey of current practices. *Fertil Steril*. 2010;94:126–9.

Strom CM, Redman JB, Peng M. The dangers of including nonclassical cystic fibrosis variants in population-based screening panels: p.L997F, further genotype/phenotype correlation data. *Genet Med*. 2011;13:1042–4.

Taran L, Lampariello S, Raguso G, Colloridi F, Pucarrelli I, Pasquino AM et al. Pregnancy in patients with Turner's syndrome: six new cases and review of literature. *Gynecol Endocrinol*. 1998;12:83-7.

Telleria JJ, Alonso MJ, Garrote JA, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis. *An Esp Pediatr*. 2002;57:60-5.

Tempest HG, Simpson JL. Why are we still talking about chromosomal heteromorphisms? *RBMO*. 2017;35:1-2.

Urbano A, Montoya E, Ochando I, Sanchez M, Rueda J. Ventajas del cribado de portadores en donantes de gametos con un panel de 15 genes mediante tecnología Next-Generation Sequencing. *Genética Médica y Genómica*. 2018;2:21–9.

Van El CG, Cornel MC, Borry P, Hastings RJ, Fellmann F, Hodgson SV, et al. Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet*. 2013;21:S1–S5.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a

breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 1991;65:905–14

Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med*. 2004;6:387-91.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. World Health Organization. 2010. ISBN 10:9241547782.

Wolf SM. The Continuing Evolution of Ethical Standards for Genomic Sequencing in Clinical Care: Restoring Patient Choice. *J Law Med Ethics*. 2017;45:333-40.

Wyns C, Bergh C, Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, Motrenko T, et al. ART in Europe, 2016: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open*. 2020;0:1–17.

Yang S, Lincoln SE, Kobayashi Y, Nykamp K, Nussbaum RL, Topper S. Sources of discordance among germ-line variant classifications in ClinVar. *Genet Med*. 2017;19:1118–26.

Yrigollen CM, Durbin-Johnson B, Gane L, Nelson DL, Hagerman R, Hagerman PJ, et al. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med*. 2012;14:729–36.

Zenke U, Chetkowski RJ. Inclusion of heterozygotes for cystic fibrosis in the egg donor pool. *Fertil Steril*. 2002;78:557-61.

Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991;10:214–28.

Anexo I

Anexo 1.

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/Dª: ANTONIO SALMERON GARCIA como secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor/investigador (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: PREVALENCIA ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN PAREJAS ESTERILES Y DONANTES DE GAMETOS ,(PREVALENCIA ALTERACIONES CROMOSÓMICAS)
 Protocolo, Versión: 1
 HIP, Versión:
 CI, Versión:

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en Granada a 20/05/2021

D/Dª. ANTONIO SALMERON GARCIA, como Secretario/a del CEIM/CEI Provincial de Granada



Código Seguro De Verificación:	1b15653a2eff2c32d4b815bcc53e2e8f08d3304a	Fecha	20/05/2021	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iframe/code/1b15653a2eff2c32d4b815bcc53e2e8f08d3304a	Página	1/3	

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 27/04/2021 y recogida en acta 4/21 la propuesta del/de la Promotor/a (No hay promotor/a asociado/a), para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: PREVALENCIA ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN PAREJAS ESTERILES Y DONANTES DE GAMETOS ,(PREVALENCIA ALTERACIONES CROMOSÓMICAS)

Protocolo, Versión: 1
 HIP, Versión:
 CI, Versión:

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

Presidente/a

D/Dª. AURORA BUENO CAVANILLAS

Vicepresidente/a

D/Dª. Paloma Muñoz de Rueda

Secretario/a

D/Dª. ANTONIO SALMERON GARCIA

Vocales

- D/Dª. PATRICIA GALVEZ MARTIN
- D/Dª. Francisco Manuel Luque Martínez
- D/Dª. Juan Ramón Delgado Pérez
- D/Dª. José Darío Sánchez López
- D/Dª. Sonia Domínguez Almendros
- D/Dª. Juan Mozas Moreno
- D/Dª. SALVADOR ARIAS SANTIAGO
- D/Dª. MARIA ESPERANZA DEL POZO GAVILAN
- D/Dª. Francisco OValle Ravassa
- D/Dª. Esther Espínola García
- D/Dª. ANTONIO MORALES ROMERO
- D/Dª. MARTA CUADROS CELORRIO
- D/Dª. MARIA ANGELES GARCIA LIROLA
- D/Dª. Encarnación Martínez García
- D/Dª. FRANCISCO LUIS MANZANO MANZANO
- D/Dª. MIGUEL LÓPEZ GUADALUPE
- D/Dª. MANUEL MARTIN DIAZ
- D/Dª. ANGEL COBOS VARGAS
- D/Dª. LUIS MIGUEL DOMENECH GIL
- D/Dª. MARIA DEL ROCIO MORON ROMERO
- D/Dª. Luis Javier Martínez González
- D/Dª. JESÚS CARDONA CONTRERAS
- D/Dª. Pilar Guijosa Campos
- D/Dª. MARIANA FÁTIMA FERNÁNDEZ CABRERA
- D/Dª. Miguel Álvarez López
- D/Dª. JOAQUINA MARTINEZ GALAN
- D/Dª. MARÍA DOLORES GARCÍA VALVERDE
- D/Dª. ESTHER MOLINA RIVAS
- D/Dª. ANTONIO JUAN PÉREZ FERNÁNDEZ
- D/Dª. ANTONIO JIMENEZ PACHECO



Código Seguro De Verificación:	1b15653a2eff2c32d4b815bcc53e2e8f08d3304a	Fecha	20/05/2021		
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.				
Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia				
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iframe/code/1b15653a2eff2c32d4b815bcc53e2e8f08d3304a	Página	2/3		

Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo en Granada a 20/05/2021



Código Seguro De Verificación:	1b15653a2eff2c32d4b815bcc53e2e8f08d3304a	Fecha	20/05/2021	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Antonio Salmeron Garcia			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/1b15653a2eff2c32d4b815bcc53e2e8f08d3304a	Página	3/3	

Tabla suplementaria 1

Tabla suplementaria 1. Genes en los que se han detectado variantes patogénicas con qCarrier Plus (NGS), que son analizados y/o detectados por los paneles H, SG o I (genotipado).

<i>Genes con variantes qC+</i>	<i>Genes analizados por genotipado</i>	<i>Genes detectados por genotipado</i>
ABCA4	H-SG	0
ABCB11	H	0
ABCD4	0	-
ACADM	H-SG-I	H-SG-I
ACADS	H-SG-I	SG-I
ACADSB	SG	0
ACADVL	H-SG-I	H-SG
ACAT1	H-I	0
ACSF3	0	-
ADA	H-SG-I	H-SG-I
ADK	SG	0
AGL	H-I	0
AGXT	H-I	0
AHCY	0	-
AHI1	SG-I	0
AIPL1	SG	0
AIRE	H-I	0
ALDOB	H-SG-I	H-SG-I
AMT	H-I	0
AR	H-SG-I	0
ARG1	H-SG-I	0
ARL13B	SG	0
ARSA	H-SG-I	H-SG-I
ARSB	H-SG-I	SG-I
ASL	H-SG-I	H-SG-I
ASS1	H-I	0
ATM	H-SG-I	H-SG-I
ATP7B	H-SG-I	H-SG-I
BBS1	H-I	0
BBS10	H-I	0
BBS2	H-I	0
BCKDHA	H-SG-I	SG-I
BCKDHB	H-SG-I	0
BCS1L	H-SG-I	H-SG-I
BSND	H-I	0
BTD	H-I	0
CAPN3	H-SG-I	H-SG-I
CASQ2	SG	0
CBS	H-SG-I	H-SG-I

Tabla suplementaria 1. Genes en los que se han detectado variantes patogénicas con qCarrier Plus (NGS), que son analizados y/o detectados por los paneles H, SG o I (genotipado).

CDH23	H-SG-I	I
CEP290	H-SG-I	H-SG-I
CERKL	H-SG-I	0
CFTR	H-SG-I	H-SG-I
CHST6	SG	0
CLCN1	SG	0
CLN3	SG-I	0
CLN5	H-SG-I	H-SG-I
CLN6	H-SG-I	H-SG-I
CLRN1	H-SG-I	SG-I
CNGA1	SG	0
CNGB1	SG	0
CNGB3	I	0
COL4A4	H-SG-I	0
COL7A1	H-SG-I	SG-I
CPS1	SG-I	0
CPT2	H-SG-I	H-SG-I
CRB1	SG-I	0
CTH	0	X
CTNS	H-SG-I	H-SG-I
CTSD	SG-I	0
CYP17A1	H-SG	0
CYP21A2	H-SG	0
CYP27A1	H-SG-I	H-SG-I
DBT	H-SG-I	H-SG
DHCR7	H-SG-I	H-SG-I
DLD	H-SG-I	H-SG-I
DMD	H-SG	0
DNAH5	0	-
DUOX2	0	-
DUOXA2	0	-
DYSF	H-I	0
ETFPA	H-SG-I	0
ETFB	H-SG-I	0
ETFDH	H-SG-I	I
ETHE1	H-I	0
EVC2	H	0
EYS	SG-I	0
F11	0	-
F2	0	-
F5	0	-

Tabla suplementaria 1. Genes en los que se han detectado variantes patogénicas con qCarrier Plus (NGS), que son analizados y/o detectados por los paneles H, SG o I (genotipado).

F8	H-SG-I	SG-I
F9	H-SG-I	0
FAH	H-SG-I	H-SG-I
FANCA	H-I	0
FANCC	H-I	0
FH	H-SG-I	H-SG-I
FKRP	H-SG-I	H-SG-I
FKTN	H-I	0
FMR1	H-SG-I	H-SG-I
FTCD	0	-
FXN	SG	0
G6PC	H-I	0
G6PD	H-SG-I	SG-I
GAA	H-SG-I	H-SG-I
GALC	H-SG-I	H-SG-I
GALE	SG	0
GALK1	H-SG-I	H
GALNS	H-SG-I	H-SG
GALT	H-SG-I	H-SG-I
GBA	H-SG-I	H-SG-I
GBE1	H-I	0
GCDH	H-SG-I	H-SG-I
GDAP1	SG	0
GJB2	H-SG-I	H-SG-I
GJB3	0	-
GJB6	0	-
GLA	H-SG-I	SG-I
GLB1	H-SG-I	H-SG
GLDC	H-I	0
GNPTAB	H-SG-I	H-SG-I
GNRHR	SG	0
GNS	H-SG-I	0
GRHPR	H-SG	0
GUCY2D	H-SG	0
HADHA	H-SG-I	H-SG-I
HADHB	H-SG-I	I
HAL	0	-
HBA1	H-SG-I	0
HBA2	H-SG-I	H-SG-I
HBB	H-SG-I	H-SG-I
HEXA	H-SG-I	H-SG

Tabla suplementaria 1. Genes en los que se han detectado variantes patogénicas con qCarrier Plus (NGS), que son analizados y/o detectados por los paneles H, SG o I (genotipado).

HEXB	H-I	0
HFE2	H	0
HGD	H-I	0
HGSNAT	H-SG-I	H-SG-I
HLCS	H-SG-I	SG-I
HMGCL	H-SG-I	H-SG-I
HOGA1	H	0
IDS	H-SG-I	0
IDUA	H-SG-I	H-SG-I
IL1RAPL1	0	-
IVD	H-SG-I	SG
IYD	0	-
JAK3	SG	0
KCNJ11	H-I	0
LAMB3	H-I	0
LAMC2	H-I	0
LDLR	0	-
LDLRAP1	0	-
LIPA	H-I	0
LMBRD1	0	-
MAN2B1	H-SG-I	I
MAT1A	0	-
MCCC1	H-SG	0
MCCC2	H-SG-I	SG-I
MCEE	SG	0
MCOLN1	H-SG-I	I
MEFV	H-SG-I	H-SG-I
MFSD8	H-SG-I	0
MKS1	H-I	0
MLYCD	H-SG	0
MMAB	H-SG-I	SG-I
MMACHC	H-SG-I	H-SG-I
MMADHC	H-I	0
MPL	H-I	0
MTHFR	SG	0
MTMR2	SG	0
MTRR	I	0
MUT	H-SG	0
MVK	SG	0
MYO7A	H-SG-I	H-SG-I
NAGLU	H-SG-I	H-SG-I

Tabla suplementaria 1. Genes en los que se han detectado variantes patogénicas con qCarrier Plus (NGS), que son analizados y/o detectados por los paneles H, SG o I (genotipado).

NBN	H-I	0
NDRG1	SG-I	0
NEB	H-SG-I	SG-I
NPC1	H-SG-I	H-SG-I
NPC2	H-SG-I	0
NPHP1	SG	0
NPHS1	H-I	0
NR2E3	H-I	0
OTOF	SG	0
P3H1	SG-I	0
PAH	H-SG-I	H-SG-I
PANK2	SG	0
PCBD1	0	-
PCCA	H-SG-I	H-SG-I
PCCB	H-SG-I	H-SG-I
PCDH15	H-SG-I	SG
PDE6A	SG	0
PEX1	H-I	0
PEX6	H-I	0
PEX7	H-SG-I	H-SG-I
PKHD1	H-SG-I	H-SG-I
PLOD1	SG-I	0
PMM2	H-SG-I	H-SG-I
POLR1C	SG	0
POMGNT1	H-I	0
POMT1	SG-I	0
POMT2	SG-I	0
PPT1	H-SG-I	H-SG-I
PQBP1	0	-
PROP1	H-SG-I	H-SG-I
PTS	H-I	0
PYGM	H-I	0
QDPR	I	0
RAX	SG	0
RDH12	H-SG-I	H-SG-I
RMRP	H	0
RP2	SG	0
RPE65	H-SG-I	I
RS1	H	0
SACS	H-I	0
SERPINA1	H-SG	0

Tabla suplementaria 1. Genes en los que se han detectado variantes patogénicas con qCarrier Plus (NGS), que son analizados y/o detectados por los paneles H, SG o I (genotipado).

SGCA	H-I	0
SGCB	H-I	0
SGSH	H-SG-I	H-SG-I
SH3TC2	SG	0
SLC22A5	H-SG-I	H-SG
SLC25A13	H-SG-I	0
SLC26A2	H-SG-I	H-SG-I
SLC26A4	H-SG-I	H-SG-I
SLC37A4	I	0
SLC3A1	H	0
SLC4A11	H-I	0
SLC6A19	SG	0
SLC7A9	H	0
SMN1	H-SG-I	H-SG-I
SMPD1	H-SG-I	H-SG-I
SPG11	SG	0
SPG7	SG	0
STAR	H-SG-I	H
SURF1	0	-
TAT	H-SG	0
TFR2	H-I	0
TG	0	-
TGM1	H-I	0
THOC2	0	-
TPO	0	-
TPP1	H-SG-I	H-SG-I
TRDN	SG	0
TSHR	SG	0
TSPAN7	0	-
TTPA	H-I	0
USH1C	H-SG-I	0
USH2A	H-SG-I	H-SG-I
WHRN	SG	0

Tabla suplementaria 2

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

Gen	Nombre variante cDNA (Cambio proteína)	Consecuencia molecular	dbSNP	Número acceso ClinVar	CI	DS	DO	GEN-PANEL	Bibl
ACADS (NM_000017)	c.529T>C (Trp177Arg)	Missense	rs57443665	3828	P/LP	1	0	SG-I	
	c.700C>T (Arg234Trp)	Missense	rs532174593	552250	V	1	1	0	[1]
	c.814C>T (Arg272Cys)	Missense	rs539219309	377422	LP/V	1	2	0	
	c.319C>T (Arg107Cys)	Missense	rs61732144	3826	P	1	0	SG-I	
	c.1138C>T (Arg380Trp)	Missense	rs28940875	3837	P	1	0	SG-I	
	c.2T>C (Met1Thr)	Initiator Codon Variant	X	NA	NA	1	0	0	
	c.136C>T (Arg46Trp)	Missense	rs121908003	3825	P/LP	1	0	SG-I	
	c.225delC (Leu79fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
c.210+2T>C	Splicing	X	NA	NA	0	1	0		
ACADM (NM_000016)	c.1A>G (Met1Val)	Initiator Codon Variant	rs1057516778	370802	LP	0	1	0	
	c.985A>G (p.Lys329Glu)	Missense	rs77931234	3586	P	4	4	H-SG	
	c.609A>C (Leu203Phe)	Missense	rs751829413	226065	P/LP	0	1	SG	
	c.683C>A (Thr228Asn)	Missense	rs149678400	203538	P/LP/V	9	7	SG	
	c.250C>T (Leu84Phe)	Missense	rs762114560	226097	P/LP	2	2	H-SG-I	
	157C>T (p.Arg53Cys)	Missense	rs398123072	92258	P	0	1	SG-I	
c.201T>A (Tyr67Ter)	Missense	rs754833969	801498	P/LP	0	1	0		
ACADVL (NM_000018)	c.574_577del (Phe192fs) (NM_001033859)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.1153C>T (Arg385Trp)	Missense	rs745832866	193786	P/LP/V	1	0	0	
	c.1591C>T (Arg531Trp)	Missense	rs146379816	166647	LP/V	1	2	0	
	c.256C>T (Gln86Ter)	Missense	rs1555527732	551978	LP	1	0	0	
	c.1358G>A (Arg453Gln)	Missense	rs138058572	374123	P/LP	1	0	H	
	c.1844G>A (Arg615Gln)	Missense	rs148584617	195448	P/V/LB	4	1	SG	
c.782T>C (Val261Ala)	Missense	rs756069599	811260	V	5	1	0	[2, 3, 4]	
ADA (NM_000022)	c.956_960del (Glu319fs)	Frameshift	rs771266745	193544	P	2	0	SG-I	
	c.311C>T (Pro104Leu)	Missense	rs1452483770	565486	LP	1	0	0	
	c.424C>T (Arg142Ter)	Nonsense	rs780014431	552928	P	1	0	I	
	c.43C>G (His15Asp)	Missense	rs121908725	68263	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.646G>A (Gly216Arg)	Missense	rs121908723	1968	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.320T>C (Leu107Pro)	Missense	rs121908739	1965	P/LP	3	1	H-SG-I	
	c.218+1G>A	Splicing	rs528390681	555722	LP	0	1	I	
c.703C>T (Arg235Trp)	Missense	rs778809577	468281	P/LP	0	1	I		

CI = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

ALDOB (NM_000035)	c.448G>C (Ala150Pro)	Missense	rs1800546	464	P	7	9	H-SG-I	
	c.911G>A (Arg304Gln)	Missense	rs145078268	417929	V	1	0	I	[5]
	c.356_359CAA (Asn120fs)	Frameshift	rs387906225	188861	P/LP	0	1	H-SG-I	
	c.1005C>G (Asn335Lys)	Missense	rs78340951	469	P	0	1	H-SG-I	
	c.524C>A (Ala175Asp)	Missense	rs76917243	465	P	0	1	H-SG-I	
	c.442T>C (Trp148Arg)	Missense	rs118204430	475	P	0	1	H-SG-I	
ARSA (NM_000487)	c.465+1G>A	Splicing	rs80338815	3051	P	1	2	H-SG-I	
	c.1136C>T (Pro379Leu)	Missense	rs74315478	3083	P	0	1	H-SG-I	
	c.986C>T (Thr329Ile)	Missense	rs398123418	93128	P/LP	0	1	SG-I	
	c.991G>T (Glu331Ter)	Nonsense	rs398123419	93129	P/LP	0	1	SG-I	
	c.302G>T (Gly101Val)	Missense	rs74315455	68129	P	1	0	H-SG-I	
ARSB (NM_000046)	c.237_243del (Val80fs)	Frameshift	rs1554032134	559744	LP	1	0	I	
	c.427delG (Val143fs)	Frameshift	rs766914147	559782	P	0	2	SG-I	
ASL (NM_000048)	c.1135C>T (Arg379Cys)	Missense	rs28940287	2403	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.377G>A (Arg126Gln)	Missense	rs777235530	556429	P/V	1	0	0	
	c.503G>A (R168H)	Missense	rs72750381	166698	V	1	0	0	[6]
	c.532G>A (Val178Met)	Missense	rs28941473	2402	P	2	0	SG-I	
	c.806T>C (Leu269Pro)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[6]
	c.332G>A (Arg111Gln)	Missense	rs561367199	288770	LP/V	0	1	I	
ATM (NM_000051)	c.2839-2A>G	Splicing	rs1060501703	407724	LP	1	0	I	
	c.3802delG (Glu1267_Val1268insTer)	Nonsense	rs587779834	127374	P	3	0	SG-I	
	c.6585_6586del (His2195fs)	Frameshift	rs1555119004	524395	P	1	0	0	
	c.6631_6632insA (L2211fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.1339C>T (Arg447Ter)	Nonsense	rs587779815	127337	P/LP	1	0	SG-I	
	c.4507C>T (.Gln1503Ter)	Nonsense	rs1131691164	429084	P/LP	1	0	I	
	c.5908C>T (Gln1970Ter)	Nonsense	rs587781722	141404	P	1	0	H-SG-I	
	c.6067G>A (Gly2023Arg)	Missense	rs11212587	127416	V/LB/B	3	0	0	[7]
	c.1442T>G (Leu481Ter)	Nonsense	rs1555070980	453367	P/LP	1	0	I	
	c.2932T>C (Ser978Pro)	Missense	rs139552233	127362	V/LB/B	1	0	0	[8]
	c.(5496+1_5497-1)_(5674+1_5675-1)dup	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	
	c.7517_7520del	Deletion	rs587781905	141647	P	0	1	H-SG-I	
	c.802C>T (Gln268Ter)	Nonsense	rs557012154	188961	P/LP	0	1	SG-I	
	c.8140C>T (Gln2714Ter)	Nonsense	rs1060501695	419265	P	0	1	I	
c.3137T>C (Leu1046Pro)	Missense	rs568461905	186558	V	0	1	0	[7]	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

ATP7B (NM_000053)	c.3688A>G (Ile1230Val)	Missense	rs200911496	312379	LP/V	1	1	0	
	c.3694A>C (Thr1232Pro)	Missense	rs568009639	555144	P/LP	1	0	SG-I	
	c.2069C>T (Pro690Leu)	Missense	rs1555291809	556042	V	1	0	0	[9]
	c.3207C>A (His1069Gln)	Missense	rs76151636	3848	P	2	1	H-SG-I	
	c.4135C>T (Pro1379Ser)	Missense	rs181250704	157957	V	1	2	SG	[10]
	c.721C>T (Gln241Ter)	Nonsense	X	NA	NA	1	0	0	
	c.1995G>A (Met665Ile)	Missense	rs72552259	157933	LP/V	2	3	0	
	c.2605G>A (Gly869Arg)	Missense	rs191312027	157939	P/LP	6	0	SG-I	
	c.1607T>C (Val536Ala)	Missense	rs138427376	35703	V	1	0	0	[11]
	c.1922T>C (Leu641Ser)	Missense	rs186924074	420002	V	4	2	0	[12]
	c.1934T>G (Met645Arg)	Missense	rs121907998	3862	P/LP	8	14	H-SG-I	[10,12,13]
	c.2738T>A (Leu913Ter)	Nonsense	X	NA	NA	1	1	0	[9]
	c.347T>C (I Ile116Thr)	Missense	rs199773340	431956	V	2	1	0	[12]
	c.98T>C (Met33Thr)	Initiator Codon Variant	rs184868522	35736	V	1	2	0	
	c.19_20del (Gln7fs)	Frameshift	rs749363958	419611	P/LP/V	0	1	0	
	c.2532del (Val683fs)	Frameshift	rs755709270	188883	P	0	1	SG-I	
	c.2731-2A>G	Splicing	rs367956522	188725	P/LP	0	1	SG-I	
	c.984_985insA (Asp329fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
	c.3106G>A (Val1036Ile)	Missense	rs761147984	553574	V	0	1	0	[14,15]
	c.3295G>A (Gly1099Ser)	Missense	rs761632029	370820	LP	0	1	I	
c.3646G>A (Val1216Met)	Missense	rs776280797	188859	P/LP	0	1	I-SG		
BCKDHA (NM_000709)	c.655delG (Ala219fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
	c.663C>G (Tyr221Ter)	Nonsense	X	NA	NA	0	1	0	
	c.940C>T (Arg314Ter)	Nonsense	rs753698250	224072	P	1	0	SG-I	
BCS1L (NM_001079866)	c.696delT (Gly233fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	I	
	c.166C>T (Arg56Ter)	Nonsense	rs121908576	6169	P	1	1	H-SG-I	
	c.736C>T (Gln246Ter)	Nonsense	X	NA	NA	0	1	0	
CAPN3 (NM_000070)	c.2362_2363delinsTCATCT (Arg788fs)	Frameshift	rs1555423217	17618	P	2	0	H-SG-I	
	c.2257G>A (Asp753Asn)	Missense	rs146923842	281081	LP/V	4	4	SG	
	c.1984G>T (Ala662Ser)	Missense	rs187054121	468646	V	2	1	0	[16]
	c.664G>A (Gly222Arg)	Missense	rs1345121557	556854	LP	1	0	I	
	c.1505T>C (Ile502Thr)	Missense	rs148044781	282512	LP/V	1	0	0	
c.(1115+1_1116-1)(1536+1_1537-1)del	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	[17]	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.140_142delTCA (Ile47del)	Deletion	rs753261440	NA	NA	0	1	0	[18]
	c.2362_2363delinsTCATCT (Arg788fs)	Frameshift	rs1555423217	17618	P	0	1	H-SG-I	
	c.59del (Pro20fs)	Frameshift	rs1555417271	551104	P/LP	0	1	I	
	c.1468C>T (Arg490Trp)	Missense	rs141656719	166790	P/LP	0	2	SG-I	
	c.1303G>A (Glu435Lys)	Missense	rs149914792	282173	P/LP	0	1	0	
	c.whole_del (whole_deletion)	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	[19]
CBS (NM_000071)	c.572C>T (Thr191Met)	Missense	rs121964973	132	P	1	0	H-SG-I	
	c.341C>T (Ala114Val)	Missense	rs121964964	119	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.1105C>T (Arg369Cys)	Missense	rs117687681	212860	V	3	8	0	[20,21]
	c.1330G>A (Asp444Asn)	Missense	rs28934891	126	P/LP	1	3	0	
	c.676G>C (Ala226Thr)	Missense	rs763835246	370382	P/LP	1	0	0	
	c.833T>C (Ile278Thr)	Missense	rs5742905	120	P	1	2	H-I	
	c.146C>T (PPro49Leu)	Missense	rs148865119	212872	P/LP	0	1	I	
	c.341C>T (Ala114Val)	Missense	rs121964964	119	P/LP	0	1	H-SG-I	
CDH23 (NM_022124)	c.1087delG (Val363fs)	Frameshift	rs747955135	618009	P/LP	1	0	0	
	c.3293A>G (Asn1098Ser)	Missense	rs41281310	45913	LB	2	1	I	[22]
	c.9569C>T (Ala3190Val)	Missense	rs111033536	46076	V	2	3	0	[23]
	c.4762C>T (Arg1588Trp)	Missense	rs137937502	877825	V/LB	2	0	0	[24]
	c.501C>A, p.Tyr167Ter	Nonsense	X	NA	NA	1	0	0	[25]
	c.9524G>A (p.Arg3175His)	Missense	rs140884994	198370	V	1	0	0	[26]
	c.1143_1176del (Leu382fs)	Frameshift	rs764949139	NA	NA	0	1	0	
	c.349delG (Glu117fs)	Frameshift	rs1376677732	NA	NA	0	1	0	
	c.2263C>T (His755Tyr)	Missense	rs181255269	45891	B	0	1	0	[27]
	c.7823G>A (Arg2608His)	Missense	rs202052174	46040	V/LB	0	1	0	[26,28]
	c.415G>A (Val139Ile)	Missense	rs771868822	969101	V	0	1	0	[29]
CEP290 (NM_025114)	c.180+1G>A	Splicing	rs758593134	461777	P	0	1	I	
	c.1909+1G>A	Splicing	X	NA	LP	0	1	0	
	c.2991+1655A>G	Missense	rs281865192	1337	P	1	2	H-SG-I	
	c.3185delT (Leu1062fs)	Frameshift	rs863225189	217638	P	0	2	I	
	c.3745_3748del (Leu1249fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
	c.4028delA (Lys1343fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
	c.7180dupA (Met2394fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
	c.2251C>T (Arg751Ter)	Nonsense	rs753884599	585307	P	0	1	I	
	c.1441_1451del (Ile481fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.1666delA (Ile556fs)	Frameshift	rs727503855	217622	P	1	0	SG-I	
	c.2818-1G>A	Splicing	X	NA	NA	1	0	0	
	c.5029_5030del (Glu1677fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.7392_7393AG (Glu2465fs)	Frameshift	rs569673313	372319	LP/V	1	0	0	
	c.5668G>T (Gly1890Ter)	Frameshift	rs137852832	1333	P	1	0	SG-I	
CERKL (NM_201548)	c.769C>T (Arg239Ter)	Nonsense	rs121909398	2364	P	3	3	0	
	c.1123G>T (Glu375Ter)	Nonsense	rs188492864	NA	NA	1	0	0	
CFTR (NM_000492)	c.1210-34TG(13)T(5)	Splicing	rs1805177	242535	P/V/LB	1	1	SG	[30]
	c.1210-34TG(11)T(5)	Splicing	rs1805177	242535	P/V/LB	37	38	SG	[30]
	c.1210-34TG(12)T(5)	Splicing	rs1805177	242535	P/V/LB	22	24	SG	[30, 31]
	c.224G>A (Arg75Gln)	Missense	rs1800076	35839	V/LB/B	19	19	0	[32-35]
	c.2991G>C (Leu997Phe)	Missense	rs1800111	7229	P/LP/V /LB/B	16	16	SG	[31, 35-39]
	c.1521_1523delCTT (Phe508delPhe)	Missense	rs113993960	7105	P	12	13	H-SG-I	
	c.2260G>A (Val754Met)	Missense	rs150157202	53465	V/LB/B	9	8	0	[40-42]
	c.3041A>G (Tyr1014Cys)	Missense	rs149279509	53638	V	6	2	0	[31,43,44]
	c.958T>G (Leu320Val)	Missense	rs144476686	35894	V	4	3	0	[39,45,46]
	c.1052C>G (Thr351Ser)	Missense	rs1800086	53174	V	4	2	0	[45, 47]
	c.772A>G (Arg258Gly)	Missense	rs191456345	54055	P/LP/V	3	2	0	[41,48,49]
	c.3154T>G (Phe1052Val)	Missense	rs150212784	35865	P	3	4	SG	[34, 38,50,51,52]
	c.3484C>T (Arg1162Ter)	Nonsense	rs74767530	7137	P	2	0	H-SG-I	
	c.3909C>G (Asn1303Lys)	Missense	rs80034486	7136	P	2	3	H-SG-I	
	c.1624G>T (Gly542Ter)	Nonsense	rs113993959	7115	P	2	3	H-SG-I	
	c.3454G>C (Asp1152His)	Missense	rs75541969	35867	P	2	1	H-SG-I	
	c.601G>A (Val201Met)	Missense	rs138338446	54022	V	2	3	0	[53-55]
	c.2939T>A (Ile980Lys)	Missense	rs397508463	53604	P/LP/V	2	0	SG	[56]
	c.350G>A (Arg117His)	Missense	rs78655421	7109	P	1	0	H-SG-I	
	c.3266G>A (Trp1089Ter)	Nonsense	rs78802634	7194	P	1	0	H-SG-I	
	c.254G>A (Gly85Glu)	Missense	rs75961395	7143	P	1	0	H-SG-I	
	c.2758G>A (Val920Met)	Missense	rs373885282	53561	P/V	1	0	0	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

c.2856G>C (Met952Ile)	Missense	rs151048781	53580	P/LP/V	2	3	0	
c.3389G>C (Gly1130Ala)	Missense	rs397508550	53730	NA	1	0	0	[57]
c.1148T>C (Leu383Ser)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[44]
c.1523T>G (Phe508Cys)	Missense	rs74571530	7126	P/V/B	1	1	0	[58]
c.1616T>C (Ile539Thr)	Missense	rs144745159	598095	V	1	0	0	[59]
c.695T>A (Val232Asp)	Missense	rs397508783	54041	P	1	0	I	
c.2900T>C (Leu967Ser)	Missense	rs1800110	219537	P/LP/V	1	2	0	[35, 60]
c.1000C>T (Arg334Trp)	Missense	rs121909011	7139	P	1	0	H-SG-I	
c.1684G>C (Val562Leu)	Missense	rs1800097	53341	LP/V	1	5	SG	
c.2657+5G>A	Splicing	rs80224560	38497	P	1	0	H-SG-I	
c.489+3A>G	Splicing	rs377729736	53971	P/LP/V	1	0	0	
c.2421A>G (Ile807Met)	Missense	rs1800103	35842	P/V/LB/B	1	0	0	[60]
c.1684G>A (Val562Ile)	Missense	rs1800097	35830	V	1	0	0	[60, 72]
c.1315C>T (Pro439Ser)	Missense	rs397508187	53226	LP/V	1	0	0	[45]
c.1495C>G (Pro499Ala)	Missense	rs397508219	53268	V	1	0	0	[61]
c.332C>T (Pro111Leu)	Missense	rs140502196	53720	P/V	1	0	0	[62-63]
c.3808G>A (Asp1270Asn)	Missense	rs11971167	7164	P/V/LB	3	6	0	[64-66]
c.220C>T (Arg74Trp)	Missense	rs115545701	196277	LP/V	2	3	0	[64-66]
c.2051_2052delinsG (Gln684fs)	Frameshift	rs746460279	35838	P	0	1	H-SG-I	
c.3718-2477C>T	Intron variant	rs75039782	7166	P	0	1	H-SG-I	
c.580-1G>T	Splicing	rs121908793	54014	P	0	1	H-SG-I	
c.202A>G (Lys68Glu)	Missense	rs397508332	53428	V	0	1	0	[38, 67, 68]
c.1046C>T (Ala349Val)	Missense	rs121909021	7172	P/LP/V	0	2	SG	
c.14C>T (Pro5Leu)	Missense	rs193922501	35824	P/LP	0	1	0	
c.3276C>A, (Tyr1092Ter)	Nonsense	rs121908761	38728	P	0	1	H-SG-I	
c.4426C>T (Gln1476Ter)	Nonsense	rs374705585	53947	P/LP	0	1	H-SG-I	
c.91C>T (Arg31Cys)	Missense	rs1800073	35893	V/LB/B	0	1	0	[69-71]
c.1310G>A (Gly437Asp)	Missense	rs765791986	NA	NA	0	1	0	[40]
c.221G>A (Arg74Gln)	Missense	rs142540482	53456	V/LB	0	1	0	[50]
c.3846G>A (Trp1282Ter)	Nonsense	rs77010898	7129	P	0	1	H-SG-I	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.4333G>A (Asp1445Asn)	Missense	rs148783445	53941	LP/V	0	2	0	[45, 72]
	c.1043T>A (Met348Lys)	Missense	rs142920240	53173	V/LB	0	1	0	[60, 73, 74]
	c.2855T>C (Met952Thr)	Missense	rs142773283	53579	LP/V	0	1	0	[75-76]
	c.3023T>A (Val1008Asp)	Missense	rs397508483	53630	V	0	1	0	[43]
	c.3458T>A (Val1153Glu)	Missense	rs397508567	53747	P/V	0	1	0	[47, 77]
	c.617T>G (Leu206Trp)	Missense	rs121908752	7190	P	0	2	H-SG-I	
	c.1327G>T (Asp443Tyr)	Missense	rs147422190	53229	P/LP/V	0	2	SG	
CLN5 (NM_006493)	c.1208dupA (Thr403fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.1A>G (Met1Val)	Initiator Codon Variant	X	NA	NA	1	0	0	
	c.835G>A (Asp279Asn)	Missense	rs28940280	2566	P	0	3	H-SG-I	
COL7A1 (NM_000094)	c.5132_5133insTCACC, (Thr1711fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	1	0	
	c.6527dupC (Gly2177fs)	Frameshift	rs768128088	372345	P	1	7	SG-I	
	c.7930-1G>C	Splicing	rs757816953	NA	NA	1	0	SG-I	[78-79]
	c.8371C>T (Arg2791Trp)	Missense	rs142566193	212731	V	1	1	SG-I	[80-82]
	c.8524_8527+10del (Glu2842fs)	Frameshift	rs566181351	728221	B	1	0	SG-I	[83]
	c.8760delG (Thr2921fs)	Frameshift	rs748201527	NA	NA	1	0	0	[84]
	c.4373C>T (Pro1458Leu)	Missense	rs79378857	372333	P/LB/B	2	0	SG-I	[85]
	c.8053C>T (Arg2685Ter)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[86]
	c.(4635+1_4635+3)del	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	
	c.5819C>T (Pro1940Leu)	Missense	rs149267939	446002	V/B	0	1	0	[80]
	c.8371C>T (Arg2791Trp)	Missense	rs142566193	212731	V	0	1	SG-I	[80-82]
	c.4147G>A (Gly1383Arg)	Missense	X	NA	NA	0	1	0	[78,81]
	c.7129G>A (Gly2377Ser)	Missense	rs768597948	NA	NA	0	1	0	[81,87]
CPT2 (NM_000098)	c.108_109dupGC (Ser38fs)	Frameshift	rs754363068	371697	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.338C>T (Ser113Leu)	Missense	rs74315294	8953	P	2	4	H-SG-I	
	c.149C>A (Pro50His)	Missense	rs28936375	8954	P	1	0	H-SG-I	
CTNS (NM_004937)	c.646dupA (Leu215fs)	Frameshift	rs893207601	371084	P	0	1	SG-I	[88,89]
	c.(?-1)_(852+1_853-1)del	Deletion	X	NA	NA	0	2	0	
	c.416C>T (Ser139Phe)	Missense	rs267606754	4458	LP	1	1	H-SG-I	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

CYP27A1 (NM_000784)	c.646+1G>A	Splicing	X	NA	NA	1	0	I	
	c.1016C>T (Thr339Met)	Missense	rs121908102	4266	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.1183C>T (Arg395Cys)	Missense	rs121908096	4255	P/LP	3	1	H-SG-I	
DBT (NM_001918)	c.1291C>T (Arg431Ter)	Missense	rs398123660	93991	P/LP	1	0	0	
	c.788T>C (Met263Thr)	Missense	rs1553230703	552494	V	1	0	H-SG	[90]
	c.1018-550A>G	Intron variant	X	NA	NA	0	1	0	[91]
DHCR7 (NM_001360)	c.964-1G>C	Splicing	rs138659167	93725	P/LP	8	7	H-SG-I	
	c.1083C>A (Phe361Leu)	Missense	rs780088227	305955	V	1	0	0	[92]
	c.292C>T (Gln 98Ter)	Missense	rs104886039	188723	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.1337G>A (Arg446Gln)	Missense	rs751604696	431994	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.1342G>A (Glu448Lys)	Missense	rs80338864	6792	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.506C>T (Ser169Leu)	Missense	rs80338855	21274	P/LP	0	1	H-SG-I	
	c.682C>T (Arg228Trp)	Missense	rs775773057	558494	P/LP/V	0	1	SG	
	c.452G>A (Trp151Ter)	Nonsense	rs11555217	21273	P/LP	0	1	H-SG-I	
	c.870G>A (Trp290Ter)	Nonsense	rs774187452	552520	P/LP	0	1	I	
c.988G>A (Val330Met)	Missense	rs139724817	420113	V	0	1	0	[93]	
ETFB (NM_001985)	c.216+1G>A	Splicing	X	NA	NA	0	1	0	
	c.292C>T (Arg98Cys)	Missense	rs147353781	203697	V	2	1	0	[94]
FAH (NM_000137)	c.233G>A (Trp78Ter)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[95]
	c.554-1G>T	Splicing	rs80338895	11874	P	0	1	H-SG-I	
FH (NM_000143)	c.1431_1433dupAAA (Lys477dup)	Inframe Insertion	rs367543046	42095	P/LP/V	5	1	H-SG-I	
FKRP (NM_024301)	c.731G>A (Arg244His)	Missense	rs764641619	283038	P/V	1	2	0	[96]
	c.520A>T (Ser174Cys)	Missense	rs200990647	96110	LB/B	1	0	0	[97]
	c.826C>A (Leu276Ile)	Missense	rs28937900	4221	P/LP	0	3	H-SG-I	
FMR1 (NM_001185082)	CGG(45-54), Intermediate- mutation	Microsatellite	X	9972	P	0	19	H-SG-I	
	CGG(55-200), Pre- mutation	Microsatellite	X	9972	P	0	4	H-SG-I	
G6PD (NM_000402)	c.376A>G (Asn126Asp); c.542A>T (Asp181Val)	Missense	rs1050829 (Haplotipo)	10382	NA	1	0	SG	[98- 101]
	c.466A>G (Asn156Asp); c.292G>A (Val98Met)	Missense	rs1050828 (Haplotipo)	10361	P	3	6	0	
	c.292G>A (Val98Met)	Missense	rs1050828	37123	P	4	12	0	
	c.653C>T (Ser218Phe)	Missense	rs5030868	100057	P	2	0	I	
	c.934G>C (Asp312His)	Missense	rs137852318	10372	P	0	1	I	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

GAA (NM_000152)	c.282delT (Asp95fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.-32-13T>G	Splicing	rs386834236	4027	P	9	9	H-SG	
	c.1445C>T (Pro482Leu)	Missense	X	NA	NA	1	1	SG	[102]
	c.343C>T (Gln115Ter)	Nonsense	rs786204614	188996	LP	1	0	SG-I	[102]
	c.1927G>A (Gly643Arg)	Missense	rs28937909	4023	P	1	0	H-SG-I	
	c.2237G>C (Trp746Ser)	Missense	rs752921215	188484	P/LP	2	0	I	
	c.(2481+1_2482-1)_(2646+1_2647-1)del	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	
	c.2395C>T (His799Tyr)	Missense	rs143347747	284886	LP/V	0	1	0	[103]
	c.1856G>A (Ser619Asn)	Missense	rs753269119	370146	P/LP	0	1	I	
c.2238G>C (Trp746Cys)	Missense	rs1800312	265160	P/LP	0	2	I		
GALC (NM_000153)	c.334A>G (Thr112Ala)	Missense	rs147313927	92503	P/LP/V	7	2	SG	[104,105]
	c.956A>G (Tyr319Cys)	Missense	rs183105855	265349	P/V	2	1	SG	
	c.1898C>T (Thr633Met)	Missense	rs766762599	858517	LP/V	1	0	0	
	c.1186C>T (Arg396Trp)	Missense	rs770485731	456712	P	0	1	I	
	c.1586C>T (Thr529Met)	Missense	rs200960659	370073	P/LP	0	1	H-SG-I	
c.(1083+1_1084-1)_(1980_?)del	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	[106]	
GALNS (NM_000512)	c.139G>A (Gly47Arg)	Missense	rs199638097	281018	P/LP	1	0	SG	
	c.29G>A (Trp10Ter)	Nonsense	X	NA	NA	1	0	0	
	c.1127G>A (Arg376Gln)	Missense	rs150734270	193597	V	12	10	0	[107,108]
	c.499T>G (Phe167Val)	Missense	rs148565559	321204	LP/V	6	2	0	
	c.(138+1_139-1)_(1381+1_1382-1)dup	Duplication	X	NA	NA	0	1	0	
	c.587delC (Pro196fs)	Frameshift	rs746086649	NA	NA	0	1	0	[109,110]
	c.1156C>T (Arg386Cys)	Missense	rs118204437	700	P/LP	0	2	H-SG	
c.601C>T (Arg201Cys)	Missense	rs118204437	700	P/LP	0	1	0		
GALT (NM_000155)	c.563A>G (Gln188Arg)	Missense	rs75391579	3614	P	2	4	H-SG-I	
	c.883C>A (Pro295Thr)	Missense	rs111033783	25285	V	3	0	SG-I	[111]
	c.404C>T (Ser135Leu)	Missense	rs111033690	3618	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.855G>T (Lys285Asn)	Missense	rs111033773	3621	P	1	0	H-SG-I	
	c.whole_del (p.whole_del)	Deletion	X	NA	NA	1	1	H-SG-I	
	c.610C>T (Arg204Ter)	Nonsense	rs111033737	25228	P/LP	0	1	SG-I	
	c.691C>T (Arg231Cys)	Missense	rs111033749	25246	P/LP	0	1	SG-I	
c.584T>C (Leu195Pro)	Missense	rs111033728	25222	P	0	1	H-SG-I		
GBA (NM_000157)	c.84dupG (Leu29fs)	Frameshift	rs387906315	4302	P	1	0	H-SG-I	
	c.1226A>G (Asn409Ser)	Missense	rs76763715	4290	P/LP	6	3	H-SG-I	

CI = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

GCDH (NM_000159)	c.1448T>C (Leu396Pro)	Missense	rs421016	4288	P	11	14	SG-I	
	c.1604G>A (Arg535His)	Missense	rs75822236	4311	P	0	1	H-SG-I	
	c.882T>G (His294Gln)	Missense	rs367968666	242810	P/LP/V	0	1	0	[112,113]
	c.1213A>G (Met405Val)	Missense	rs141437721	193798	P	0	1	SG-I	
	c.1204C>T (Arg402Trp)	Missense	rs121434369	2085	P/LP	0	1	H-SG-I	
	c.1198G>A (Val400Met)	Missense	rs121434372	2088	P	1	1	H-SG-I	
	c.268G>A (Glu90Lys)	Missense	rs1025558859	459949	LP	0	1	0	
	c.482G>A (Arg161Gln)	Missense	rs777201305	188789	P	0	1	SG-I	[114]
	c.680G>C (Arg227Pro)	Missense	rs121434373	2089	P	2	1	H-SG-I	
	c.914C>T (Ser305Leu)	Missense	rs1260580183	581598	P	1	0	SG-I	
	UTR5	Cambio señal canónica splicing	X	NA	NA	1	0	0	
GJB2 (NM_004004)	c.-22-2A>C	Splicing	rs201895089	375406	V	1	4	0	[115]
	c.35delG (Gly12fs)	Frameshift	rs80338939	17004	P	9	20	H-SG-I	
	c.476A>T (Asp159Val)	Missense	rs28931592	17024	V	1	1	SG	[116]
	c.427C>T (Arg143Trp)	Missense	rs80338948	17009	P	0	1	H-SG-I	[117]
	c.109G>A (Val37Ile)	Missense	rs72474224	17023	P	7	7	H-SG	
	c.139G>T (Glu47Ter)	Nonsense	rs104894398	17005	P	1	1	H-SG-I	
	c.283G>A (Val95Met)	Missense	rs111033299	44735	P/LP	0	1	H-SG-I	
	c.71G>A (Trp24Ter)	Nonsense	rs104894396	17002	P	1	1	H-SG-I	
	c.95G>A (Arg32His)	Missense	rs111033190	44766	P	0	1	I	
	c.101T>C (Met34Thr)	Missense	rs35887622	17000	P	16	18	SG	
	c.269T>C (Leu90Pro)	Missense	rs80338945	17016	P	3	1	H-SG-I	
	c.269dupT (Val91fs)	Frameshift	rs730880338	177737	P	1	0	SG-I	
	c.487A>G (Met163Val)	Missense	rs80338949	21388	V	1	0	0	[118]
	c.617A>G (Asn206Ser)	Missense	rs111033294	44763	P/LP	2	0	H-SG-I	
	c.439G>A (Glu147Lys)	Missense	rs767178508	371709	P/LP	1	0	H-SG-I	
	c.475G>A (Asp159Asn)	Missense	rs373684994	438618	V	1	0	0	[119]
c.229T>C (Trp77Arg)	Missense	rs104894397	17003	P	1	0	H-SG-I		
GLB1 (NM_000404)	c.591dupT (Asp198Ter)	Nonsense	X	NA	NA	1	0	SG	[120]
	c.1310A>G (Asn437Ser)	Missense	rs202237232	554101	LP/V	2	1	0	
	c.1783C>T (Arg595Trp)	Missense	rs201807974	550288	V	1	1	0	[121]
	c.602G>A (Arg201His)	Missense	rs189115557	198077	P	1	0	SG	
	c.248A>G (Tyr83Cis)	Missense	X	NA	NA	0	1	0	[122,123]
	c.1768C>T (Arg590Cys)	Missense	rs794727165	194596	P	0	1	SG	
	c.1445G>A (Arg482His)	Missense	rs72555391	932	P	0	1	H-SG	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.176G>A (Arg59His)	Missense	rs72555392	945	P/LP	0	1	H-SG	
GNPTAB (NM_024312)	c.1959_1960del (Pro655fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.3503_3504delTC (Leu1168fs)	Frameshift	rs34002892	2771	P	2	1	H-SG-I	
	c.616_619del (Thr206fs)	Frameshift	rs1202665634	38432	P	1	0	SG-I	
	c.2867A>G (His956Arg)	Missense	rs281865005	39062	P	1	0	I	
	c.1208T>C (Ile403Thr)	Missense	rs281864973	39026	P	2	0	I	
	c.2354T>G (Leu785Trp)	Missense	rs144060383	100738	P	1	0	SG	
	c.1774G>A (Ala592Thr)	Missense	rs149390820	100737	V	0	1	SG	[124]
HADHA (NM_00182)	c.(67+1_68-1) (314+1_315-1)del	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	
	c.1793_1794delAT (His598fs)	Frameshift	rs769580842	188962	P/LP	0	1	I	
	c.1528G>C (Glu510Gln)	Missense	rs137852769	10085	p	2	2	H-SG-I	
HBA1 (NM_000558)	c.95+2_95+6del	indel	X	NA	NA	1	1	0	
	c.358C>T (Pro120Ser)	Missense	rs63750751	811900	P	0	2	0	
HBA2 (NM_000517)	c.whole_del, p.whole_deletion	Deletion	X	38636	P	41	43	H-SG-I	
HBB (NM_000518)	c.27dupG (Ser10fs)	Frameshift	rs35699606	36308	P	1	0	SG-I	
	c.92+1G>A	Splicing	rs33971440	15436	P	1	1	H-SG-I	
	c.20A>T (Glu7Val)	Missense	rs334	15333	P	1	1	H-I	
	c.118C>T (Gln40Ter)	Missense	rs11549407	15402	P	3	1	H-SG-I	
	c.19G>A (Glu7Lys)	Missense	rs33930165	15126	P	2	2	SG-I	
	c.93-21G>A	Splicing	rs35004220	15454	P	0	1	H-SG-I	
	c.34G>A (Val12Ile)	Missense	rs33974228	15189	V	0	1	0	[125]
	c.whole_del (whole_deletion)	Deletion	X	NA	NA	0	2	H	[126]
HEXA (NM_000520)	c.1073+1G>A	Splicing	rs76173977	3920	P/LP	0	1	H-SG	
	c.1422-2A>G	Splicing	X	NA	NA	0	1	H-SG	
	c.459+5G>A	Splicing	rs762060470	374505	P/LP	1	1	H-SG	
	c.1177C>T (Arg393Ter)	Missense	rs121907963	3905	P	0	1	H-SG	
	c.739C>T (Arg247Trp)	Missense	rs121907970	3922	V/B	0	1	0	[127]
	c.533G>A (Arg178His)	Missense	rs28941770	3896	P	1	0	H-SG	
HGSNAT (NM_152419)	c.820+2T>A	Splicing	X	NA	NA	1	0	0	
	c.525dupT (Val176fs)	Frameshift	rs483352895	1235	P	1	0	H-SG-I	
	c.372-2A>G	Splicing	rs483352896	1236	P	0	1	H-SG-I	
HLCS (NM_000411)	c.1180-2A>G	Splicing	rs750728042	553797	LP	1	0	I	
	c.1741G>A (Gly581Ser)	Missense	rs119103230	1910	P	1	0	SG-I	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.1900G>A (Asp634Asn)	Missense	rs149399432	558569	V	0	1	0	[128]
HMGCL (NM_000191)	c.109G>T (Glu37Ter)	Nonsense	rs763494292	195033	P	0	1	H-SG-I	
	c.286C>T (Gln96Ter)	Nonsense	rs890995574	557482	LP	0	1	I	
IDUA (NM_000203)	c.787A>T (Arg263Trp)	Missense	rs201268637	550605	V	1	2	0	[129]
	c.1205G>A (Trp402Ter)	Nonsense	rs121965019	11908	P	2	1	H-SG-I	
	c.1577T>C (Leu526Pro)	Missense	rs781136336	567566	P	1	0	0	
	c.1525-2A>G	Splicing	X	NA	NA	0	1	0	
	c.1598C>G (Pro533Arg)	Missense	rs121965021	11910	P	0	1	H-SG-I	
IVD (NM_002225)	c.932C>T (Ala311Val)	Missense	rs28940889	100060	P/LP	3	3	0	
	c.456+2T>C	Splicing	rs398123683	94055	P	1	0	0	
	c.445A>G (Met149Val)	Missense	rs1241965322	NA	NA	0	1	0	[130]
	c.214G>A (Asp72Asn)	Missense	rs747273828	NA	NA	0	1	SG	[131]
MAN2B1 (NM_000528)	c.1A>G (M1?)	Initiator Codon Variant	rs967834240	552319	V	1	0	I	
	c.1351G>T (Gly451Cys)	Missense	rs368899357	208266	P	0	1	0	
MCCC2 (NM_022132)	c.100C>T (Gln34Ter)	Nonsense	rs1413464990	NA	NA	1	1	0	
	c.463C>T (Arg155Trp)	Missense	rs141030969	566363	P/LP	1	1	I	
	c.1015G>A (Val339Met)	Missense	rs150591260	203805	P/LP	3	5	SG-I	
	c.1322T>C (Ile441Thr)	Missense	rs139852818	203808	V	1	4	0	[132]
	c.599T>A (Ile200Asn)	Missense	rs140806722	167278	V	1	0	0	[133]
MCOLN1 (NM_020533)	c.1135-1G>C	Splicing	X	NA	NA	1	0	I	
	c.594delC (Glu199fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
MEFV (NM_000243)	c.2080A>G (Met694Val)	Missense	rs61752717	2538	P/LP	3	0	H-SG-I	
	c.2084A>G (LysK695Arg)	Missense	rs104895094	2547	P/LP/V	2	1	SG-I	
	c.443A>T (Glu148Val)	Missense	rs104895076	2554	V	1	0	0	[134,135]
	c.1958G>A (Arg653His)	Missense	rs104895085	2553	P/LP/V	2	0	SG-I	
	c.2040G>A (Met680Ile)	Missense	rs28940580	2550	P	1	0	H-SG-I	
	c.2082G>A (Met694Ile)	Missense	rs28940578	2539	P	1	1	H-SG-I	
	c.2230G>T (Ala744Ser)	Missense	rs61732874	2548	P/LP/V	11	11	H-SG-I	
	c.688G>A (Glu230Lys)	Missense	rs104895080	97537	P/V	1	0	0	[136,137]
	c.2177T>C (Val726Ala)	Missense	rs28940579	2540	P/LP	3	1	H-SG-I	
	c.2076_2078del (Ile692del)	Deletion	rs104895093	97485	P/LP/V	0	1	H-SG-I	
MMAB (NM_052845)	c.348+1G>T	Splicing	X	NA	NA	1	0	0	

CI = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.(584+1_585-1)_(*1_?)del	Deletion	X	NA	NA	1	0	0	
MMACHC (NM_015506)	c.548A>T (His183Leu)	Missense	rs752866643	218328	LP/V	1	0	SG	[138]
	c.584G>A (Arg195His)	Missense	rs756195708	218322	LP	0	2	SG-I	
	c.271dupA (Arg91fs)	Frameshift	rs398124292	1421	P	6	3	H-SG-I	
	c.389A>G (Tyr130Cys)	Missense	rs200094982	297484	P/LP/V	1	0	SG-I	
	c.666C>A (Tyr222Ter)	Nonsense	rs201266016	496436	P	1	0	I	
	c.440G>C (Gly147Ala)	Missense	rs140522266	203828	P/LP	1	1	SG-I	
	c.271dupA (Arg91fs)	Frameshift	rs398124292	1421	P	0	1	H-SG-I	
	c.217C>T (Arg73Ter)	Nonsense	rs796051995	203825	P	0	1	SG-I	
	c.688C>T (Arg230Ter)	Nonsense	rs201183360	488706	LP	0	1	I	
MYO7A (NM_000260)	c.1344-1G>A (NM_001127179)	Splicing	X	NA	NA	1	0	I	
	c.494C>T (Thr165Met)	Missense	rs111033174	43264	P	2	1	SG-I	
	c.2476G>A (Ala826Thr)	Missense	rs368341987	177732	V	0	1	H-I	[139-141]
NEB (NM_001271208)	c.3067delG (Glu1023fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.21076C>T (Arg7026Ter)	Nonsense	rs769345284	190457	P/LP	1	2	SG-I	
	c.19944G>A (Ser6648Ser)	Missense	rs201553266	23502	P/LP/V	1	2	I	
	c.23372T>C (Met7791Thr)	Missense	rs201767727	167328	V/LB	3	3	0	[142]
	c.2235dupT (Lys746Ter) (NM_001164507)	Nonsense	X	NA	NA	0	2	0	
	c.25288C>T (Arg8430Ter)	Nonsense	rs747179265	451684	P/LP	0	1	I	
NPC1 (NM_000271)	c.6381T>A (Asp2127Glu)	Missense	rs368302286	257825	V/LB	0	1	0	[143]
	c.3467A>G (Asn1156Ser)	Missense	rs28942105	2959	P/LP	1	0	H-I	
	c.1301C>T (Pro434Leu)	Missense	rs774333145	429322	LP/V	1	0	I	
	c.346C>T (Arg116Ter)	Nonsense	rs144973225	NA	NA	1	0	0	[144]
	c.1990G>A (Val664Met)	Missense	rs376213990	370601	P/LP	1	0	I	
	c.3343G>T (Val1115Phe)	Missense	rs34226296	92712	V/B	1	0	0	[145]
	c.2324A>C (Gln775Pro)	Missense	rs80358253	21134	P	0	4	H-SG-I	
	c.1114C>T (Arg372Trp)	Missense	rs1346436537	NA	NA	0	1	0	[146]
	c.3011C>T (Ser1004Leu)	Missense	rs150334966	326253	LP/V	1	1	0	[147]
	c.3560C>T (Ala1187Val)	Missense	rs113371321	556002	V	0	1	0	[148]
	c.1351G>A (Glu451Lys)	Missense	rs781065429	554990	P/V	1	2	0	[149,150]
	c.1997G>A (Ser666Asn)	Missense	rs750480579	NA	NA	0	1	0	[151]
NPC2 (NM_006432)	c.3289G>A (Asp1097Asn)	Missense	rs758829443	597436	LP	1	1	0	
	c.334_335insTC (Lys112fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

PAH (NM_000277)	c.441+5G>T	Splicing	rs62507321	92742	P	1	0	SG-I	
	c.60+5G>T	Splicing	rs62514895	102751	P	1	0	SG-I	
	c.1241A>G (Tyr414Cys)	Missense	rs5030860	593	P	2	0	H-SG-I	
	c.299A>G (His100Arg)	Missense	rs148393887	306914	V	3	0	0	[152]
	c.59A>T (Gln20Leu)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[153]
	c.1139C>T (Thr380Met)	Missense	rs62642937	628	P	1	1	H-SG-I	
	c.1208C>T (Ala403Val)	Missense	rs5030857	92731	P	2	2	SG-I	
	c.745C>T (Leu249Phe)	Missense	rs74503222	102821	P	1	0	H-SG-I	
	c.824C>G (Phe275Arg)	Missense	rs62508715	102854	LP	2	0	I	
	c.1162G>A (Val388Met)	Missense	rs62516101	619	P	2	0	SG-I	
	c.158G>A (Arg53His)	Missense	rs118092776	102601	V	5	4	0	[154,155]
	c.212G>A (Arg71His)	Missense	rs62508695	102633	LP	1	0	I	
	c.688G>A (Val230Ile)	Missense	rs62516152	102784	LP	2	0	SG-I	
	c.728G>A (Arg243Gln)	Missense	rs62508588	591	P	1	0	H-SG-I	
	c.838G>A (Glu280Lys)	Missense	rs62508698	580	P	2	0	H-SG-I	
	c.898G>T (Ala300Ser)	Missense	rs5030853	92751	P	1	0	H-SG-I	
	c.165T>G (Phe55Leu)	Missense	rs199475598	92734	P/LP	1	0	SG-I	
	c.194T>C (Ile65Thr)	Missense	rs75193786	636	P	2	0	H-SG-I	
	c.734T>C (Val245Ala)	Missense	rs76212747	632	P	3	2	H-I	
	c.1066-11G>A	Splicing	rs5030855	607	P	0	6	H-SG-I	
	c.165delT (Phe55fs)	Frameshift	rs199475566	611	P	0	1	I	
	c.500A>T (Asn167Ile)	Missense	rs77554925	92743	LP	0	1	I	
	c.1042C>G (Leu348Val)	Missense	rs62516092	92727	P	0	1	H-SG-I	
	c.1222C>T (Arg408Trp)	Missense	rs5030858	577	P	0	1	H-SG-I	
	c.157C>T (Arg53Cys)	Missense	rs199475619	102600	V	0	1	SG	[156]
	c.527G>A (Arg176Gln)	Missense	rs74486803	102724	P	0	1	0	
	c.527G>T (Arg176Leu)	Missense	rs74486803	631	P	0	2	SG-I	
	c.782G>A (Arg261Gln)	Missense	rs5030849	582	P	0	2	H-SG-I	
	c.1045T>C (Ser349Pro)	Missense	rs62508646	615	P/LP	0	1	H-SG-I	
	c.143T>C (Leu48Ser)	Missense	rs5030841	608	P	0	2	H-SG-I	
c.932T>C (Leu311Pro)	Missense	rs62642936	578	P	0	1	SG-I		
PCCA (NM_000282)	c.69_78del (Gln23fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	I	
	c.923dupT (Leu308fs)	Frameshift	rs573607437	310846	P	0	1	H-SG	
	c.1891G>C (Gly631Arg)	Missense	rs796052018	203878	LP	0	2	SG-I	
PCCB (NM_000532)	c.1218_1231del14ins12 (Gly407fs)	Frameshift	X	496028	P	6	4	H-SG-I	

CI = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.1313delC (Ala438fs)	Frameshift		NA	NA	1	0	0	
	c.1490C>T (Ala497Val)	Missense	rs142403318	38877	LB/B	5	5	0	[157,158]
	c.737G>T (Gly246Val)	Missense	X	NA	NA	1	0	SG	[159]
	c.1173dupT (Val392fs)	Frameshift	rs587776758	12014	P	0	1	SG	
	c.201G>C (Arg67Ser)	Missense	X	NA	NA	0	1	0	[159]
	c.502G>A (Glu168Lys)	Missense	rs121964960	12015	P/LP	0	1	H-SG	
PCDH15 (NM_033056)	c.3043delA (Thr1015fs)	Frameshift		NA	NA	1	0	0	
	c.4341_4342insATCT (Asp1478fs)	Frameshift	rs768952458	NA	NA	1	0	0	
	c.5573_5576dup (p.Lys1859delinsAsnTer)	Frameshift	rs770082088	931061	V	1	0	0	
	c.5604_5635del (Arg1869fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.1591C>T (Leu531Phe)	Missense	rs750009006	557214	V/LB	1	0	0	[160]
	c.1006C>T (Arg336Ter)	Missense	rs370261904	370327	LP	2	0	SG	
	c.2539G>A (Asp847Asn)	Missense	rs751941551	300189	V	1	0	0	[161]
	c.692G>A (Cys231Tyr) (NM_001142767)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[161]
	c.1997+1G>A	Splicing	rs763797356	379720	P/LP	0	2	0	
	c.3984-2A>G	Splicing	X	NA	NA	0	1	0	
	c.4673_4676delTTAG (Val1558fs) (NM_001142769)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
	c.4831_4834dup (Thr1612fs)	Frameshift	rs545191822	227010	LB	0	1	0	[162]
	c.5347_5363del (Pro1783fs)	Frameshift	rs748086016	555843	LP/V	0	2	0	
	c.3358C>T (Arg1120Ter)	Nonsense	rs773404494	228389	P	1	2	0	
	c.875C>G (Pro292Arg)	Missense	rs138744579	557886	V	0	2	0	[25]
	PKHD1 (NM_138694)	c.3766delC (Gln1256fs)	Frameshift	rs746972457	188746	P/LP/V	1	0	SG-I
c.383delC (Thr128fs)		Frameshift	rs868562051	594678	P	2	0	H-SG-I	
c.8173+1G>A		Splicing	X	NA	NA	1	2	0	
c.5768A>T (Gln1923Leu)		Missense	rs150838488	196989	V	3	2	0	[162]
c.12027C>G (Tyr4009Ter)		Missense	rs143616240	198368	V/LB	1	1	SG-I	[164]
c.5125C>T (Leu1709Phe)		Missense	rs45517932	262404	V/LB	8	3	0	[165,166]
c.5410C>T (Arg1804Cys)		Missense	rs201906247	501154	V	2	2	0	[167]
c.55C>T (Arg19Cys)		Missense	rs767379405	500969	V	1	1	0	[168]
c.5134G>A (Gly1712Arg)		Missense	rs141103838	286651	P/V	2	4	SG-I	
c.10036T>C (Cys3346Arg)		Missense	rs149798764	198306	P/LP/V	4	2	0	
c.10658T>C (Ile3553Thr)	Missense	rs137852948	4113	P/V	2	2	H		

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.10637delT (Val3546fs)	Frameshift	rs770461067	279874	P	0	1	H-SG-I	
	c.9689delA (Asp3230fs)	Frameshift	rs398124502	96444	P	0	1	H-SG-I	
	c.2702A>C (Asn901Thr)	Missense	rs764696718	577838	V	0	2	0	[168]
	c.664A>G (Ile222Val)	Missense	rs369925690	406891	P/LP	0	2	H-SG-I	
	c.107C>T (Thr36Met)	Missense	rs137852944	4108	P/LP	0	1	H-SG-I	
	c.11089C>T (Gln3697Ter)	Nonsense	3696/4074 aa	NA	NA	0	2	0	
	c.11740C>T (Arg3914Ter)	Nonsense	rs761704401	554930	V	0	2	0	
	c.7853T>A (Leu2618Ter)	Nonsense	X	NA	NA	1	1	0	
	c.9552T>A (Tyr3184Ter)	Nonsense	X	NA	NA	0	1	0	
PMM2 (NM_000303)	c.109C>T (Gln37Ter)	Nonsense	rs764353860	632947	P/LP	1	0	I	
	c.97C>T (Gln33Ter)	Nonsense	rs149530060	803211	P	1	2	I	
	c.422G>A (Arg141His)	Missense	rs28936415	7706	P	3	6	H-SG-I	
	c.470T>C (PheF157Ser)	Missense	rs190521996	188763	P/LP	2	2	H-SG-I	
	c.91T>C (Phe31Leu)	Missense	rs749720760	425093	LP/V	2	1	0	[169]
	c.368G>A (Arg123Gln)	Missense	rs141498002	265255	P/LP/V	0	2	SG-I	
PPT1 (NM_000310)	c.451C>T (Arg151Ter)	Nonsense	rs137852700	8904	P/LP	1	1	H-SG-I	
	c.627+1G>T	Splicing	rs1265044710	465415	LP	1	0	I	
RDH12 (NM_152443)	c.250C>T (Arg84Ter)	Nonsense	rs1349849938	488802	P/LP	0	1	I	
	c.295C>A (Leu99Ile)	Missense	rs28940315	2055	P	0	2	H-SG-I	
	c.883C>T (Arg295Ter)	Nonsense	rs200387832	655601	P/LP	0	1	0	
	c.701G>A (Arg234His)	Missense	rs750636662	313842	V	1	1	0	[170–172]
RPE65 (NM_000329)	c.370C>T (Arg124Ter)	Nonsense	rs61752877	98866	P	1	1	I	
	c.1080delC (Val361fs)	Frameshift	rs770947426	518268	P	1	3	H-SG-I	
SGSH (NM_000199)	c.949+1G>A	Splicing	X	NA	NA	1	0	0	[173]
	c.197C>G (Ser66Trp)	Missense	rs104894637	5111	P	1	0	H-SG-I	
	c.251A>G (His84Arg)	Missense	X	NA	NA	0	2	0	[174]
	c.1456G>C (Val486Leu)	Missense	X	NA	NA	0	1	0	[175]
SLC22A5 (NM_003060)	c.1196G>A (Arg399Gln)	Missense	rs121908891	6424	P	1	0	H-SG	
	c.1412G>A (Arg471His)	Missense	rs386134223	25426	P/LP	1	0	0	
	c.1463G>A (Arg488His)	Missense	rs28383481	38794	P/LP/V /LB/B	1	0	SG	
	c.433G>T (Gly145Ter)	Nonsense	X	NA	NA	1	0	0	
	c.839dupC (Ser280fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	

CI = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

SLC26A2 (NM_000112)	c.1273A>G (Asn425Asp)	Missense	rs104893920	4093	P	1	0	I	
	c.532C>T (Arg178Ter)	Nonsense	rs104893919	4092	P	1	0	H-I	
	c.835C>T (Arg279Trp)	Missense	rs104893915	4089	P	4	8	H-SG-I	
SLC26A4 (NM_000441)	c.1342-1G>A	Splicing	X	NA	NA	0	1	I	
	c.1615-2A>G	Splicing	rs758823761	NA	NA	0	1	0	
	c.2171A>G (Asp724Gly)	Missense	rs757820624	228396	P/LP	0	3	I	
	c.1226G>A (Arg409His)	Missense	rs111033305	43496	P	0	1	I	
	c.1003T>C (Phe335Leu)	Missense	rs111033212	4842	V	2	2	I	[176]
	c.1034T>A (Leu345Ter)	Nonsense	X	NA	NA	0	2	I	
	c.1061T>C (Phe354Ser)	Missense	rs111033243	43492	V/LB	2	2	0	[177,178]
	c.1334T>G (Leu445Trp)	Missense	rs111033307	4829	P	0	1	I	
	c.1001+1G>A	Splicing	rs80338849	4819	P	1	0	H-SG-I	
	c.1001G>T (Gly334Val)	Missense	rs146281367	189039	LP	1	0	I	
SMN1 (NM_001297715)	Exon7del	Deletion	rs1561503058	571461	P	2 0	16	H-SG-I	
SMPD1 (NM_000543)	c.1474G>A (Gly492Ser)	Missense	rs144873307	445832	LP/V	2	1	0	
	c.1133G>A (Arg378His)	Missense	rs559088058	554977	P/LP/V	3	2	0	
	c.1460C>T (Ala487Val)	Missense	rs141641266	235490	V/LB/B	2	1	0	[179,180]
	c.1092-1G>C	Splicing	rs398123474	93312	P/LP	1	0	SG-I	
	c.1630delA (Thr544fs)	Frameshift	rs770962157	592260	P	1	0	SG-I	
	c.1550A>T (Glu517Val)	Missense	rs142787001	198094	LP/V/LB	1	1	0	[179]
	c.340G>A (Val114Met)	Missense	rs142215226	281705	V	1	1	0	[181]
c.996delc (Phe333fs)	Frameshift	rs387906289	2990	P	1	0	H-SG-I		
STAR (NM_000349)	c.562C>T (Arg188Cys)	Missense	rs104894090	8997	P	1	0	H	
	c.661G>A (Gly221Ser)	Missense	rs139081695	661662	LP	0	2	0	
USH1C (NM_153676)	c.1823C>G (Pro608Arg)	Missense	rs41282932	5148	V/LB	2	4	0	[182]
	c.1292G>T (Gly431Val)	Missense	rs751388655	550384	V	1	0	0	[182]
	c.2014-1G>A	Splicing	rs150567427	178566	P/V/B	0	1	0	
	c.586C>T (Arg196Ter) (NM_001297764)	Nonsense	rs1290295453	NA	NA	0	1	0	
AR (NM_000044)	c.173A>T (Gln58Leu)	Missense	rs200185441	402390	V	0	1	0	[183,184]
ARG1 (NM_000045)	c.272dupG (Arg92fs)	Frameshift	X	203606	P/LP	0	1	0	
BCKDHB (NM_000056)	c.831G>C (Trp277Cys)	Missense	X	NA	NA	0	1	0	[185]
CLN6 (NM_017882)	c.829_837delinsCCTG (Val277fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	

CI = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

	c.214G>T (Glu72Ter)	Nonsense	rs104894483	4077	P	1	0	H-SG-I	
CLRN1 (NM_001195794)	c.434-2A>T	Splicing	X	NA	NA	0	1	0	[141]
	c.118T>G (Cys40Gly)	Missense	rs121908143	4399	P/LP/V	0	1	SG-I	
COL4A4 (NM_000092)	c.3861delinsCTC (Arg1288fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
DLD (NM_000108)	c.685G>T (Gly229Cys)	Missense	rs121964990	11966	P	0	1	H-SG-I	
ETFA (NM_001127716)	c.347T>C (Val116Ala)	Missense	rs749455172	NA	NA	0	1	0	[186]
ETFDH (NM_004453)	c.1601C>T (Pro534Leu)	Missense	rs200920510	418184	P	1	0	I	
F8 (NM_000132)	c.190G>A (Val64Met)	Missense	rs187738612	NA	NA	1	0	0	[187]
	c.396A>C (Glu132Asp)	Missense	rs137852388	10171	P	2	1	SG-I	
	c.6374G>C (Ser2125Thr)	Missense	rs782363141	804136	V	1	0	0	[188]
	c.5144G>A (Arg1715Gln)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[189]
	c.3169G>A (Glu1057Lys)	Missense	rs28933673	10251	LP/V	1	0	SG-I	
	c.2150G>A (Arg717Gln)	Missense	X	NA	NA	0	1	0	[190]
	c.1834C>T (Arg612Cys)	Missense	rs137852428	10236	P	0	1	SG-I	
F9 (NM_000133)	c.967G>A (Glu323Lys)	Missense	rs150351950	695891	B	0	1	0	[191]
GALK1 (NM_000154)	c.593C>T (Ala198Val)	Missense	rs80084721	5633	V	0	1	H	[192]
	c.766C>T (Arg256Trp)	Missense	rs376790302	646613	P	0	1	0	
GLA (NM_000169)	c.376A>G (Ser126Gly)	Missense	rs149391489	163547	V/LB/B	0	1	0	[193]
	c.1088G>A (Arg363His)	Missense	rs111422676	222141	P	0	1	SG-I	
GNS (NM_002076)	c.192+1G>A	Splicing	X	NA	NA	0	1	0	
HADHB (NM_000183)	c.254+1G>A	Splicing	rs776172237	431987	P	0	1	I	
	c.1092delT (His364fs) (NM_001281512)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	[194]
IDS (NM_000202)	c.781C>G (Pro261Ala)	Missense	X	NA	NA	0	1	0	[195]
MFSB8 (NM_152778)	c.1006G>C (Glu336Gln)	Missense	rs150418024	162378	LP/V/B	1	0	0	
	c.whole_del (whole_deletion)	Deletion	X	NA	NA	1	0	0	
NAGLU (NM_000263)	c.700C>T (Arg234Cys)	Missense	rs104894601	1572	P	0	2	H-SG-I	
PEX7 (NM_000288)	c.875T>A (Leu292Ter)	Missense	rs1805137	7780	P	1	0	H-SG-I	
PROP1 (NM_006261)	c.217C>T (Arg73Cys)	Missense	rs121917843	8104	P	0	1	H-SG-I	
SLC25A13 (NM_001160210)	c.2029T>C (Ter677Gln)	Stop Lost	rs759865234	NA	NA	1	0	0	

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla Suplementaria 2. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en cada uno de los genes analizados con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectados por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

TPP1 (NM_000391)	c.89+1G>A	Splicing	X	NA	NA	0	1	0	[196]
	c.622C>T (Arg208Ter)	Nonsense	rs119455955	2643	P	0	1	H-SG-I	
USH2A (NM_206933)	c.(7594+1_7595-1)_7692del	Deletion	X	NA	NA	1	0	0	[141]
	c.12066+1G>A	Splicing	X	NA	NA	1	0	0	
	c.2299delG (Glu767fs)	Frameshift	rs80338903	2351	P	1	1	H-SG-I	
	c.5218delA (Ile1740fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.5278delG (Asp1760fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	I	
	c.8585delA (Gln2862fs)	Frameshift	X	NA	NA	1	0	0	
	c.15496A>G (Ile5166Val)	Missense	rs111033419	48465	V	1	0	0	[141,161]
	c.5624A>G (Asn1875Ser)	Missense	rs141609561	178579	LB	1	1	0	[197]
	c.9307A>G (Ile3103Val)	Missense	rs143352618	166464	V/LB	1	2	0	[141]
	c.10481C>G (Thr3494Arg)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[141]
	c.10759C>T (Gln3587Ter)	Nonsense	rs111033418	48357	P/LP	2	0	SG-I	
	c.11713C>T (Arg3905Cys)	Missense	rs368675850	236537	LP	1	0	0	
	c.11927C>T (Thr3976Met)	Missense	rs142381713	48385	V/LB	2	0	0	[198]
	c.4106C>T (Ser1369Leu)	Missense	rs201709513	48511	P/LP/V	1	0	0	
	c.6628C>G (Pro2210Ala)	Missense	rs192115090	166480	LB/B	1	0	0	[199,200]
	c.2276G>T (Cys759Phe)	Missense	rs80338902	2356	P	6	5	H-I	
	c.4378G>A (Gly1460Arg)	Missense	rs139311927	178581	V	1	0	0	[201]
	c.6670G>T (Gly2224Cys)	Missense	rs149553844	209202	P/V	2	2	0	[171,202]
	c.9871G>A (Gly3291Ser)	Missense	rs138543813	550545	V	1	0	0	[203]
	c.1225T>C (Trp409Arg)	Missense	X	NA	NA	1	0	0	[204]
	c.15364T>C (Cys5122Arg)	Missense	rs111033402	48461	V	3	0	0	[141]
	c.9799T>C (Cys3267Arg)	Missense	rs111033263	48634	P	1	1	SG-I	
	c.(6316+1_6317-1)_ (7300+1_7301-1)del	Deletion	X	NA	NA	0	1	0	[205]
	c.810delG (Met270fs)	Frameshift	X	NA	NA	0	1	0	
	c.14453C>T (Pro4818Leu)	Missense	rs143344549	504509	P/LP	0	2	0	
	c.4714C>T (Leu15Phe)	Missense	rs111033333	48521	LB	0	1	0	[197,206]
	c.5051C>T (Pro1684Leu)	Missense	rs771088957	558431	V	0	1	0	[207]

Cl = Clasificación; DO = Donante ovocitos, DS = Donante Semen; GEN-PANEL = Test genotipado; Bibl = Bibliografía; dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database

Tabla suplementaria 3

Tabla suplementaria 3. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en el gen CFTR analizado con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectadas por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

Variantes en CFTR (NM_000492)	Consecuencia molecular	CFTR2	Castellani et al.	ClinVar	DS	DO	Test	Bibl	Frec total GenomAD (10 ⁻⁴)	Frec CFTR+ CEIFER (10 ⁻³)
c.1210-34TG(13)T(5)	Splicing	VC	A-B	P/V/LB	1	1	SG-E	30	N/S	1.10
c.1210-34TG(11)T(5)	Splicing	VC	B-C	P/V/LB	37	38	SG-E	30	N/S	41.25
c.1210-34TG(12)T(5)	Splicing	VC	A-B	P/V/LB	22	24	SG-E	30, 31	N/S	25.30
c.224G>A (Arg75Gln)	Missense	NCC	NCC	V/LB/B	19	19	0	32-35	156.5	20.90
c.2991G>C (Leu997Phe)	Missense	NCC	B	P/LP/V/LB/B	16	16	SG	31, 35-39	22.22	17.60 *
c.1521_1523delCTT (Phe508delPhe)	Missense	CC	A	P	12	13	H-SG-I-E		71.72	13.75
c.2260G>A (Val754Met)	Missense	NCC	N/S	V/LB/B	9	8	0	40-42	18.16	9.35 *
c.3041A>G (Tyr1014Cys)	Missense	SUE	N/S	V	6	2	0	31, 43, 44	2.58	4.40 *
c.958T>G (Leu320Val)	Missense	NCC	N/S	V	4	3	0	39, 45, 46	5.77	3.85 *
c.1052C>G (Thr351Ser)	Missense	N/S	N/S	V	4	2	0	45, 47	1.70	3.30 *
c.772A>G (Arg258Gly)	Missense	N/S	N/S	P/LP/V	3	2	0	41, 48, 49	1.72	2.20 *
c.3154T>G (Phe1052Val)	Missense	VC	N/S	P	3	4	SG	34, 38, 50, 51, 52	6.28	3.85 *
c.3484C>T (Arg1162Ter)	Nonsense	CC	A	P	2	0	H-SG-I-E		0.57	1.10
c.3909C>G (Asn1303Lys)	Missense	CC	A	P	2	3	H-SG-I-E		1.39	2.75 *
c.1624G>T (Gly542Ter)	Nonsense	CC	A	P	2	3	H-SG-I-E		3.22	2.75 *
c.3454G>C (Asp1152His)	Missense	VC	A-B	P	2	1	H-SG-I-E		3.76	1.65
c.601G>A (Val201Met)	Missense	SUE	N/S	V	2	3	0	53-55	2.16	2.75 *

A = mutación que causa FQ; B = mutaciones asociadas a clínica relacionada con FQ; C = No consecuencias clínicas; D = consecuencias clínicas de la mutación indeterminadas; CC = variante causante de FQ; NCC = variante no causante de FQ; N/S = variante no hallada en la base de datos CFTR2; SUE= Bajo evaluación; VC = variante con consecuencias clínicas variadas; DS=Donante de semen; DO=Donante de ovocitos; Bibl=Bibliografía; Frec=Frecuencia; * Existen diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias poblacionales descritas en GenomAD y CEIFER.

Tabla suplementaria 3. Variantes patogénicas halladas en donantes de semen y de ovocitos en el gen CFTR analizado con qCarrier Plus (NGS), que habrían sido detectadas por los paneles de genotipado H, I y/o SG.

c.2939T>A (Ile980Lys)	Missense	N/S	N/S	P/LP/V	2	0	SG	56	0.08	1.10 *
c.350G>A (Arg117His)	Missense	VC	A-B	P	1	0	H-SG-I		14.4	0.55
c.3266G>A (Trp1089Ter)	Nonsense	CC	A-B	P	1	0	H-SG-I		0.24	0.55
c.254G>A (Gly85Glu)	Missense	CC	A	P	1	0	H-SG-I-E		0.39	0.55
c.2758G>A (Val920Met)	Missense	N/S	N/S	P/V	1	0	0		1.27	0.55
c.2856G>C (Met952Ile)	Missense	N/S	B	P/LP/V	2	3	0		0.80	1.65 *
c.3389G>C (Gly1130Ala)	Missense	N/S	N/S	NA	1	0	0	57	0.32	0.55
c.1148T>C (Leu383Ser)	Missense	N/S	N/S	NA	1	0	0	58	N/S	0.55
c.1523T>G (Phe508Cys)	Missense	NCC	B-C	P/V/B	1	1	0	59	9.48	1.10
c.1616T>C (Ile539Thr)	Missense	N/S	N/S	V	1	0	0	60	0.20	0.55
c.695T>A (Val232Asp)	Missense	CC	A-B	P	1	0	I-E		0.24	0.55
c.2900T>C (Leu967Ser)	Missense	VC	N/S	P/LP/V	1	2	0	35, 61	7.04	7.65
c.1000C>T (Arg334Trp)	Missense	VC	N/S	P	1	0	H-SG-I-E		0.57	0.55
c.1684G>C (Val562Leu)	Missense	N/S	N/S	LP/V	1	5	SG		0.04	3.30 *
c.2657+5G>A	Splicing	CC	A	P	1	0	H-SG-I-E		0.71	0.55
c.489+3A>G	Splicing	VC	A	P/LP/V	1	0	0		2.28	0.55
c.2421A>G (Ile807Met)	Missense	NCC	C	P/V/LB/B	1	0	0	61	7.02	0.55
c.1684G>A (Val562Ile)	Missense	NCC	N/S	V	1	0	0	61, 73	1.42	0.55
c.1315C>T (Pro439Ser)	Missense	N/S	N/S	LP/V	1	0	0	45	N/S	0.55
c.1495C>G (Pro499Ala)	Missense	N/S	N/S	V	1	0	0	62	0.20	0.55
c.332C>T (Pro111Leu)	Missense	N/S	N/S	P/V	1	0	0	63-64	0.60	0.55
c.3808G>A (Asp1270Asn)	Missense	VC	B	P/V/LB	3	6	0	65-67	15.1	4.95

A = mutación que causa FQ; B = mutaciones asociadas a clínica relacionada con FQ; C = No consecuencias clínicas; D = consecuencias clínicas de la mutación indeterminadas; CC = variante causante de FQ; NCC = variante no causante de FQ; N/S = variante no hallada en la base de datos CFTR2; SUE= Bajo evaluación; VC = variante con consecuencias clínicas variadas; DS=Donante de semen; DO=Donante de ovocitos; Bibl=Bibliografía; Frec=Frecuencia. * Existen diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias poblacionales descritas en GenomAD y CEIFER.

*Bibliografía Tabla
suplementaria 2 y 3*

1. Tonin R, Caciotti A, Funghini S, Pasquini E, Mooney SD, Cai B, et al. Clinical relevance of short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: Exploring the role of new variants including the first SCAD-disease-causing allele carrying a synonymous mutation. *BBA Clin.* 2016;5:114–9.
2. Hoffmann L, Haussmann U, Mueller M, Spiekerkoetter U. VLCAD enzyme activity determinations in newborns identified by screening: A valuable tool for risk assessment. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35:269–77.
3. Pena LDM, Calcar SCV, Hansen J, Edick MJ, Walsh C, Leslie N, et al. Outcomes and genotype-phenotype correlations in 52 individuals with VLCAD deficiency diagnosed by NBS and enrolled in the IBEM-IS database. *Molec. Genet. Metab.* 2017;118:272–81.
4. Evans M, Andresen BS, Nation J, Boneh A. VLCAD deficiency: Follow-up and outcome of patients diagnosed through newborn screening in Victoria. *Mol Genet Metab.* 2016;118:282–7.
5. Santamaria R, Esposito G, Vitagliano L, Race V, Paglionico I, Zancan L, et al. Functional and molecular modelling studies of two hereditary fructose intolerance-causing mutations at arginine 303 in human liver aldolase. *Biochem J.* 2000;350:823–8.
6. Balmer C, Pandey A V., Rüfenacht V, Nuoffer JM, Fang P, Wong LJ, et al. Mutations and Polymorphisms in the Human Argininosuccinate Lyase (ASL) Gene. *Hum Mutat.* 2014;35:27–35.

7. Carranza D, Vega AK, Torres-Rusillo S, Montero E, Martinez LJ, Santamaría M, et al. Molecular and Functional Characterization of a Cohort of Spanish Patients with Ataxia-Telangiectasia. *NeuroMolecular Med.* 2017;19:161–74.
8. Carney EF, Srinivasan V, Moss PA, Taylor AM. Classical Ataxia Telangiectasia Patients Have a Congenitally Aged Immune System with High Expression of CD95. *J Immunol.* 2012;189:261–8.
9. Margarit E, Bach V, Gómez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population - Identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet.* 2005;68:61–8.
10. Cox DW, Prat L, Walshe JM, Heathcote J, Gaffney D. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly European ancestry. *Hum Mutat.* 2005;26:280.
11. Davies LP, Macintyre G, Cox DW. New mutations in the Wilson disease gene, ATP7B: Implications for molecular testing. *Genet Test.* 2008;12:139–45.
12. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, McLay K, Emmerson J, Lo C, et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain.* 2013;136:1476–87.

13. Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, Kozak L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab.* 2005;86:277–85.
14. Simsek Papur O, Akman SA, Cakmur R, Terzioglu O. Mutation analysis of ATP7B gene in Turkish Wilson disease patients: Identification of five novel mutations. *Eur J Med Genet.* 2013;56:175–9.
15. Papur OS, Terzioglu O, Koc A. Functional characterization of new mutations in Wilson disease gene (ATP7B) using the yeast model. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:33–6.
16. Fanin M, Nascimbeni AC, Tasca E, Angelini C. How to tackle the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:598–603.
17. Sevy A, Cerino M, Gorokhova S, Dionnet E, Mathieu Y, Verschueren A, et al. Improving molecular diagnosis of distal myopathies by targeted next-generation sequencing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87:340–2.
18. Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, et al. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J Med Genet.* 2005;42:686–93.
19. Jaka O, Azpitarte M, Paisán-Ruiz C, Zulaika M, Casas-Fraile L, Sanz R, et al. Entire CAPN3 gene deletion in a patient with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Muscle and Nerve.* 2014;50:448–53.

20. Sebastio G, Franchis R De, Andria G, Kluijtmans LAJ, Blom H, Boers GHJ, et al. Cystathionine β -Synthase Mutations in Homocystinuria. *Hum Mutat.* 1999;13:362–75.
21. Janošík M, Sokolová J, Janošíková B, Krijt J, Klatovská V, Kožich V. Birth Prevalence of Homocystinuria in Central Europe: Frequency and Pathogenicity of Mutation c.1105C>T (p.R369C) in the Cystathionine Beta-Synthase Gene. *J Pediatr.* 2009;154:431–7.
22. Sommen M, Schrauwen I, Vandeweyer G, Boeckx N, Corneveaux JJ, van den Ende J, et al. DNA Diagnostics of Hereditary Hearing Loss: A Targeted Resequencing Approach Combined with a Mutation Classification System. *Hum Mutat.* 2016;37:812–9.
23. Aparisi MJ, Aller E, Fuster-García C, García-García G, Rodrigo R, Vázquez-Manrique RP, et al. Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of usher syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9.
24. Moteki H, Azaiez H, Booth K, Shearer AE, Sloan CM, Kolbe DL, et al. Comprehensive genetic testing with ethnic-specific filtering by allele frequency in a Japanese hearing-loss population. *Clin Genet.* 2017;89:466–72.
25. Besnard T, García-García G, Baux D, Vaché C, Faugère V, Larrieu L, et al. Experience of targeted usher exome sequencing as a clinical test. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2:30–43.
26. Astuto LM, Bork JM, Weston MD, Askew JW, Fields RR, Orten DJ, et al. CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: A profile of 107 diverse

families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet.* 2002;71:262–75.

27. Zaneveld J, Siddiqui S, Li H, Wang X, Wang H, Wang K, et al. Comprehensive analysis of patients with Stargardt macular dystrophy reveals new genotype-phenotype correlations and unexpected diagnostic revisions. *Genet Med.* 2015;17:262–70.

28. Jaijo T, Aller E, García-García G, Aparisi MJ, Berna S, Ávila-Fernández A, et al. Microarray-based mutation analysis of 183 Spanish families with Usher syndrome. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:1311–7.

29. Ganapathy A, Pandey N, Srisailapathy CRS, Jalvi R, Malhotra V, Venkatappa M, et al. Non-syndromic hearing impairment in India: High allelic heterogeneity among mutations in *TMPRSS3*, *TMC1*, *USH1C*, *CDH23* and *TMIE*. *PLoS One.* 2014;9.

30. Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med.* 2001;3:149-54.

31. Casals T, De-Gracia J, Gallego M, Dorca J, Rodríguez-Sanchón B, Ramos MD et al. Bronchiectasis in adult patients: an expression of heterozygosity for *CFTR* gene mutations? *Clin Genet.* 2004;65:490-5.

32. Tzetis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E et al. *CFTR* gene mutations--including three novel nucleotide substitutions--and haplotype background in patients with asthma, disseminated

bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet.* 2001;108:216-21.

33. Martinez B, Heller M, Gaitch N, Hubert D, Burgel PR, Levy P et al. p.Arg75Gln, a CFTR variant involved in the risk of CFTR-related disorders? *J Hum Genet.* 2014;59:206-10.

34. Divac A, Nikolic A, Mitic-Milikic M, Nagorni-Obradovic L, Petrovic-Stanojevic N, Dopudja-Pantic V et al. High frequency of the R75Q CFTR variation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cyst Fibros.* 2004;3:189-91.

35. Borowitz D. CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50:S24-S30.

36. Strom CM, Redman JB, Peng M. The dangers of including nonclassical cystic fibrosis variants in population-based screening panels: p.L997F, further genotype/phenotype correlation data. *Genet Med.* 2011;13:1042–1044.

37. Hamoir C, Pepermans X, Piessevaux H, Jouret-Mourin A, Weynand B, Habyalimana JB et al. Clinical and morphological characteristics of sporadic genetically determined pancreatitis as compared to idiopathic pancreatitis: higher risk of pancreatic cancer in CFTR variants. *Digestion.* 2013;87:229-39.

38. Gomez M, Benetazzo MG, Marzari MG, Bombieri C, Belpinati F, Castellani C et al. High frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator

mutation L997F in patients with recurrent idiopathic pancreatitis and in newborns with hypertrypsinemia. *Am. J. Hum Genet.* 2000;66:2013-4.

39. Keiles S, Kammesheidt A. Identification of CFTR, PRSS1 and SPINK1 mutations in 381 patients with pancreatitis. *Pancreas.* 2006;33:221-7.

40. Bergougnoux A, Viart V, Miro J, Bommart S, Molinari N, des Georges M et al. Should diffuse bronchiectasis still be considered a CFTR-related disorder? *J Cyst Fibros.* 2015;14:646-53.

41. Grangeia A, Sá R, Carvalho F, Martin J, Girodon E, Silva J et al. Molecular characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in congenital absence of the vas deferens. *Genet Med.* 2007;9:163-72.

42. Dal'Maso VB, Mallmann L, Siebert M, Simon L, Saraiva-Pereira ML, Dalcin Pde T. Diagnostic contribution of molecular analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in patients suspected of having mild or atypical cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2013;39:181-9.

43. Alonso MJ, Heine-Suñer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD et al. Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet.* 2007;71:194-201.

44. Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Giménez J, Segura A et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod.* 2000;15:1476-83.

45. Schrijver I, Ramalingam S, Sankaran R, Swanson S, Dunlop CL, Keiles S et al. Diagnostic testing by CFTR gene mutation analysis in a large group of Hispanics: novel mutations and assessment of a population-specific mutation spectrum. *J Mol Diagn.* 2005;7:289-99.

46. Pelletier AL, Bienvenu T, Rebours V, O'Toole D, Hentic O, Maire F et al. CFTR gene mutation in patients with apparently idiopathic pancreatitis: lack of phenotype-genotype correlation. *Pancreatology.* 2010;10:158-64.

47. Dörk T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, Wieczorek D, Böhm I, Mayerova A et al. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet.* 1997;100:365-77.

48. De Wachter E, Thomas M, Wanyama SS, Seneca S, Malfroot A. What can the CF registry tell us about rare CFTR-mutations? A Belgian study. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12:142.

49. Masvidal L, Giménez J, Ramos MD, Domingo C, Farré A, Bassas L et al. The p.Arg258Gly mutation in intracellular loop 2 of CFTR is associated with CFTR-related disorders. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13:765-8.

50. LaRusch J, Jung J, General IJ, Lewis MD, Woo Park H, Brand RE et al. Mechanisms of CFTR functional variants that impair regulated bicarbonate permeation and increase risk for pancreatitis but not for cystic fibrosis. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004376

51. Van Goor F, Yu H, Burton B, Hoffman BJ. Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *J Cyst Fibros*. 2014;13:29-36.

52. Puéchal X, Bienvenu T, Génin E, Berthelot JM, Sibilia J, Gaudin P et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with bronchiectasis associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:653-9.

53. Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE et al. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test*. 2000;4:69-74.

54. Boudaya M, Fredj SH, Haj RB, Khrouf M, Bouker A, Halouani L et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations and polymorphisms associated with congenital bilateral absence of vas deferens in a restricted group of patients from North Africa. *Ann Hum Biol*. 2012;39:76-9.

55. Giusti R, Badgwell A, Iglesias AD. New York State cystic fibrosis consortium: the first 2.5 years of experience with cystic fibrosis newborn screening in an ethnically diverse population. *Pediatrics*. 2007;119:e460-7.

56. Bienvenu T, Hubert D, Setbon E, Dusser D, Kaplan J.C and Beldjord C. A novel missense mutation in exon 16 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (cfr) gene identified in cbavd patients. *Hum Mutat*. 1996;7:182.

57. Dayangac D, Erdem H, Yilmaz E, Sahin A, Sohn C, Özgüc M, et al. Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod.* 2004;19:1094-100.
58. Havasi V, Keiles S, Hambuch T, Sorscher E.J, MD and Kammesheidt A. The role of the F508C mutation in congenital bilateral absence of the vas deferens. *Genet in Medic.*2008;10:12.
59. Xiao Y, Yuan W, Yu Y, Yu B, Guo Y, Xu X et al. Targeted Gene Next-Generation Sequencing in Chinese Children with Chronic Pancreatitis and Acute Recurrent Pancreatitis. *J Pediatr.* 2017;191:158-63.
60. Masson E, Chen JM, Audrézet MP, Cooper DN, Férec C. A conservative assessment of the major genetic causes of idiopathic chronic pancreatitis: data from a comprehensive analysis of PRSS1, SPINK1, CTSC and CFTR genes in 253 young French patients. *PLoS One.* 2013;8:e73522.
61. Arduino C, Ferrone M, Brusco A, Garnerone S, Fontana D, Rolle L, et al. Congenital bilateral absence of vas deferens with a new missense mutation (P499A) in the CFTR gene. *Clin Genet.*1988;53:202-4.
62. Hasenpusch-Theil K, Bataille V, Laehdetie J, Obermayr F, Sampson J.R, Frischauf A.M. Gorlin Syndrome: Identification of 4 novel germline mutations of the human patched (PTCH) gene. *Hum Mutat.* 1997;11:480.
63. Steiner B, Rosendahl J, Witt H, Teich N, Keim V, Schulz H-U, et al. Common CFTR Haplotypes and Susceptibility to Chronic Pancreatitis and Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. *Hum Mutat.* 2011;32:912-20.

64. Ratbi I, Legendre M, Niel F, Martin J, Soufir JC, Izard V et al. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling. *Hum Reprod.* 2007;22:1285-91.

65. de Prada A, Bütschi FN, Bouchardy I, Beckmann JS, Morris MA, Hafen GM and Fellmann F. [R74W;R1070W;D1270N]: a new complex allele responsible for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2010;9:447-9.

66. de Gracia J, Mata F, Alvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax.* 2005;60:558-63.

67. Kiliñç MO, Ninis VN, Dağlı E, Demirkol M, Ozkinay F, Arıkan Z et al. Highest heterogeneity for cystic fibrosis: 36 mutations account for 75% of all CF chromosomes in Turkish patients. *Am J Med Genet.* 2002;113:250-7.

68. Kahnoski K, Khoo SK, Nassif NT, Chen J, Lobo GP, Segelov E et al. Alterations of the Birt-Hogg-Dubé gene (BHD) in sporadic colorectal tumours. *J Med Genet.* 2003;40:511-5.

69. Gomez M, Patuzzo C, Castellani C, Bovo P, Cavallini G, Mastella G et al. CFTR and cationic trypsinogen mutations in idiopathic pancreatitis and neonatal hypertrypsinemia. *Pancreatology.* 2001;1:538-42.

70. Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y et al. Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis

transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2015;60:1297-307.

71. Jurkuvenaite A, Varga K, Nowotarski K, Kirk KL, Sorscher EJ, Li Y et al. Mutations in the amino terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhance endocytosis. *J Biol Chem*. 2006;281:3329-34.

72. Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C et al. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat*. 2000;16:143-56.

73. Audrézet MP, Novelli G, Mercier B, Sangiuolo F, Maceratesi P, Férec C et al. Identification of three novel cystic fibrosis mutations in a sample of Italian cystic fibrosis patients. *Hum Hered*. 1993;43:295-300.

74. Scotet V, De Braekeleer M, Audrézet MP, Lodé L, Verlingue C, Quéré I et al. Prevalence of CFTR mutations in hypertrypsinaemia detected through neonatal screening for cystic fibrosis. *Clin Genet*. 2001;59:42-7.

75. Chneider A, Larusch J, Sun X, Aloe A, Lamb J, Hawes R et al. Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2011;140:162-71.

76. Mak V, Zielenski J, Tsui LC, Durie P, Zini A, Martin S et al. Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA*. 1999;281:2217-24.

77. Padoan R, Genoni S, Moretti E, Seia M, Giunta A, Corbetta C. Genetic and clinical features of false-negative infants in a neonatal screening programme for cystic fibrosis. *Acta Paediatr.* 2002;91:82-7.

78. Escámez MJ, García M, Cuadrado-Corrales N, Llamas SG, Charlesworth A, De Luca N, et al. The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: C.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol.* 2010;163:155–61.

79. Hovnanian A, Rochat A, Bodemer C, Petit E, Rivers CA, Prost C, et al. Characterization of 18 new mutations in COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet.* 1997;61:599–610.

80. Varki R, Sadowski S, Uitto J, Pfenninger E. Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet.* 2007;44:181–92.

81. Almaani N, Liu L, Dopping-Hepenstal PJC, Lai-Cheong JE, Wong A, Nanda A, et al. Identical glycine substitution mutations in type VII collagen may underlie both dominant and recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa. *Acta Derm Venereol.* 2011;91:262–6.

82. Mahto A, McGrath JA, Deroide F, Rustin MHA. Late-onset pretibial recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol.* 2013;38:630–2.

83. Winberg JO, Hammami-Hauasli N, Nilssen Ø, Anton-Lamprecht I, Naylor SL, Kerbacher K, et al. Modulation of disease severity of dystrophic epidermolysis bullosa by a splice site mutation in combination with a missense mutation in the COL7A1 gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6:1125–35.

84. Christiano AM, McGrath JA and Uitto J. Influence of the second COL7A1 Mutation in determining the phenotypic severity of Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol.* 1996; 106:766-70.

85. Saeidian AH, Youssefian L, Moreno Trevino MG, Fortuna G, Vahidnezhad H, Atanasova VS, et al. Seven novel COL7A1 mutations identified in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa from Mexico. *Clin Exp Dermatol.* 2018;43:579–84.

86. Gardella R, Zoppi N, Ferraboli S, Marini D, Tadini G, Barlati S, et al. Three homozygous PTC mutations in the collagen type VII gene of patients affected by recessive dystrophic epidermolysis bullosa: Analysis of transcript levels in dermal fibroblasts. *Hum Mutat.* 1999;13:439–52.

87. Fassihi H, Renwick PJ, Black C, McGrath JA. Single cell pcr amplification of microsatellites flanking the COL7A1 gene and suitability for preimplantation genetic diagnosis of hallopeau-siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol Sci.* 2006;42:241–8.

88. Alcántara-Ortigoza MÁ, Belmont-Martínez L, Vela-Amieva M, González-Del Angel A. Analysis of the CTNS gene in nephropathic cystinosis Mexican patients: Report of four novel mutations and identification of a false

positive 57-kb deletion genotype with LDM-2/exon 4 multiplex PCR assay. *Genet Test*. 2008;12:409–14.

89. Shotelersuk V, Larson D, Anikster Y, McDowell G, Lemons R, Bernardini I, et al. CTNS mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am J Hum Genet*. 1998;63:1352–62.

90. Rodríguez-Pombo P, Navarrete R, Merinero B, Gómez-Puertas P, Ugarte M. Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain. *Hum Mutat*. 2006;27:715.

91. Tsuruta M, Mitsubuchi H, Mardy S, Miura Y, Hayashida Y, Kinugasa A, et al. Molecular basis of intermittent maple syrup urine disease: Novel mutations in the E2 gene of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *J Hum Genet*. 1998;43:91–100.

92. Ellingson MS, Wick MJ, White WM, Raymond KM, Saenger AK, Pichurin PN et al. Pregnancy in an individual with Mild Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Clin Genet*. 2014;85:495-7.

93. Patrono C, Dionisi-Vici C, Giannotti A, Bembi B, Digilio MC, Rizzo C, et al. Two novel mutations of the human Δ^7 -sterol reductase (DHCR7) gene in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Cell Probes*. 2002;16:315–8.

94. DaRe JT, Vasta V, Penn J, Tran NTB, Hahn SH. Targeted exome sequencing for mitochondrial disorders reveals high genetic heterogeneity. *BMC Med Genet*. 2013;14:1.

95. Arranz JA, Piñol F, Kozak L, Pérez-Cerdá C, Cormand B, Ugarte M, et al. Splicing mutations, mainly IVS6.1 (G>T), account for 70% of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) gene alterations, including 7 novel mutations, in a survey of 29 tyrosinemia type I patients. *Hum Mutat.* 2002;20:180–8.
96. Boito CA, Melacini P, Vianello A, Prandini P, Gavassini BF, Bagattin A, et al. Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol.* 2005;62:1894–9.
97. Rosales XQ, Moser SJ, Tran T, McCarthy B, Dunn N, Habib P, et al. Cardiovascular magnetic resonance of cardiomyopathy in limb girdle muscular dystrophy 2B and 2I. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2011;13:39.
98. Marks PA, Banks J, Gross RT. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Nature.* 1962;194:454–6.
99. Cittadella R, Civitelli D, Manna I, Azzia N, Cataldo A, Schiliroa G, et al. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in south-east Sicily. *Ann Hum Genet.* 1997;61:229–34.
100. Sáenz GF, Chaves M, Berrantes A, Elizondo J, Montero AG, Yoshida A. A glucose-6-phosphate dehydrogenase variant, gd(-) santamaria found in costa rica¹. *Acta Haematol.* 1984;72:37–40.
101. Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, Enríquez-Flores S, De la Mora-De la Mora I, González-Valdez A, et al. Mutations of glucose-6-phosphate dehydrogenase durham, Santa-Maria and A+ variants are

associated with loss functional and structural stability of the protein. *Int J Mol Sci.* 2015;16:28657–68.

102. Gort L, Coll MJ, Chabás A. Glycogen storage disease type II in Spanish patients: High frequency of c.1076-1G>C mutation. *Mol Genet Metab.* 2007;92:183–7.

103. Musumeci O, Catalano N, Barca E, Ravaglia S, Fiumara A, Gangemi G, et al. Auditory system involvement in late onset Pompe disease: A study of 20 Italian patients. *Mol Genet Metab.* 2012;107:480–4.

104. Luzi P, Rafi MA, Wenger DA. Multiple mutations in the GALC gene in a patient with adult-onset Krabbe disease. *Ann Neurol.* 1996;40:116–9.

105. Shao YH, Choquet K, La Piana R, Tétreault M, Dicaire MJ, Boycott KM, et al. Mutations in GALC cause late-onset Krabbe disease with predominant cerebellar ataxia. *Neurogenetics.* 2016;17:137–41.

106. Orsini JJ, Kay DM, Saavedra-Matiz CA, Wenger DA, Duffner PK, Erbe RW, et al. Newborn screening for Krabbe disease in New York State: The first eight years' experience. *Genet Med.* 2016;18:239–48.

107. Yamada N, Fukuda S, Tomatsu S, Muller V, Hopwood JJ, Nelson J, et al. Molecular heterogeneity in mucopolysaccharidosis IVA in Australia and Northern Ireland: Nine novel mutations including T312S, a common allele that confers a mild phenotype. *Hum Mutat.* 1998;11:202–8.

108. Tomatsu S, Nishioka T, Montaña AM, Gutierrez MA, Pena OS, Orii KO, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: identification of mutations and methylation study in GALNS gene. *J Med Genet.* 2004;41:1–6.

109. Pajares S, Alcalde C, Couce ML, Del Toro M, González-Meneses A, Guillén E, et al. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A) in Spain. *Mol Genet Metab.* 2012;106:196–201.

110. Pintos-Morell G, Blasco-Alonso J, Couce ML, Gutiérrez-Solana LG, Guillén-Navarro E, O'Callaghan M, et al. Elosulfase alfa for mucopolysaccharidosis type IVA: Real-world experience in 7 patients from the Spanish Morquio-A early access program. *Mol Genet Metab Reports.* 2018;15:116–20.

111. Gort L, Boleda MD, Tyfield L, Vilarinho L, Rivera I, Cardoso ML, et al. Mutational spectrum of classical galactosaemia in Spain and Portugal. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:739–42.

112. Stone DL, Tayebi N, Orvisky E, Stubblefield B, Madike V, Sidransky E. Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat.* 2000;15:181–8.

113. Filocamo M, Grossi S, Stroppiano M, Regis S, Tortori-Donati P, Allegri A, et al. Homozygosity for a non-pseudogene complex glucocerebrosidase allele as cause of an atypical neuronopathic form of Gaucher disease. *Am J Med Genet.* 2005;134 A:95–6.

114. Busquets C, Merinero B, Christensen E, Gelpí JL, Campistol J, Pineda M, et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: Evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. *Pediatr Res*. 2000;48:315–22.

115. Gandía M, del Castillo FJ, Rodríguez-Álvarez FJ, Garrido G, Villamar M, Calderón M, et al. A Novel Splice-Site Mutation in the GJB2 Gene Causing Mild Postlingual Hearing Impairment. *PLoS One*. 2013;8:1–9.

116. Gualandi F, Ravani A, Berto A, Sensi A, TrabANELLI C, Falciano F, et al. Exploring the clinical and epidemiological complexity of GJB2-linked deafness. *Am J Med Genet*. 2002;112:38–45.

117. Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet*. 2000;106:40–4.

118. Amorini M, Romeo P, Bruno R, Galletti F, Di Bella C, Longo P, et al. Prevalence of Deafness-Associated Connexin-26 (GJB2) and Connexin-30 (GJB6) Pathogenic Alleles in a Large Patient Cohort from Eastern Sicily. *Ann Hum Genet*. 2015;79:341–9.

119. Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PLM, Moreno F, Del Castillo I, et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet*. 2004;41:147–54.

120. Silva CMD, Severini MH, Sopelsa A, Coelho JC, Zaha A, D'Azzo A, et al. Six novel β -galactosidase gene mutations in Brazilian patients with GM1-gangliosidosis. *Hum Mutat.* 1999;13:401–9.
121. Gort L, Santamaria R, Grinberg D, Vilageliu, Chabás A. Identification of a novel pseudodeficiency allele in the GLB1 gene in a carrier of GM1 gangliosidosis. *Clin Genet.* 2007;72:109–11.
122. Santamaria R, Chabás A, Coll MJ, Miranda CS, Vilageliu L, Grinberg D. Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: possible common origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies. *Hum Mutat.* 2006;27:1060.
123. Huang Z, Sun Y, Fan Y, Wang L, Liu H, Gong Z, et al. Genetic Evaluation of 114 Chinese Short Stature Children in the Next Generation Era: A Single Center Study. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49:295–305.
124. Fernández-Marmiesse A, Morey M, Pineda M, Eiris J, Couce ML, Castro-Gago M, et al. Assessment of a targeted resequencing assay as a support tool in the diagnosis of lysosomal storage disorders. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9.
125. Brunner-Agten S, Hergersberg M, Herklotz R, Hirt A, Huber AR. Compound heterozygosity of Hb Hamilton and de novo mutated HbM Saskatoon. *Ann Hematol.* 2010;89:517–8.
126. Eng B, Chui DHK, Saunderson J, Olivieri NF, Wayne JS. Identification of two novel β^0 -thalassemia mutations in a filipino family: Frameshift codon 67 (– TG) and a β -globin gene deletion. *Hum Mutat.* 1993;2:375–9.

127. Inglehearn C, Farrart J, Denton M, Gal A, Humphriest SP and Bhattacharya S. Extensive Genetic Heterogeneity in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *J Hum Genet.* 1993; 53:537-9.

128. Tang NLS, Hui J, Yong CKK, Wong LTK, Applegarth DA, Vallance HD, et al. A genomic approach to mutation analysis of holocarboxylase synthetase gene in three Chinese patients with late-onset holocarboxylase synthetase deficiency. *Clin Biochem.* 2003;36:145–9.

129. Pearl PL, Hyland K, Chiles J, McGavin CL, Yu Y, Taylor D. Partial Pyridoxine Responsiveness in PNPO Deficiency. *JIMD Rep.* 2012;4:113–6.

130. Ozgul RK, Karaca M, Kilic M, Kucuk O, Yucel-Yilmaz D, Unal O, et al. Phenotypic and genotypic spectrum of turkish patients with isovaleric acidemia. *Eur J Med Genet.* 2014;57:596–601.

131. Mohsen AA, Anderson BD, Volchenboum SL, Battaile KP, Tiffany K, Roberts D, et al. Characterization of Molecular Defects in Isovaleryl-CoA Dehydrogenase in Patients with Isovaleric Acidemia. *Biochemistry.* 1998;2960:10325–35.

132. Fonseca H, Azevedo L, Serrano C, Sousa C, Marcão A, Vilarinho L. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Mutational spectrum derived from comprehensive newborn screening. *Gene.* 2016;594:203–10.

133. Grünert SC, Stucki M, Morscher RJ, Suormala T, Bürer C, Burda P, et al. 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Clinical, biochemical, enzymatic and molecular studies in 88 individuals. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7.

134. Cekin N, Akyurek ME, Pinarbasi E, Ozen F. MEFV mutations and their relation to major clinical symptoms of Familial Mediterranean Fever. *Gene*. 2017;626:9–13.

135. Gumus E. The Frequency of MEFV Gene Mutations and Genotypes in Sanliurfa Province, South-Eastern Region of Turkey, after the Syrian Civil War by Using Next Generation Sequencing and Report of a Novel Exon 4 Mutation (I423T). *J Clin Med*. 2018;7:105.

136. Timmann C, Muntau B, Kuhne K, Gelhaus A, Horstmann RD. Two novel mutations R653H and E230K in the Mediterranean fever gene associated with disease. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2001;479:235–9.

137. Kallinich T, Wittkowski H, Keitzer R, Roth J, Foell D. Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:677–82.

138. Brasil S, Rachard E, Finnigan A.J, Leal F, Merinero B, Banerjee R et al. Methylmalonic aciduria cblB type: characterization of two novel mutations and mitochondrial dysfunction studies. *Clin Genet*. 2015;87:576-81.

139. Adato A, Weil D, Kalinski H, Pel-Or Y, Ayadi H, Petit C, et al. Mutation profile of all 49 exons of the human myosin VIIA gene, and haplotype analysis, in usher 1B families from diverse origins. *J Hum Genet*. 1997;61:813–21.

140. Riazuddin S, Nazli S, Ahmed ZM, Yang Y, Zulfiqar F, Shaikh RS, et al. Mutation spectrum of MYO7A and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function. *Hum Mutat.* 2008;29:502–11.

141. Bonnet C, Riahi Z, Chantot-Bastaraud S, Smagghe L, Letexier M, Marcaillou C, et al. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur J Hum Genet.* 2016;24:1730–8.

142. Miné, Manuèle; Chen J, Desguerre I, Marchant D, Abitbol M, Ricquier D, Lonlay P De, et al. A Large Genomic Deletion in the PDHX Gene Caused by the Retrotranspositional Insertion of a Full-Length LINE-1 Element. *Hum Mutat.* 2006;0:1–6.

143. Savarese M, Di Fruscio G, Mutarelli M, Torella A, Magri F, Santorelli FM, et al. MotorPlex provides accurate variant detection across large muscle genes both in single myopathic patients and in pools of DNA samples. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2.

144. Kaminski WE, Klünemann HH, Ibach B, Aslanidis C, Klein HE, Schmitz G. Identification of novel mutations in the NPC1 gene in German patients with Niemann - Pick C disease. *J Inherit Metab Dis.* 2002;25:385–9.

145. Rodríguez-Quiroga SA lejandr., Cordoba M, González-Morón D, Medina N, Vega P, Dusefante CV azque., et al. Neurogenetics in Argentina: diagnostic yield in a personalized research based clinic. *Genet Res.* 2015;97:e10.

146. Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macias J, Vanier MT, et al. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: Genotype-phenotype correlations. *Clin Genet.* 2005;68:245–54.

147. Sun X, Marks DL, Park WD, Wheatley CL, Puri V, O'Brien JF, et al. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am J Hum Genet.* 2001;68:1361–72.

148. Fancello T, Dardis A, Rosano C, Tarugi P, Tappino B, Zampieri S, et al. Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann-Pick C Italian Patients: Identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics.* 2009;10:229–39.

149. Sheth JJ, Sheth FJ, Oza N. Niemann-Pick type C disease. *Indian Pediatr.* 2008;45:505–7.

150. Romanello M, Zampieri S, Bortolotti N, Deroma L, Sechi A, Fiumara A, et al. Comprehensive Evaluation of Plasma 7-Ketocholesterol and Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol in an Italian Cohort of Patients Affected by Niemann-Pick Disease due to NPC1 and SMPD1 Mutations. *Clin Chim Acta.* 2016;455:39–45.

151. Dvorakova L, Sikora J, Hrebicek M, Hulkova H, Bouckova M, Stolnaja L, et al. Subclinical course of adult visceral Niemann-Pick type C1 disease. A rare or underdiagnosed disorder? *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:591.

152. Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Estivill X, et al. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: Genotype-phenotype correlation. *Hum Genet.* 1999;105:468–73.

153. Hennermann JB, Vetter B, Wolf C, Windt E, Bührdel P, Seidel J, et al. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in eastern Germany: A characteristic molecular profile and 15 novel mutations. *Hum Mutat.* 2000;15:254–60.

154. Liang Y, Huang MZ, Cheng CY, Chao HK, Fwu VT, Chiang SH, et al. The mutation spectrum of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene and associated haplotypes reveal ethnic heterogeneity in the Taiwanese population. *J Hum Genet.* 2014;59:145–52.

155. Tao J, Li N, Jia H, Liu Z, Li X, Song J, et al. Correlation between genotype and the tetrahydrobiopterin-responsive phenotype in Chinese patients with phenylketonuria. *Pediatr Res.* 2015;78:691–9.

156. Liu N, Huang Q, Li Q, Zhao D, Li X, Cui L, et al. Spectrum of PAH gene variants among a population of Han Chinese patients with phenylketonuria from northern China. *BMC Med Genet. BMC Medical Genetics.* 2017;18:1–7.

157. Hoenicka J, Muro S, Pe C, Richard E, Desviat LR, Ugarte M. Human Propionyl-CoA Carboxylase b Subunit Gene : Exon-Intron Propionic Acidemia Patients. *Am J Hum Genet.* 1998;63:360–9.

158. Chloupkova M, Maclean KN, Alkhateeb A, Kraus JP. Propionic acidemia: Analysis of mutant propionyl-CoA carboxylase enzymes expressed in *Escherichia coli*. *Hum Mutat*. 2002;19:629–40.

159. Pérez B, Desviat LR, Rodríguez-Pombo P, Clavero S, Navarrete R, Perez-Cerdá C, et al. Propionic acidemia: Identification of twenty-four novel mutations in Europe and North America. *Mol Genet Metab*. 2003;78:59–67.

160. Xu Y, Guan L, Xiao X, Zhang J, Li S, Jiang H, et al. Mutation analysis in 129 genes associated with other forms of retinal dystrophy in 157 families with retinitis pigmentosa based on exome sequencing. *Mol Vis*. 2015;21:477–86.

161. Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, Kolbe DL, Nishimura CJ, Frees KL, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet*. 2016;135:441–50.

162. Perreault-Micale C, Frieden A, Kennedy CJ, Neitzel D, Sullivan J, Faulkner N, et al. Truncating variants in the majority of the cytoplasmic domain of *pcdh15* are unlikely to cause usher syndrome 1F. *J Mol Diagnostics*. 2014;16:673–8.

163. Bergmann C, Senderek J, Windelen E, Küpper F, Middeldorf I, Schneider F, et al.. Clinical consequences of *PKHD1* mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int*. 2005;67:829–48.

164. Schneider F, Dornia C, Bergmann C, Senderek J, Ku F, Kirfel J, et al. PKHD1 Mutations in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD). *Hum Mutat.* 2004;463:453–63.

165. Furu L, Onuchic LF, Gharavi ALI, Hou X, Esquivel EL, Nagasawa Y, et al. Milder Presentation of Recessive Polycystic Kidney Disease Requires Presence of Amino Acid Substitution Mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2014;2004–14.

166. Gunay-Aygun M, Font-montgomery E, Lukose L, Tuchman M, Graf J, Bryant JC, et al. Correlation of Kidney Function, Volume and Imaging Findings, and PKHD1 mutations in 73 patients with autosomal recessive polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;1–13.

167. Sharp AM, Messiaen LM, Page G, Antignac C, Gubler M, Onuchic LF, et al. Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in Key points. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2005;336–49.

168. Melchionda S, Palladino T, Castellana S, Giordano M, Benetti E, Bonis P De, et al. Expanding the mutation spectrum in 130 probands with ARPKD : identification of 62 novel PKHD1 mutations by sanger sequencing and MLPA analysis. *Nature Publishing Group.* 2016;61:811–21.

169. Al Teneiji A, Bruun TUJ, Sidky S, Cohn RD, Mendoza-londono R, Moharir M, et al. Phenotypic and genotypic spectrum of congenital disorders of glycosylation type I and type II. *Mol Genet Metab.* 2016.

170. Ávila-Fernández A, Cantalapiedra D, Aller E, Vallespín E, Aguirre-lambán J, Blanco-kelly F, et al. Mutation analysis of 272 Spanish families affected by autosomal recessive retinitis pigmentosa using a genotyping microarray. *Mol Vis.* 2010;25:50–8.

171. Consugar MB, Navarro-gomez D, Place EM, Kinga M, Sousa ME, Fonseca-kelly ZD, et al. Panel-based Genetic Diagnostic Testing for Inherited Eye Diseases is Highly Accurate and Reproducible and More Sensitive for Variant Detection Than Exome Sequencing. *Genet Med.* 2016;17:253–61.

172. Thompson DA, Janecke AR, Lange J, Feathers KL, Mchenry CL, Stockton DW, et al. Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11- cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3865–75.

173. Muschol N, Pohl S, Meyer A, Gal A, Ullrich K, Braulke T. Residual Activity and Proteasomal Degradation of p . Ser298Pro Sulfamidase Identified in Patients With a Mild Clinical Phenotype of Sanfilippo A Syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011;1634–9.

174. Mikaeloff Y, Froissart R, Caridade G, Caillaud C, Levade T, Chabrol B, et al. Incidence and Natural History of Mucopolysaccharidosis Type III in France and Comparison with United Kingdom and Greece. *Am J Med Genet A.* 2010;58–68.

175. Beesley C E, Young E P, Vellodi A, Winchester B G. Mutational analysis of Sanfilippo syndrome type A (MPS IIIA): identification of 13 novel mutations. *Genet AJM*. 1997;704–7.

176. Pera A, Villamar M, Viñuela A, Gandía M, Medà C, Moreno F, et al. A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet*. 2008;16:888–96.

177. Bademci G, Mahdieh N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, Menendez I, et al. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genet Med*. 2016;18:364–71.

178. Wolf ÑA, Frohne A, Allen M, Parzefall T, Koenighofer M, Schreiner MM, et al. A Novel Mutation in SLC26A4 Causes Nonsyndromic Autosomal Recessive Hearing Impairment. *Otol Neurotol*. 2016;173–9.

179. Simonaro CM, Desnick RJ, MCGovern MM, Wasserstein MP, Schuchman EH. The Demographics and Distribution of Type B Niemann-Pick Disease : Novel Mutations Lead to New Genotype / Phenotype Correlations. *Am J Hum Genet*. 2002;1413–9.

180. Manshadi MD, Kamalidehghan B, Keshavarzi F. Four Novel p.N385K , p.V36A, c.1033–1034insT and c.1417–1418delCT Mutations in the Sphingomyelin Phosphodiesterase 1 (SMPD1) Gene in Patients with Types A and B Niemann-Pick Disease (NPD). 2015;1:6668–76.

181. Gucev Z, Tasic V, Pop-jordanova N, Schuchmann EH. Two Siblings with Niemann-Pick Disease (NPD) Type B : Clinical Findings and Novel Mutations of the Acid Sphingomyelinase Gene. *Indian J Pediatr.* 2013;80:163–4.
182. Mei X, Xia O, Xia J, Verpy E, Lin L, Arti D, et al. Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. *Hum Genet.* 2002;26–30.
183. Haddad M, Guys JM, Reynaud R, Alessandrini P, Wagner K, Ste J, et al. Minor Hypospadias: The “Tip of the Iceberg” of the Partial Androgen Insensitivity Syndrome. *PLoS One.* 2013;8.
184. Akcay T, Fernandez-cancio M, Turan S, G T. AR and SRD5A2 gene mutations in a series of 51 Turkish 46, XY DSD children with a clinical diagnosis of androgen insensitivity. *Andrology.* 2014;2:572-8,
185. Strauss KA, Mazariegos G V, Sindhi R. Elective Liver Transplantation for the Treatment of Classical Maple Syrup Urine Disease. *Am J Transplant.* 2006;557–64.
186. Schiff M, Froissart R, Olsen RKJ, Acquaviva C, Vianey-saban C. Electron transfer X avoprotein de W ciencia: Functional and molecular aspects. *Mol Genet Metab.* 2006;88:153–8.
187. Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A : detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost.* 2007;1469–76.

188. Santacroce R, Acquila M, Belvini D, Castaldo G, Garagiola I, Giacomelli S.H, et al. Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in a group of 1, 410 unselected Italian patients with hemophilia A. *J Hum Genet.* 2008;275–84.

189. Fernández-López O, García-Lozano JR, Núñez-Vázquez R, Pérez-Garrido R, Núñez-Roldán A. The spectrum of mutations in southern spanish patients with hemophilia a and identification of 28 novel mutations. *Haemat.* 2005;90:707-10.

190. David D, Ventura C, Moreira I, Diniz MJ, Antunes M, Tavares A, et al. The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia a in 181 portuguese patients. *Haemat.* 2006;91:840-3.

191. http://www.factorix.org/advance_search_results.php?dosearch=1&codon=323

192. Okano Y, Asada M, Fujimoto A, Ohtake A, Murayama K, Hsiao KJ, et al. A genetic factor for age-related cataract: identification and characterization of a novel galactokinase variant, "osaka", in asians. *J Hum Genet.* 2001;68:1036–42.

193. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, Murray GJ, Quirk JM, Altarescu G, et al. Natural History of Fabry Renal Disease Influence of Galactosidase A Activity and Genetic Mutations on Clinical Course. *J Hum Genet.* 2002;81:122–38.

194. Boutron A, Acquaviva C, Vianey-saban C, Lonlay P De, Baulny HO De, Guffon N, et al. Comprehensive cDNA study and quantitative analysis of mutant HADHA and HADHB transcripts in a French cohort of 52 patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Mol Genet Metab.* 2011;103:341–8.

195. Shon YB, Ki CS, Kim CH, Ko AR, Yook YJ, Lee SJ, et al. Identification of 11 novel mutations in 49 Korean patients with mucopolysaccharidosis type II. *Clin Genet.* 2012;185–90.

196. Saini AG, Sankhyan N, Singhi P. SC. Chorea in Late-infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: an atypical presentation. *Pediatr Neurol.* 2016;60:75-8.

197. Wang J, Zhang VW, Feng Y, Tian X, Li F, Truong C, et al. Dependable and Efficient Clinical Utility of Target Capture- Based Deep Sequencing in Molecular Diagnosis of Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;55:6213-23.

198. Riera M, Navarro R, Ruiz-nogales S, Méndez P, Burés-jelstrup A, Corcóstegui B, et al. Whole exome sequencing using Ion Proton system enables reliable genetic diagnosis of inherited retinal dystrophies. *Nat Publ Gr.* 2017;1–13.

199. Xu Y, Guan L, Shen T, Zhang J, Xiao X, Jiang H. Mutations of 60 known causative genes in 157 families with retinitis pigmentosa based on exome sequencing. *Hum Genet.* 2014;1255–71.

200. Sun T, Xu K, Ren Y, Xie Y, Zhang X, Tian L, et al. Comprehensive Molecular Screening in Chinese Usher Syndrome Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:1229-37.

201. Wang F, Wang H, Tuan H, Nguyen DH, Sun V, Keser V, et al. Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements. *Hum Genet.* 2015;133:331–45.

202. Carss KJ, Arno G, Erwood M, Stephens J, Sanchis-juan A, Hull S, et al. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *J Hum Genet.* 2017;75–90.

203. Appelt S, Heinrich V, Krawitz PM, Schiska D, Kru U, Parkhomchuk D, et al. Screening for single nucleotide variants , small indels and exon deletions with a next-generation sequencing based gene panel approach for Usher syndrome. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;393–401.

204. Lenassi E, Vincent A, Li Z, Saihan Z, Coffey AJ, Steele-stallard HB, et al. A detailed clinical and molecular survey of subjects with nonsyndromic USH2A retinopathy reveals an allelic hierarchy of disease-causing variants. *Eur J Hum Genet.* 2015;1318–27.

205. García-García G, Aller E, Jaijo T, Aparisi MJ, Larrieu L, Faugère V, et al. Novel deletions involving the USH2A gene in patients with Usher syndrome and retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2014;106:1398–410.

206. Ge Z, Bowles K, Goetz K, Scholl HPN, Wang F, Wang X, et al. NGS-based Molecular diagnosis of 105 eyeGENE ® probands with Retinitis Pigmentosa. Nat Publ Gr. 2015;1–9.

207. Sun W, Huang L, Xu Y, Xiao X, Li S, Jia X, et al. Exome Sequencing on 298 Probands With Early-Onset High Myopia: Approximately One-Fourth Show Potential Pathogenic Mutations in RetNet Genes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56:8365-72.

