



## EL DIAGNOSTICO GENETICO EMBRIONARIO PREVIO A SU IMPLANTACION:

### INTRODUCCION

*La probabilidad de transmitir alteraciones genéticas a la descendencia ha sido uno de los mayores problemas al momento de decidir la búsqueda de un embarazo.*

*En los últimos años, este riesgo ha disminuido mediante la evaluación de la historia familiar, la edad de la madre, y los estudios genéticos prenatales (post-implantación) tales como la biopsia de vellosidad corial a las 9 semanas de gestación o la amniocentesis entre las 14 y 16 semanas de gestación.*

*En el momento actual (y desde hace años) es posible además obtener información genética del embrión antes de su implantación en el útero.*

*Esta última técnica es la que se conoce con el nombre de diagnostico Genético de Pre-implantación (PGD) el cual se ha ido desarrollando y perfeccionando .*

*Recientemente, la evolución de esta tecnología ha permitido la incorporación del tamizaje o screening genético de Preimplantación (PGS). Dicha estrategia tiene como objetivo la identificación de aneuploidías (alteraciones numéricas ) de los cromosomas más frecuentemente involucrados en abortos tempranos y se aplica tanto en parejas con abortos recurrentes como en aquellas que presentan fallas repetidas de implantación en procedimientos de FIV-ICSI (Fertilización In Vitro-Inyección Intracitoplasmática de Esperma).*

*El diagnostico genético de preimplantación (PGD), determina una alternativa de diagnostico del embrión previo a su implantación. (Esta claro entonces que es requisito para poder realizarlo, realizar un tratamiento de reproducción de alta complejidad –FIV)*

*El PGD nos permite la selección y transferencia de embriones sanos del punto de vista genético-cromosómico.*

*El PGD permite la combinación de los avances de dos disciplinas la reproducción asistida y la genética humana, permitiendo la evaluación del embrión antes de su transferencia al útero de la paciente.*

*Queda claro entonces que el PGD es la opción de diagnostico mas temprano para parejas con alto riesgo de descendencia con anomalías genéticas-cromosómicas. De todas formas el PGD puede realizarse en parejas que no tienen el riesgo aumentado para obtener embriones con anomalías, pero desean saber el status*

*genético de los embriones antes de su transferencia (obtenidos por fertilización in vitro)*

*Podemos afirmar entonces que el PGD es un procedimiento multidisciplinario, donde intervienen diferentes especialistas: ginecólogo especializado en reproducción asistida, biólogos especializados en reproducción humana y con la experiencia adecuada para realizar biopsias embrionarias, genetistas y biólogos moleculares.*

## **HISTORIA**

*Revisando la historia: Edwards y Gardner fueron los primeros que (1968) realizaron las primeras biopsias embrionarias en embriones de conejo.*

*En 1980 comienza a desarrollarse el PGD como alternativa del diagnóstico prenatal en el Reino Unido.*

*Ya en 1984 la OMS habla del PDG como una valiosa alternativa al diagnóstico prenatal.*

*Se reporta al 1990 al primer nacimiento tras un PGD obtenido por Handyside con sexado de embriones por PCR.*

*En nuestro país los primeros diagnósticos genéticos a través de biopsias embrionarias (embriones de evolución día 3), fueron desarrollados hace aproximadamente 7 años, en el Centro Iberoamericano de Reproducción Asistida (CIRA - actualmente Clínica Suizo Americana).*

*Fueron responsables de estos diagnósticos el Dr. Roberto Suárez y el Biólogo especialista en reproducción humana Dr. Ariel Ahumada.*

*Estos primeros diagnósticos eran para analizar alteraciones numéricas en algunos cromosomas que representan la mayor frecuencia de patologías cromosómicas genéticas en la raza humana. En estos casos el diagnóstico genético de las muestras embrionarias (FISH) fue realizado por los Dres Quadrelli y Vaglio.*

*En Junio del 2011 pudimos realizar el diagnóstico de una enfermedad monogénica (diagnóstico de la alteración de un único gen que genera enfermedad) en este caso una enfermedad de Duchene (distrofia muscular), de esta forma se obtuvo un recién nacido masculino, libre de enfermedad de Duchene, patología que mataba a la gran mayoría de los varones de la familia. Fueron los primeros diagnósticos de una enfermedad monogénica en América Latina.*

*Luego en nuestra clínica (Clínica Suizo Americana) seguimos desarrollando la técnica y realizamos por el término de 2 años aproximadamente, el diagnóstico por arrays, técnica que permitía un screening de todos los embriones obtenidos por una paciente en un procedimiento de FIV, y analizaba el ADN completo del embrión, mediante comparación del ADN del mismo con un ADN típico. Todo tipo de alteración se interpretaba a través de un software específico que permitía determinar alteraciones en la estructura de los cromosomas y del número.*

*Llegamos de esta forma a la actualidad, donde desarrollamos el PGD para pacientes que presentan una enfermedad monogénica y el PGS un sistema de screening para determinar alteraciones genéticas-cromosómicas numéricas o de pérdidas o ganancias, que influyen francamente en la implantación embrionaria y en las tasas de embarazo.*

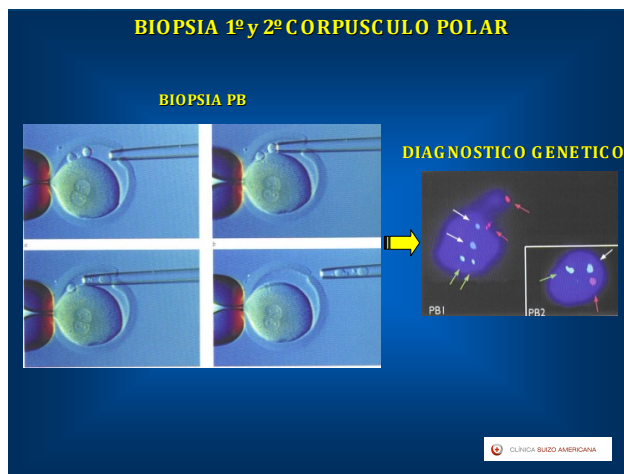
## BIOPSIA EMBRIONARIA



*El período de desarrollo preimplantacional abarca desde la fecundación del ovocito hasta la formación del blastocisto ( embrión preimplantacional). Luego de la fecundación y, cuando el embrión contiene entre 8 – 10 células (día tercero de desarrollo post-fecundación) , se biopsia entre 1 a 2 células (blastómeras) del embrión. Estas células son las empleadas para el estudio genético. Ya que solamente los embriones no afectados son transferidos al útero materno para su*

*implantación, con esto es posible evitar abortos, espontáneos o inducidos, secundarios a defectos genéticos. En ciertas situaciones, en que la alteración genética es solamente de la madre, es posible realizar el estudio en un cuerpo polar del ovocito antes de la fecundación.*

- **Biopsia de cuerpo polar (CP):** *La biopsia del CP es de utilidad solamente en el caso de aberraciones cromosómicas femeninas. El ovocito adulto produce 2 células pequeñas llamadas cuerpos polares. Una de estas células puede ser biopsiada y estudiada para obtener información del ovocito. El análisis de los cuerpos polares da información de la madre solamente y, las alteraciones cromosómicas que pudieran ocurrir luego de la fertilización no son detectadas.*



- **Biopsia de la blastómera :** *La biopsia de la blastómera se lleva a cabo utilizando un microscopio de micromanipulación que permite la extracción de una sola blastómera del embrión en desarrollo. Se realiza generalmente entre las 62-64 horas luego de la inseminación, en el estadio de 8 células, antes del momento en que comienza la compactación. En este estadio de desarrollo las células son totipotenciales y no se han compactado.*

*Antes de extraer la blastómera de un embrión de 8 células, se incuba el embrión en un medio libre de calcio y magnesio durante aproximadamente 20 minutos con el propósito de reducir la adherencia entre las blastómeras. El embrión se fija mediante una pipeta y se labra un ojal en la zona pelúcida mediante una microaguja de vidrio o mediante laser. Una vez seleccionada la blastómera a biopsiar se coloca una pipeta de aspiración a través de la brecha , se aspira la célula en forma delicada y suave y, se libera en el medio. La célula seleccionada debe mostrar un núcleo bien visible. El embrión, que tiene ahora 7 células en lugar de 8, es colocado nuevamente en la incubadora en el medio de cultivo apropiado. La blastómera se procesa para PCR o FISH dependiendo del estudio solicitado.*

*Para PCR, la célula es colocada en un tubo de microcentrífuga con solución buffer de PCR que permite realizar la reacción de replicación y amplificación del ADN.*

*Para FISH, las células obtenidas se colocan en un portaobjeto y se tratan con solución hipotónica (6mg/ml BSA, 1% citrato de sodio en agua HPLC) bajo estricto control en un microscopio de luz invertido, hasta disolver el citoplasma (aproximadamente 2 a 3 min). Una vez obtenido el núcleo desnudo, y antes que se seque por completo, se fija con solución de metanol/ácido acético (solución 3/1) y se marca el área con un lápiz diamante para facilitar la localización posterior.*

*La biopsia de la blastómera tiene la ventaja de dar información de origen materno, paterno y aquellos que se originan luego de la fertilización. Aún cuando la masa del embrión queda reducida luego de la biopsia, no se han comunicado alteraciones en la viabilidad del mismo.*

*Se ha demostrado que a remoción de 1 ó 2 células en este estadio no afecta el desarrollo preimplantación.*

*La remoción de la blastómera es un procedimiento técnicamente preciso y requiere una extrema experiencia como para obtener una célula intacta con el mínimo trauma para el embrión en desarrollo.*



### **Biopsia de trofoectodermo**

*Cuando el embrión llega a día 5 del desarrollo embrionario tiene un aspecto redondo y hueco con una masa en su interior, es lo que denominamos **blastocisto**. En este estadio se diferencia la masa celular interna, que es la que dará lugar al embrión, la cavidad interna, que se denomina blastocele, y la capa externa de células llamada trofoblasto o trofoectodermo.*

*Esta capa celular externa es la que dará lugar a las estructuras extraembrionarias que se encargarán de nutrir y dar soporte al embrión, entre otras la placenta.*

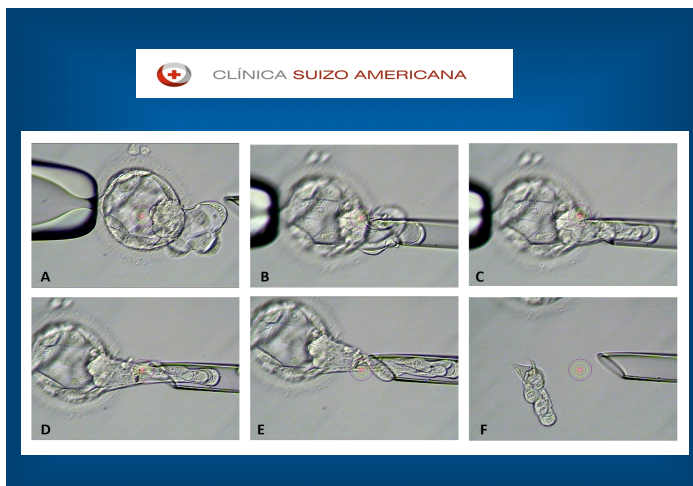
*Tiene el mismo material genético que la masa celular a partir de la que se originará al embrión, por lo que unas pocas células de esta capa para analizarlas. Con un mínimo de 4-5 células se puede garantizar un diagnóstico fiable.*

*Estas células que se extraen deben estar suficientemente alejadas de las células que darán lugar al embrión, la de la masa celular interna, para evitar posibles daños.*

Para poder extraer las células es necesario hacer un pequeño orificio en la zona pelúcida, cubierta que se encontraba rodeando al óvulo y ahora rodea al blastocisto. Esto debe hacerse mediante **pulsos cortos con un láser**.

Una vez hecho un orificio de tamaño suficiente como para que quepa la pipeta de biopsia, ya se pueden extraer las células por aspiración. Para separar las células los pulsos de láser pueden ayudar

Esta técnica se puede ver facilitada, realizando una incisión en la membrana pelúcida del embrión en día 4 de evolución, dejar evolucionar a día 5 (blastocisto) en esta etapa comenzara a eclosionar el trofoectodermo a traves de esta zona debil , esto puede hacer mucho mas sencillo entonces obtener un grupo de celulas con pulsos de laser, ya que naturalmente comienza salida de trofoectodermo.



## INDICACIONES

*El PGD está indicado cuando los embriones pueden estar afectados por algún tipo de alteración genética. Son candidatos para PGD:*

- *Parejas en quienes por lo menos uno de sus miembros tiene historia familiar de enfermedad genética hereditaria, es portador de esa enfermedad o la padece.*
- *Mujeres mayores de 35 años.*
- *Mujeres con historia de abortos recurrentes que puedan haber sido causados por alteraciones cromosómicas de cualquiera de los 2 miembros de la pareja.*
- *Parejas en la que uno de sus miembros tiene una translocación cromosómica que pudiera causar defectos en la implantación, abortos recurrentes, o malformaciones severas en el producto.*
- *Mujeres con historial de abortadoras.*
- *Fallas reiteradas de implantación*
- *Factores masculinos severos del tipo azoospermicos no obstructivos*

*Porcentualmente en un programa de FIV, el 10% de las pacientes, se beneficiaria de un PGD, sin embargo el numero actual, es aproximadamente un 4% . Los ultimos cinco años el PGD tiene un crecimiento anual de 1%.*

*Una de las indicaciones principales para realizar un PGD es la edad de la paciente, el número de aneuploidias o alteraciones cromosómicas de los embriones obtenidos de las pacientes es proporcional a la edad de la misma, cuanto mayor edad mayor cantidad de embriones con alteraciones genéticas cromosómicas, entre los 35 a 39 años, la cantidad de embriones con alteraciones que pueden obtenerse es entre un 20 a 30%, en pacientes de 40 años o más, la mitad de sus embriones pueden estar afectados.*

*Las aneuploidies (alteraciones numericas en mas o en menos de los cromosomas) pueden ser de los autosomas o de los cromosomas sexuales.*

*El PGD puede realizarse en dos tipos de pacientes:*

***-parejas de alto riesgo para PGD:*** *debido a sus antecedentes genéticos diagnosticados tienen grandes chances de tener embriones afectados.*

***-parejas de bajo riesgo:*** *no tienen antecedentes genéticos, pero tienen causas que justifican realizar un pgd: pérdidas repetidas de embarazos, fallas de implantación recurrentes, pacientes mayores de 37 años.*

*Que enfermedades pueden diagnosticarse:*

- ***anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidias)***
- ***enfermedades monogénicas (afectación de un solo gen)***

**Anomalías numéricas:** Constituyen las alteraciones genéticas más frecuentes de la población en general. Su incidencia se incrementa con el aumento de la edad materna. Las más frecuentes son: Síndrome de Down (Trisomía del cromosoma 21), Síndrome de Edwards (Trisomía del cromosoma 18), Síndrome de Patau (Trisomía del cromosoma 13). Pueden evaluarse también aneuploidías tales como: trisomía del cromosoma 15, trisomía del cromosoma 16, trisomía del cromosoma 22, y de los cromosomas X e Y.

**Anomalías estructurales:** Intercambio recíproco entre cromosomas (translocaciones), muy frecuentes en las parejas con abortos recurrentes; pérdida de material de un cromosoma (deleciones); ganancia de material de un cromosoma (duplicaciones o inserciones), inversión de un fragmento cromosómico (inversión).

### **Desordenes de genes unicos (enfermedades monogenicas)**

Fibrosis Quística  
Enfermedad de Tay-Sachs  
Hemofilia A y B  
Retinitis Pigmentosa  
Thalasemia  
Síndrome del X Frágil  
Distrofia Miotónica  
Anemia de Falconi  
Acondroplasia  
Tipificación Genotípica de HLA

### **Enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales:**

El PGD está indicado para determinar el sexo de un embrión en aquellas situaciones en que la transmisión de la enfermedad está ligada a los cromosomas sexuales. Entre las enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales de transmisión recesiva se encuentran: hemofilia, síndrome del X frágil y la mayoría de las distrofias musculares (se conocen más de 900 distrofias musculares).

### **Estudio genético**

#### **Reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

La PCR es utilizada para el diagnóstico de defectos monogénicos incluyendo alteraciones de herencia dominante y recesiva. La PCR es una técnica por la cual una secuencia particular de ADN es copiada varias veces con el propósito de facilitar su análisis. Mediante la PCR es posible multiplicar una molécula de ADN en millones de moléculas.

La PCR es una forma relativamente rápida y conveniente para analizar el ADN. El método ha sido utilizado para el diagnóstico preimplantación siguiendo distintos protocolos. El procedimiento requiere una cantidad suficiente de muestra de ADN de alta calidad y pureza que muchas veces es difícil de obtener a partir de una sola célula.



Por otra parte es muy importante tomar las medidas necesarias para evitar la contaminación de ADN o la amplificación preferencial de alelos (allele dropout).

Solamente una célula debe ser amplificada. Si otra célula o fragmentos de ADN son incorporados al tubo de reacción, éstos también serán amplificados. Con el propósito de minimizar este inconveniente se debe usar la técnica de ICSI. De este modo no hay exceso de semen (contaminación paterna) ni presencia de células del cumulus folicular (contaminación maternal). El laboratorio debe estar rigurosamente controlado y el personal debidamente entrenado para evitar la incorporación de contaminantes al material en estudio. La muestra se procesa en forma simultánea con un control positivo, un control negativo y una serie de marcadores polimórficos para identificar ADN exógeno.

Cada mutación o enfermedad necesita un análisis de PCR especialmente diseñado para cada caso. Este factor hace que el procedimiento sea muy costoso.

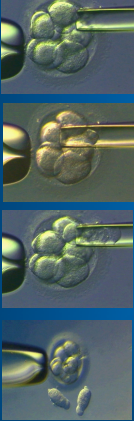
### Hibridación in situ fluorescente (FISH)

El FISH se usa para la determinación de sexo en las enfermedades ligadas al X, y la detección de anomalías cromosómicas. La muestra se deshidrata y se trata con la/s sonda/s de ADN específicamente. Una sonda es la secuencia de ADN específica, complementaria a la secuencia de ADN a ser analizado. La sonda y la muestra se desnaturalizan en forma simultánea a 75°C durante 5 minutos. Se incuba a 37°C de 3 a 16 horas, se lava en solución salina con detergente no iónico a 72°C y se monta con DAPI. La muestra se observa con un microscopio de epifluorescencia y los resultados se documentan mediante fotografías. El número de señales fluorescentes se corresponden con el número de copias de la región cromosómica estudiada. En cada núcleo se observan normalmente dos señales fluorescentes para cada cromosoma (a excepción de los cromosomas sexuales para los varones). Las señales fluorescentes aparecen como señales simples y únicas.

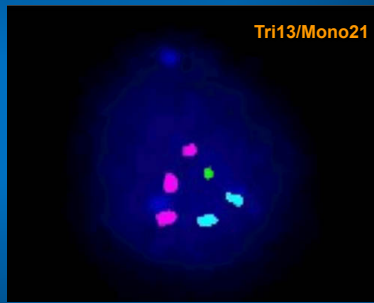


BIOPSIA DEL EMBRION (PGD)

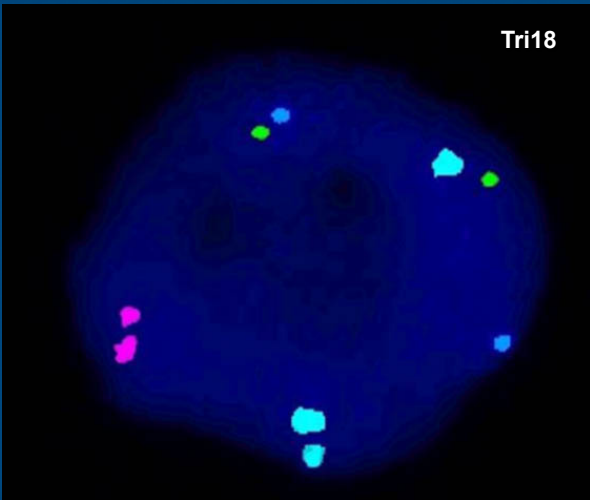
BIOPSIA

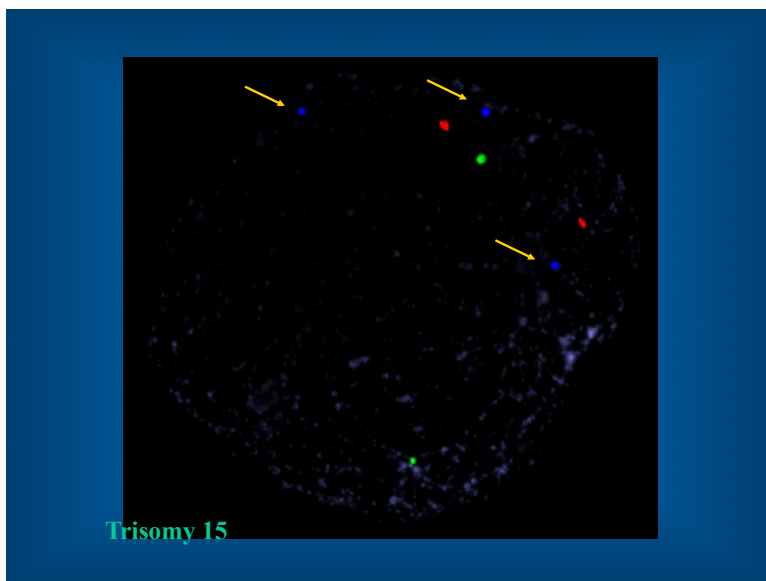
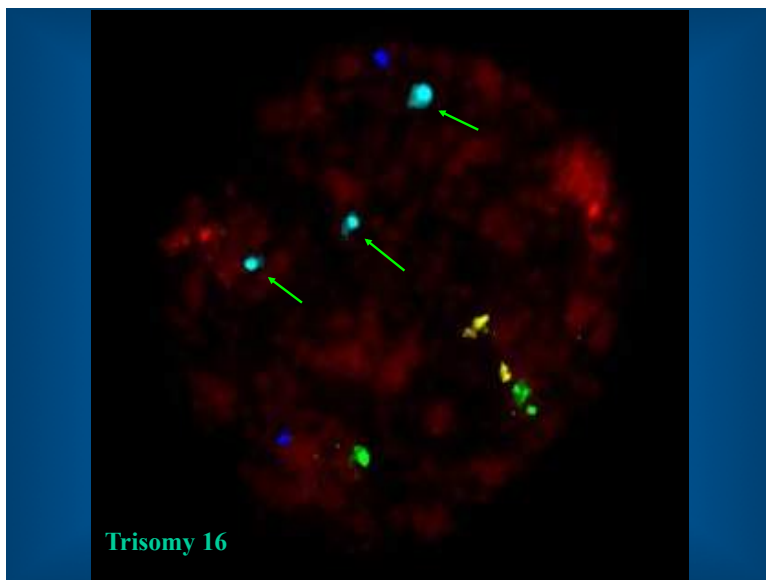
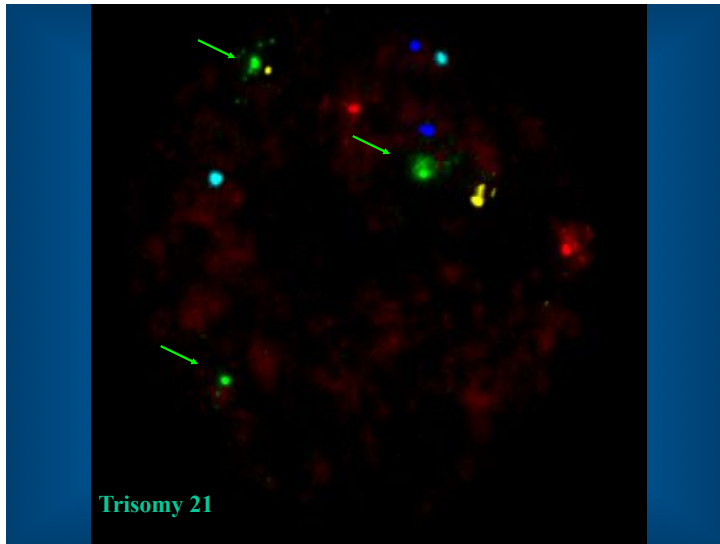


FISH



Tri18





## **Aspectos generales del PGS:**

*El Screening Genético Preimplantacional es un estudio que permite evaluar la dotación cromosómica del embrión previo a su implantación, detectando posibles aneuploidías (alteraciones en el número de copias de los cromosomas).*

*El PGS hace un análisis exhaustivo de los 23 pares de cromosomas (autosomas y de los cromosomas sexuales)*

*El PGS permite transferir a la paciente embriones libres de aneuploidias (alteraciones numericas de los cromosomas) que explican la gran mayoría de las fallas de implantación o de abortos espontaneos.*

*Hoy el PGS se realiza por secuenciación masiva, es una técnica sumamente eficaz para el análisis de copias en células individuales. Mediante esta técnica se llega a una precisión del 99% en el diagnóstico.*

*Por todo esto el PGS es una técnica que aumenta la tasa de implantación, disminuye la tasa de aborto espontáneo y por lo tanto aumenta la tasa de recién nacidos, por técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.*

## **Para que realizar el estudio:**

*Porque la elección de embriones euploides ( $2n=46$ ), aumenta la probabilidad de implantación y mejora drásticamente las tasas de éxito en FIV. Los embriones exentos de aneuploidías tienen mayor probabilidad de resultar en un embarazo que llegue a término y con un bebé sano.*

- *Aumenta considerablemente la tasa de éxito de la implantación*
- *Disminuye la tasa de aborto*
- *Reduce riesgo de cromosomopatías*

*Porque disminuye también las tasas de aborto, ya que muchas de las trisomías analizadas no son compatibles con la vida, por lo tanto en algún momento de la evolución del embarazo, se va a producir un aborto.*

*Porque hacer PGS mejora las opciones reproductivas de parejas con baja fertilidad.*

## **Cuando realizamos este estudio:**

*Los siguientes son criterios independientes, o sea, con que se cumpla uno de ellos ya sería recomendado realizar el estudio de PGS.*

- *Madre > 35 años*
- *Fallos repetidos en la implantación*
- *Reiteración de abortos*
- *Infertilidad masculina severa*

## **CONSIDERACIONES FINALES, CRITICAS Y DESAFIOS FUTUROS.**

- *Los pacientes fértiles deben realizar FIV para obtener embriones apropiados.*
- *El éxito del procedimiento depende del número de embriones de buena calidad.*
- *Aún cuando la FIV y el procedimiento de **PGD** hallan sido satisfactorios, el embarazo no está garantizado luego de la transferencia, como así tampoco un parto a término.*
- *La remoción de una sola célula sin romperla o sin causar daño es un procedimiento técnico dificultoso y se requiere de una manualidad experimentada.*
- *La metodología de diagnóstico para una nueva enfermedad es un proceso costoso que requiere de mucho tiempo de dedicación.*
- *El análisis de una sola célula tiene sus limitaciones y, se debe considerar la posibilidad de mosaicismos (embrión con más de una composición cromosómica). Por este motivo, se debe indicar y complementar el estudio mediante un diagnóstico prenatal y confirmar la condición del feto.*
- *El número de embriones normales para ser transferidos es generalmente escaso ya que gran parte de los embriones son anormales.*
- *No todos los cromosomas o alteraciones genéticas pueden ser diagnosticadas por **PGD** ya que solamente un número limitado de cromosomas puede ser examinado en un mismo procedimiento.*
- *Se estima que el 0,1% de los embriones puede resultar dañado durante el procedimiento.*
- *Generalmente sólo es posible realizar un estudio específico por célula biopsiada. Una célula no puede ser analizada para diversas condiciones genéticas.*

**Dr. Roberto Suárez Serra**  
**Especialista en Reproducción Humana Asistida**  
**Director de Clínica Suizo Americana**



**CLÍNICA SUIZO AMERICANA**