

## El diagnóstico genético preimplantacional permite seleccionar embriones sanos e incrementar la tasa de gestación

*Preimplantational genetic diagnosis allows to select the healthy embryos and increase pregnancy rates*

M<sup>a</sup>. Graña Barcia<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> J. Iglesias Fungueiro<sup>1</sup>, M. Pallas Seijas<sup>1</sup>, J L. Liz Lestón<sup>2</sup>, J L. Doval Conde<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>ZYGOS, Centro Gallego de Reproducción. <sup>2</sup>Hospital N<sup>o</sup> S<sup>a</sup> Esperanza. Santiago de Compostela. <sup>3</sup>Complejo Hospitalario Universitario de Ourense

### **Resumen:**

*Objetivo: Analizar retrospectivamente los resultados obtenidos en los ciclos de FIV/ICSI con Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) realizados en ZYGOS durante el año 2005. Material y Métodos: Se estudiaron un total 226 preembriones procedentes de 21 ciclos realizados en 15 parejas con diferentes patologías: Grupo A: Abortos de repetición o fallos de implantación; Grupo B: Anomalías cromosómicas estructurales; Grupo C: Portadoras de enfermedades monogénicas. Las variables a estudio fueron: n<sup>o</sup> de embriones obtenidos, n<sup>o</sup> de embriones que alcanzaron el día +3, porcentaje de embriones sanos/afectados y tasa de implantación por transferencia. Resultados: Se obtuvieron un total de 226 preembriones, de los que 191 (84.5%) alcanzaron el día +3 del desarrollo y 186 fueron biopsiados. Tan solo 49 (26.34%) eran sanos para el estudio realizado mientras que el 137 (73.66%) presentaban alteraciones genéticas. La tasa total de implantación por transferencia fue del 35%. Conclusiones: El DGP es una técnica que permite testar genéticamente los embriones antes de ser transferidos al útero materno y seleccionar aquellos que están libres de la enfermedad a estudio. El número tan elevado de embriones que siendo genéticamente anormales alcanzan el día + 3, con morfología aparentemente normal y que hubieran sido transferidos de no realizarse el DGP, debe hacer reflexionar sobre la posibilidad de estar transfiriendo embriones con anomalías cromosómicas en aquellas parejas que por no presentar patología que lo justifique, no se realiza el DGP y, en consecuencia, considerar la importancia de que este estudio se realice de forma sistemática en las técnicas de FIV o FIV/ICSI*

**Palabras clave:** Diagnóstico Genético Preimplantacional. DGP. Enfermedades hereditarias. Aborto recurrente.

---

**Correspondencia:** Dra. María Graña Barcia  
Profesora Titular de Obstetricia y Ginecología  
Universidad de Santiago  
Directora de ZYGOS Centro Gallego de Reproducción  
Hospital N<sup>o</sup> S<sup>a</sup> de la Esperanza  
Avda de las Burgas, n<sup>o</sup> 2  
15705 Santiago de Compostela (A CORUÑA)  
e-mail: mariagranabarcia@zygos.es

### **Summary:**

*Objectives: Retrospective analysis of the results obtained in IVF/ICSI cycles with Preimplantational Genetic Diagnosis (PGD) performed in ZYGOS during 2005. Materials y Methods: A total of 226 embryos from 21 cycles performed in 15 couples with different pathologies, were studied by PGD: Group A: Recurrent spontaneous abortion or implantation failure; Group B: Structural chromosomal anomalies; Group C: Carriers of monogenic disease. The study variables were: number of embryos obtained, number of embryos that reached day 3, percent of normal/abnormal embryos and implantation rate per transfer. Results: A total of 226 embryos were obtained of which 191 (84.5%) reached day 3 and 186 were biopsied. Only 49 (26.34%) were normal while 137 (73.66%) had genetic anomalies. Implantation rate per transfer was 35%. Conclusions: PGD is a technique that allows to genetically test embryos before they are transferred to the uterus and select those embryos that are devoid of the genetic abnormality studied. The relatively high number of genetically abnormal embryos that reached day 3, with apparent normal morphology, that would have been transferred if PGD were not performed, should make us reflect over the possibility of transferring genetically abnormal embryos in those couples that because they do not present a specific indication, do not undergo PGD and, as a result, the importance of performing PGD in a systematic way in IVF or IVF/ICSI, should be considered.*

**Key words:** Preimplantational genetic diagnosis. PGD. Inherited diseases. Recurrent spontaneous abortion.

## **INTRODUCCIÓN**

Se estima que más del 65% de las gestaciones no evolutivas durante el primer trimestre, se deben a alteraciones cromosómicas del embrión, por lo que el aborto espontáneo debe considerarse como un mecanismo natural de selección de la especie. Pero la naturaleza no siempre es capaz de impedir la evolución de estos embarazos, dando lugar al nacimiento de niños con anomalías cromosómicas o genéticas, responsables de alteraciones morfológicas, estructurales o funcionales que, pudiendo ser compatibles con la vida, tendrán repercusión sobre su salud en diferentes etapas dependiendo de la naturaleza y del número de genes implicados como sucede en la fibrosis quística, epidermolisis ampollosa, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Werdnig Hoffmann, síndrome de Down, retinosis pigmentaria y otras.

Por esta razón, personas con historia familiar de enfermedad monogénica/poligénica tienen un riesgo "elevado" de transmitir esta condición a sus descendientes.

La esterilidad o infertilidad de causa genética que se manifiesta clínicamente por fallos de implantación o abortos recurrentes, suele ser secundaria a anomalías cromosómicas por alteración en la meiosis de los gametos. Un ejemplo de estas aberraciones se produce cuando uno de los progenitores es portador de una alteración equilibrada (inversión, translocación), en la que, pese a mantener completa su información genética, muestran una distribución anormal de ese mate-

rial, pudiendo ser la causa de una meiosis anormal. Cuando la mutación génica altera la unión de los cromosomas en la profase de la primera división meiótica, se origina un bloqueo madurativo o gametos anormales, generando embriones con alteraciones que frecuentemente finalizarán en abortos o fallos en la implantación (1, 2).

Las cromosopatías por alteraciones estructurales equilibradas que afectan a cromosomas homólogos, pueden ocasionar abortos o niños vivos con alteraciones cromosómicas, mientras que en las translocaciones equilibradas entre cromosomas no homólogos, existe la posibilidad de que nazcan niños sanos o portadores de la alteración.

La evidencia muestra que después de dos o más abortos, con productos genéticamente anormales, las probabilidades de tener un embarazo a término con el nacimiento de un hijo sano, son escasas, lo que puede indicar la existencia de una causa recurrente en alguno de los miembros de la pareja, pero si las alteraciones son diferentes en distintos abortos, haría sospechar un problema de no disyunción en alguno de los miembros de la pareja (3).

En parejas con problemas de esterilidad que no presentan anomalías en su material genético, más de un 60% de los embriones obtenidos en el laboratorio de FIV son anormales, lo que puede explicar la pérdida precoz de embarazos o el porcentaje tan bajo de fertilidad en estas mujeres.

Hasta hace poco tiempo, estas parejas tenían como opciones reproductivas la gestación espontánea con

estudio prenatal mediante amniocentesis o biopsia corial y, en caso de afectación fetal, optar por el aborto terapéutico o bien realizar tratamientos de FIV con gametos donados (4).

El desarrollo de la técnica de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) a finales de los años 80, permite testar genéticamente los embriones antes de ser transferidos al útero, y surge como una alternativa al diagnóstico prenatal y evitar recurrir al aborto terapéutico, permite además conocer otras causas de "dificultad para concebir".

El DGP ofrece la posibilidad de diagnosticar anomalías cromosómicas numéricas o estructurales, enfermedades monogénicas o ligadas a cromosomas sexuales y seleccionar embriones con dotación genética normal o libres de la enfermedad a estudio y permite identificar embriones histocompatibles con terceros, seleccionando aquellos que presentan un genotipo HLA (aplotipo) compatible.

Para realizar el DGP es necesario recurrir a ciclos de FIV y, en el caso de enfermedades monogénicas ha de procederse a FIV con microinyección espermática (ICSI) (5). Aunque la obtención del material embrionario se puede realizar en diferentes estadios de desarrollo, frecuentemente se biopsian en el día +3 posfecundación, cuando el embrión posee 5-10 células, lo que permite la extracción de una o dos blastómeras (6, 7). En esta situación, la información que se obtiene es directa del embrión. Otra modalidad consiste en biopsiar embriones en estadio de blastocisto (día +5 de desarrollo) extrayendo una pequeña porción del trofoectodermo o masa celular interna. No existen evidencias de que la biopsia embrionaria tenga un afecto negativo sobre el embrión y su implantación ya que está formado por células totipotenciales (8)

El DGP no excluye la realización del diagnóstico prenatal, pues aunque ofrece una alta fiabilidad diagnóstica (falsos negativos < 1.5% debidos a la propia técnica o mosaicismos del embrión), se aconseja realizar amniocentesis o biopsia corial (9, 10).

La experiencia de 500 ciclos de DGP para estudio de translocaciones mostró una reducción de al menos cinco veces la tasa de abortos espontáneos, en estas parejas comparados con ciclos anteriores sin DGP (11).

## OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue analizar retrospectivamente los resultados de los ciclos de FIV con DGP realizados en nuestro Centro durante el año 2005.

Se estudiaron las siguientes variables: número de preembriones obtenidos, nº de embriones que se desarrollaron hasta el día +3, porcentaje de embriones sanos y afectados, tasa de implantación por transferencia.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Material

Se analizaron 226 preembriones procedentes de 21 ciclos de FIV-ICSI con DGP realizados en 15 parejas que se distribuyeron en tres grupos por patologías. La edad media de la mujer era de 32.5 años con un rango 26-42.

#### **Grupo A: Parejas con abortos de repetición o fallos de implantación**

Se realizaron 9 ciclos a 7 parejas de las que se obtuvieron un total de 90 preembriones y a los que se realizó estudio de aneuploidías (X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22).

#### **Grupo B: Parejas con anomalías cromosómicas estructurales (translocaciones equilibradas)**

Se estudiaron 89 preembriones obtenidos tras 8 ciclos realizado en 5 parejas con translocaciones equilibradas.

46XY t (11,22)(q23,q11) 46XX der(13,14)(q10,q10)  
46XX t (2,21)(q35,q22) 46XX t(5,8)(q13,q24)  
46XX t (2,7)(q31,q13)

#### **Grupo C: Parejas con enfermedades monogénicas (distrofia miotónica y fibrosis quística, neurofibromatosis Tipo I)**

Se estudiaron un total de 47 preembriones obtenidos en 4 ciclos realizados en 3 parejas.

### Métodos

Se realizó la estimulación ovárica según protocolo estándar mediante análogos agonistas de GnRH y gonadotropinas recombinantes. El "pico de LH" se indujo con 10.000 UI de hCG. Tras la aspiración folicular transvaginal ecoguiada, bajo anestesia-sedación, se procedió a la fecundación. En el día +3 de desarrollo, se realizó la biopsia embrionaria mediante una solución de ácido Tyrodes y a la extracción de una o dos blastómeras para el estudio del material genético nuclear, mediante una micropipeta de aspiración. El material embrionario obtenido se procesó dependiendo del estudio a realizar:

En casos de aneuploidías y anomalías estructurales se realizó estudio FISH: una vez extraída la blastómera se procedió a su lavado con solución hipotónica.

ca (1% citrato sódico + 6% de Albúmina Sérica Bovina o BSA) y fijación sobre un portaobjetos de vidrio con solución de ácido Acético:Metanol (Carnoy) según método de Tarkowski.

En enfermedades monogénicas se realizó la técnica de PCR: Se procedió al lavado de las células biopsiadas en tres gotas sucesivas de 10 µl de Tampón Fosfato Salino (PBS) sin BSA y posteriormente fueron depositadas en un tubo tipo "eppendorf". La última gota de lavado se colocó en otro eppendorf como blanco de la PCR. Ambos tubos fueron congelados con nitrógeno líquido hasta su procesado.

Durante el proceso de análisis, los embriones permanecieron en el incubador con marcación inequívoca, con la finalidad de transferir los sanos.

Tras la transferencia embrionaria la fase lútea se mantuvo con Progesterona micronizada.

## RESULTADOS

En 21 ciclos realizados a 15 parejas se obtuvieron 226 preembriones. De ellos 191 (84.5%) alcanzaron el día +3 de desarrollo. Se biopsiaron 186 de los que 49 (26.34%) eran sanos para el estudio realizado y 137 (73.66%) anormales. La tasa total de implantación por transferencia fue de 35% (Figura 1)

Analizando según patologías:

**Grupo A:** Se obtuvieron un total de 90 preembriones de los que el 77.77% alcanzaron el día +3. El 37.14% presentaban dotación genética normal mientras que el 62.86% eran cromosómicamente anormales (Figura 2). En una pareja no se obtuvieron em-

briones sanos y, en las 6 restantes, se realizaron un total de 8 transferencias de 17 embriones consiguiéndose 3 gestaciones (tasa de implantación / transferencia: 37.5%) (Figura 3)

**Grupo B:** Se obtuvieron 89 preembriones de los que el 86.52% alcanzaron el día +3. El estudio genético identificó el 16.88% de preembriones libres de la translocación a estudio mientras que el 83.12% eran portadores (Figura 2). Se realizaron 8 transferencias de 12 embriones, consiguiéndose 2 embarazos (tasa de implantación / transferencia: 25%) (Figura 3)

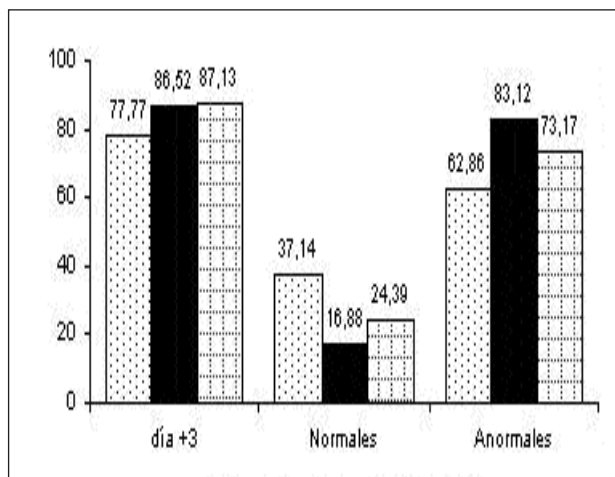


Figura 2

Porcentaje de embriones que alcanzaron el día +3 y % de embriones cuyo estudio genético resultó normal y anormal en las diferentes patologías

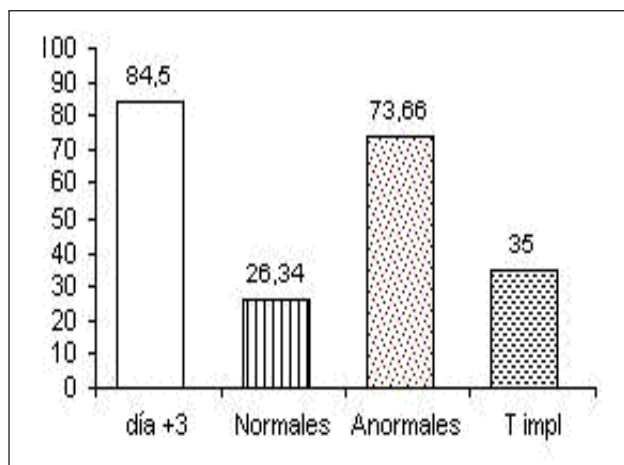


Figura 1

Porcentaje de embriones que alcanzaron el día +3 y % de embriones normales, anormales y tasa de gestación por transferencia en la población de estudio

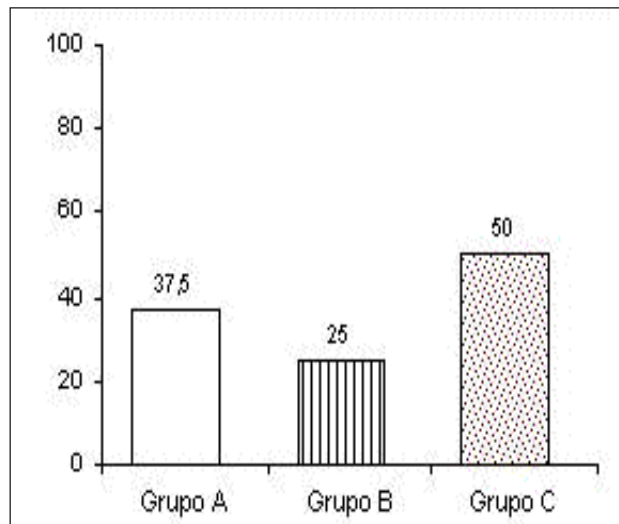


Figura 3

Tasa de embarazo / transferencia (%) por patologías.

**Grupo C:** De los 47 preembriones obtenidos, el 87.23% alcanzaron el día +3, de ellos el DGP identificó al 24.39% libres de enfermedad y el 73.17% tenían afectado el gen a estudio (Figura 2). Un embrión (2.44%) no pudo ser analizado por no lograrse amplificación específica del alelo. Se realizaron 4 transferencias de 9 embriones y se consiguieron 2 gestaciones (tasa de implantación / transferencia: 50%) (Figura 3)

## COMENTARIOS

Las técnicas de reproducción asistida experimentaron un notable desarrollo al incorporar la medicina genética mediante las técnicas del DGP y que representan una gran esperanza para interrumpir la transmisión de enfermedades hereditarias, aunque no pueda evitarse la aparición “de novo”. Paralelamente a estos avances surge un nuevo concepto de “paternidad responsable” pues, al utilizar la información que ofrecen las nuevas tecnologías, se pueden garantizar mejores condiciones de salud a los futuros hijos respetando la libertad y el deseo de todo progenitor de que sus hijos sean sanos (12)

Destaca el número de 226 preembriones que se obtuvieron, haciendo la consideración de la edad media de las mujeres (32.5 años) y la existencia de patologías relacionadas muchas de ellas con dificultades para fecundar. La tasa de implantación por transferencia del 35%, parece indicar un adecuado manejo en las diferentes fases del proceso como la inducción de la ovulación, biopsia, análisis de los embriones y transferencia uterina, si bien es preciso hacer mención a que algunas de las gestaciones del Grupo A han finalizado en aborto, posiblemente porque se trataba de embriones con anomalías en los cromosomas no analizados.

La supervivencia hasta día +3 fue del 84.5% a pesar de que el 74.03% eran embriones cromosómicamente anormales, lo que indica que realizan su división celular siguiendo las normas naturales en su proceso de división mitótica y que las anomalías genéticas están más directamente relacionadas con la viabilidad que con el proceso biológico de la división, por lo que de no haberse realizado el estudio genético se habrían transferido al presentar buena morfología embrionaria (parámetro por el que se seleccionan los embriones para su transferencia).

Este hecho obliga a reflexionar sobre la validez del criterio morfológico como un buen indicador de embrión óptimo publicado por muchos autores (13). En nuestra opinión, es necesario buscar otros paráme-

tros de valoración que aporten información para seleccionar los embriones viables, coincidiendo con otros autores (14).

Destaca el porcentaje tan elevado de embriones, en parejas del grupo B, que presentaban translocación (83.21%). En aquellas con cariotipo normal y que presentaban fallos de implantación o abortos de repetición, el 62.86% de embriones eran portadores de algún tipo de anomalía cromosómica. En este grupo la tasa en implantación por transferencia fue del 37.50%, si bien algunas de las gestaciones finalizaron en aborto del primer trimestre como se esperaba, toda vez que el DGP solamente permite analizar un número determinado de pares de cromosomas y no la totalidad.

En conjunto, la tasa de implantación por transferencia ofrece un porcentaje de elevado (35%), teniendo en cuenta que muchos de los preembriones transferidos no provienen de un grado de desarrollo embrionario óptimo.

## CONCLUSIONES

El DGP es un buen método para testar genéticamente embriones y está especialmente indicado en parejas portadoras de enfermedades hereditarias, abortos recurrentes, pacientes con cariotipo alterado, edad materna superior a 35 años o fallos repetidos para concebir, después de varios tratamientos de fertilidad.

El elevado porcentaje de embriones afectados en estas pacientes, indica una alta incidencia de anomalías en los embriones de parejas que consultan por las patologías citadas. Dado el número importante de embriones, de aspecto “morfológicamente normal” el día de la transferencia embrionaria (+2 ó +3) que son cromosómicamente anormales sería aconsejable que el empleo del DGP quedase establecido como estudio sistemático en los tratamientos de FIV y evitar la transferencia de embriones portadores de alteraciones detectables (11, 15).

Este análisis permite realizar una selección “fiable” de los embriones sanos y además disminuye la angustia durante la gestación, reduce las interrupciones voluntarias de embarazo y aumenta la tasa de nacimientos de niños sanos e interrumpe la transmisión de dolencias hereditarias a generaciones posteriores (16, 17). Además aumenta las posibilidades de embarazo evolutivo en mujeres con abortos recurrentes y reduce el estrés psicológico de la pareja ante la posibilidad de un aborto terapéutico (9, 18).

Podemos concluir que un número importante de

embriones de los ciclos de fertilización in vitro sin DGP, que son transferidos al útero con aparente buena calidad, son portadores de alteraciones cromosómicas, pudiendo finalizar la gestación en aborto o dar lugar a la gestación de un niño genéticamente o cromosómicamente afectado.

Este estudio aunque encarece el coste del ciclo, minimiza el riesgo de transferir un embrión predestinado genéticamente a la no implantación, al aborto o a tener que realizar una interrupción voluntaria del embarazo.

## RECONOCIMIENTOS

Nos gustaría agradecer al Dr. Juan G. Alvarez por la revisión crítica y traducción al inglés de este manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

1. **McFadden DE, Friedman JM.:** Chromosome abnormalities in human beings. *Mutat. Res.* 1997; 396 (1-2): 129-40
2. **Handyside AH and Delhanty JD.:** Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *Trends. Genet.* 1997; 13 (7): 270-5.
3. **Egozcue J, García M.:** Esterilidad e infertilidad de origen genético. Consejo reproductivo. En: "Esterilidad y Esterilidad Humanas" Vanrell JA, Calaf J, Balash J, Viscasillas P Masson-Salvat, Barcelona 1992, pp 415-427.
4. **Ogilvie CM, Braude PR, Scriven PN.:** Preimplantation Genetic Diagnosis-An overview. *J. Histochem. Cytochem.* 2005; 53 (3): 255-60
5. **Pickering S, Polidoropoulos N, Caller J, Scriven P, Ogilvie CM, Braude P.:** Strategies and outcome of the first 100 cycles of preimplantation genetic diagnosis at the Guy's and St. Thomas' Center. *Fertil. Steril.* 2003; 79 (1): 81-90
6. **Delhanty JD and Harper JC.:** Pre-implantation genetic diagnosis. *Baillieres Best Pract. Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000; 14 (4): 691-708.
7. **De Vos A and Van Steirteghem A.:** Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 2001; 21 (9): 767-80
8. **Hardy K, Martín KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH.:** Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum. Reprod.* 1990; 5 (6): 708-14.
9. **Gianaroli L, Magli MC and Ferraretti AP.:** The in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 183 Suppl 1: S13-8
10. **Munné S, Márquez C, Magli C, Morton P and Morrison L.:** Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol. Hum. Reprod.* 1998; 4 (9): 863-70.
11. **Munné S.:** Preimplantation genetic diagnosis and human implantation: a review. *Placenta.* 2003; 24 (Suppl B): S70-6.
12. **Abellan F.:** Aspectos básicos del diagnóstico genético preimplantacional. *Rev. Iberoamericana de Fertilidad.* 2006; 23 (2): 123-131.
13. **Wells D, Bermúdez MG, Steuerwald N, Malter HE, Thornhill AR.:** Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. *Fertil. Steril.* 2005; 84 (2): 343-55.
14. **Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J.:** Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 1993; 8 (12): 2185-91.
15. **Fridström M, Ährlund-Richter L, Iwarsson E, Malmgren H, Inzunza J, Rosenlund B, Sjoblom P, Nordenskjöld M, Blennon E, Hovatta O.:** Clinical outcome of treatment cycles using preimplantation genetic diagnosis for structural chromosomal abnormalities. *Prenat. Diagn.* 2001; 21 (9): 781-7
16. **Liu J, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I.:** Efficiency and accuracy of polymerase-chain-reaction assay for cystic fibrosis allele delta F508 in single cel. *Lancet* 1992; 339 (8803): 1190-2.
17. **Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RML, Hughes MR.:** Birth of a normal girl after in vitro fertilisation and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 327 (13): 905-9.
18. **Munné S.:** Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod. BioMed. Online* 2002; 4 (2): 183-96.