

Actualidad del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) en el laboratorio de FIV

News of the preimplantational genetic diagnosis (DGP) in the IVF laboratory

Carmen Ochoa Marieta, Sara Lucas Toca
CER Santander

RESUMEN

La actualidad del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se encuentra íntimamente ligada a la evolución de la genética molecular, cuyo desarrollo nos ha permitido realizar diagnósticos, cada vez más precisos, en el embrión humano.

Son varios los puntos en los que existen controversias. Por un lado no existe consenso sobre el día en el que debemos realizar la biopsia embrionaria. El estudio genético debe realizarse mediante la utilización de una técnica que estudie la totalidad de la dotación cromosómica del embrión (aCGH, NGS..). También existe duda sobre cuál es el último estadio embrionario en el que se pueden producir errores mitóticos y añadimos el pensamiento relativo a que lo que estudiamos, tanto biopsiando en día +3 como en día +5/6 tal vez no constituya finalmente el embrión, luego no sea suficientemente representativo del mismo. Entendemos que el SGP es un procedimiento más de selección embrionaria, al igual que la morfología, la morfocinética y el crecimiento a blastocisto. La combinación de los tres puede aumentar la posibilidad de éxito en aquellas situaciones en las que hay un número suficiente de embriones, pero pensamos que hay que demostrar su verdadera eficiencia con estudios más amplios.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2019; 36; 6-10 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras Clave: *DGP; Diagnóstico genético preimplantacional; Blastocisto; FISH; PCR; Tubing; blastocentesis; biopsia.*

Aceptado: Enero de 2019
Correspondencia: Carmen Ochoa Marieta
CER. Santander
www.cersantander.com
SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

SUMMARY

The relevance of preimplantation genetic diagnosis (PGD) is closely linked to the evolution of molecular genetics, whose development has allowed us to make diagnoses, more and more precise, in the human embryo. There are several points where there are controversies. On the one hand there is no consensus on the day in which we must perform the embryo biopsy. The genetic study must be carried out by using a technique that studies the entire chromosomal envelope of the embryo (aCGH, NGS ...). There is also doubt about which is the last embryonic stage in which mitotic errors can occur and we add the thought that what we study, both biopsy on day +3 and day +5/6 may not be the embryo finally, then it is not sufficiently representative of it. We understand that the SGP is a procedure for embryo selection, as well as morphology, morphokinetics and blastocyst growth. The combination of the three can increase the possibility of success in those situations in which there is a sufficient number of embryos, but we think that its true efficiency must be demonstrated with broader studies.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2019; 36; 6-10 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: PGD; Preimplantation genetic diagnosis; Blastocyst; FISH; PCR; Tubing; blastocentesis; biopsy.

INTRODUCCIÓN

La actualidad del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se encuentra íntimamente ligada a la evolución de la genética molecular, cuyo desarrollo nos ha permitido realizar diagnósticos, cada vez más precisos, en el embrión humano.

Las técnicas que ha utilizado la genética molecular para el diagnóstico del embrión humano en el DGP, son:

- FISH (Hibridación fluorescente in situ)(1969). Utiliza sondas fluorescentes. Analiza 5,7 o 9 cromosomas a la vez. Eficiencia y precisión limitadas y resultados poco homogéneos.
- SECUENCIACIÓN COMPLETA GENOMA HUMANO (2003)→Consecuencia del desarrollo de técnicas como la PCR y la bio informática
- ARRAY de CGH (aCGH)→El ADN problema se amplifica, corta y se hibrida sobre arrays de ADN control. Permite estudiar los 46 cromosomas. Presenta resultados homogéneos. Técnica más utilizada hasta la aparición de las técnicas de secuenciación masiva.
- NGS (Next Generation Sequencing)→permite analizar 25 millones de bases, en 4 horas, con un 99 % de precisión.
- Tecnología Illumina. Reduce el coste en la secuenciación, genotipado y expresión génica. Ej.: la secuenciación del genoma humano pasó de 1 x 10⁶ dólares en 2007 a 4000 dólares en 2013.

DIAGNOSTICO GENETICO PREIMPLANTACIONAL

La realización de un diagnóstico genético preimplantacional incluye los siguientes pasos:

- 1-Procedimiento para obtener la muestra: Biopsia ó blastocentesis
- 2-Aislamiento de la muestra: Tubing o fijación
- 3-Estudio genético de la muestra: FISH o PCR (amplificación del ADN)

1-Procedimiento para obtener la muestra.

La muestra puede obtenerse a través de biopsia o blastocentesis

1a-Biopsia. La biopsia ovocitaria u embrionaria supone la disección de la zona pelúcida. Esta puede realizarse mediante diferentes técnicas (mecánica, química o laser) y en diferentes estadios de desarrollo.

La biopsia en día 0 o +1 se utiliza para el análisis del 1º o 2º corpúsculo polar. La disección de la zona pelúcida puede ser mecánica o con la ayuda de un laser y se utilizará en la búsqueda de patologías de origen materno.

La biopsia en estadio de células se realiza en día +3. La disección de la zona pelúcida puede realizarse de manera mecánica, química o mediante laser y se utilizará para la búsqueda de patologías de origen materno, paterno y post fecundación.

La biopsia en estadio de blastocisto se realiza en día +5 o +6. La disección de la zona

pelúcida se realizará mediante laser y se utilizará para la búsqueda de patologías de origen materno, paterno y post fecundación.

Las diferencias entre la realización de la biopsia embrionaria en día +3 (células) o en día +5/+6 (trofoectodermo), pueden verse en la tabla 1.

TABLA 1

Diferencias entre la biopsia en día +3 vs día +5/+6

DÍA +3

- Una sola célula → Menos ADN
- Hatching mecánico, químico o laser
- No necesidad de vitrificación de los embriones
- Tecnología sanitaria compleja
- Resultados falsos positivos (reorganización cromosómica)

- No posibilidad de diagnosticar los mosaicismos
- Análisis genético mas costoso (>embriones biopsados)
- Posibilidad de diagnostico de los mosaicismos
- Análisis genético mas económico (<embriones biopsados)
- Necesidad de laser para el hatching
- Necesidad de vitrificación de los embriones
- Tecnología sanitaria compleja
- Resultados falsos positivos (reorganización cromosómica)

DÍA +5/+6

- Mas células → Más ADN

1b-Blastocentesis. Tiene por objeto la obtención del ADN existente en el líquido del blastocele. Se realiza en día +5 atravesando la zona pelúcida y el trofoectodermo con una pipeta muy fina. Se aspira el contenido del blastocele, con lo que se producirá el colapso del blastocisto. Es una técnica poco reproducible que aporta poca cantidad de ADN.

2-Aislamiento de la muestra

La muestra puede ser aislada por medio de tubing o con fijación.

2a-Tubing. Tiene por objeto el aislamiento de la muestra para su posterior estudio genético. Para ello se realizan lavados sucesivos en condiciones de esterilidad.

2b-Fijación. Supone la liberación del núcleo celular para su posterior marcaje con sondas fluorescentes. Implica la lisis celular y subsiguiente fijación del núcleo sobre un porta. Es una técnica difícil y de resultados poco homogéneos.

3. Estudio genético de las muestras

Las técnicas que con mas frecuencia se han utilizado en el DGP son la FISH y las técnicas de PCR

3a-FISH. En el diagnostico mediante Fish se utilizan sondas fluorescentes, las cuales pueden ser centroméricas, locus especificas, teloméricas ó de painting.

Habitualmente esta técnica se realiza en muestras procedentes de embriones en día +3, o en ovocitos y zigotos. En este ultimo caso el núcleo debe de estar en estadio de metafase, mientras que en el embrión de día +3 el núcleo puede estar en cualquier estadio

3b-PCR. La realización de una PCR supone la lisis celular, con el objetivo de obtener el ADN. Este que general-

mente se encuentra en una cantidad pequeña en el núcleo de la célula deberá ser amplificado. La amplificación puede realizarse mediante técnica de MDA ó SUREPLEX. Ambos procedimientos son muy fiables y son idóneos para la realización de PCR multiplex, aCGH y NGS.

Los siguientes pasos incluyen, la confirmación de la amplificación, secuenciación y análisis bioinformático.

Las técnicas de PCR utilizadas en el DGP son: La CGH (comparative genome hibridazion), los microarrays entre los que tenemos los SNP'S y los ACGH-BAC's, la qPCR y los NGS (next generation sequencing), esta última, secuencia millones de fragmentos de ADN a un precio muy económico. Es mas eficiente que la aCGH y aporta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99,98%

INDICACIONES CLÍNICAS DEL DGP

Podremos indicar un DGP en las siguientes situaciones:

Enfermedades monogénicas con mutación conocida o no

DGP con la determinación de Antígenos de histocompatibilidad

DGP para mutaciones que predisponen a cáncer (Precisan autorización de la CNRHA)

DGP para anomalías cromosómicas y estructurales

Toda indicación de diagnostico genético preimplantacional debe ir acompañada de una consulta de asesoramiento genético reproductivo. Esta tendrá por objeto la valoración de la historia clínica personal y familiar, valoración de los do-

cumentos aportados por la pareja, evaluación de los riesgos de transmisión, discusión sobre la estrategia, explicación de la indicación y necesidad de tratamiento reproductivo, y/o de estudio de informatividad previo, así como la posible necesidad de solicitar autorización a la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA).

El estudio de informatividad tiene por objeto analizar, en el ADN de los familiares, la segregación del cromosoma(s) portadores de la mutación causante de la enfermedad. Necesita el informe genético previo con la mutación localizada y aporta el diseño de los marcadores polimórficos necesarios para realizar el DGP.

VALOR DEL DIAGNOSTICO GENÉTICO PREIM-PLANTACIONAL

El primer nacimiento que se produjo tras el uso de una técnica de reproducción asistida asociada al DGP, ocurrió en 1990.

Desde entonces y hasta nuestros días más de 10 519 niños han nacido en el continente europeo, según datos de la Eshre (2013)(1)

Pero la pregunta que todos nos planteamos es saber si verdaderamente el DGP aumenta la posibilidad de tener un niño sano.

Es evidente que el DGP para enfermedades monogénicas aumenta la posibilidad de que nazca un niño libre de la enfermedad investigada.

Luego por ende, el screening genético preimplantacional (SGP) indicado en la búsqueda de aneuploidias de origen materno, paterno ó post fecundación, también aumentaría la posibilidad de tener un niño sano, respecto a la posibilidad de enfermedad derivada de la existencia de aneuploidias.

La búsqueda de los embriones euploides dentro de una población embrionaria supone la aplicación de una técnica cuya eficiencia debe de ser estudiada en profundidad.

Con el objetivo de conocer que aporta el SGP a la posibilidad de recién nacido vivo, nos planteamos dos preguntas :

PREGUNTA PRINCIPAL: ¿El uso del SGP en Técnicas de reproducción asistida mejora la probabilidad de recién nacido sano?

PREGUNTA SECUNDARIA: ¿Qué técnica de biopsia deberíamos utilizar para optimizar el resultado?

Para dar respuesta a las preguntas formuladas establecimos los siguientes criterios:

- Fuentes de información: Base de datos: PubMed

Revistas nucleares de la especialidad: Human Reproduction

- Periodo de búsqueda: 2012-2017
- Criterios de búsqueda: Cleavage stage biopsy; healthy term baby; PGD; PGS; PGD-A
- Restricción de la búsqueda: Publicaciones en Francés, Inglés y español
- Criterios de selección de los estudios: Revisiones sistemáticas y estudios randomizados

Aplicando los términos de búsqueda obtuvimos 2124 publicaciones, de ellas 79 fueron revisiones sistemáticas y 20 de ellas eran estudios randomizados.

De la lectura de los 79 títulos extractamos 48 publicaciones y tras la lectura de los resúmenes nos quedamos con 10, cuya lectura completa se sintetizó, finalmente, en 8 publicaciones.

RESPUESTA A LA PREGUNTA PRINCIPAL

¿El uso del SGP en TRA aumenta la posibilidad de RN vivo?

Las conclusiones extractadas de las publicaciones consultadas (2-4) han sido valoradas en función del riesgo obstétrico y perinatal tras la aplicación de la técnica, en comparación con la no aplicación de la misma, y concluyen diciendo que el SGP en TRA realizadas en mujeres de buen pronóstico supone un ventajoso criterio de selección embrionaria, disminuye el riesgo de gestación múltiple y no aumenta los riesgos obstétricos y perinatales, con lo que podemos decir que aumenta la posibilidad de RN vivo.

Pero faltan estudios que demuestren si este efecto se produce o no, en mujeres de mal

pronóstico (edad materna avanzada, baja reserva ovárica...), dado que todos los trabajos consultados se referían a mujeres de buen pronóstico.

RESPUESTA A LA PREGUNTA SECUNDARIA

¿Qué técnica de biopsia deberíamos utilizar para optimizar el resultado?

Los trabajos consultados no responden a la pregunta formulada. No obstante, las opiniones expresadas por los autores son las siguientes:

- Algunos autores consideran que la biopsia en día +3 disminuye el éxito del proceso. Los detractores de esta afirmación comentan que esto solo ocurre cuando el estudio genético se realiza mediante Fish, dado que esta técnica supone un estudio parcial del estatus de euploidia del embrión, considerando que el éxito del proceso está más relacionado con el tipo de estudio genético que con el día de la biopsia.

- Otros encuentran similares resultados realizando la biopsia en día + 3 o en día +5/6 e incluso en día 0, +3 y +5/6
- Para algunos autores el SGP, independientemente del día en el que se realice la biopsia, no constituye una técnica suficientemente representativa sobre la opción de descartar un embrión, dado que no sabemos si el blastocisto es el último estadio evolutivo en el que puedan producirse errores mitóticos.
- Todos los trabajos analizados se refirieron al uso del SGP en mujeres de buen pronóstico, no sabemos que ocurre en otros grupos de pacientes.
- Todos los autores coinciden en la necesidad de ampliar los estudios y considerar que estamos ante un proceso experimental

CONCLUSIONES

De las opiniones de los autores consultados se desprende la no existencia de consenso sobre el día en el que debemos realizar la biopsia embrionaria.

Coincidimos en que el estudio genético debe realizarse mediante la utilización de una técnica que estudie la totalidad de la dotación cromosómica del embrión (aCGH, NGS..)

Compartimos la duda sobre cual es el último estadio embrionario en el que se pueden producir errores mitóticos y añadimos el pensamiento relativo a que lo que estudiamos, tanto biopsiando en día +3 como en día +5/6 tal vez no constituya finalmente el embrión, luego no sea suficientemente representativo del mismo.

Y por supuesto pensamos que debemos ampliar los estudios para saber si esta técnica aporta beneficios a mujeres con patologías ó edad avanzada.

Entendemos que el SGP es un procedimiento mas de selec-

ción embrionaria, al igual que la morfología, la morfocinética y el crecimiento a blastocisto. La combinación de los tres puede aumentar la posibilidad de éxito en aquellas situaciones en las que hay un numero suficiente de embriones, pero pensamos que hay que demostrar su verdadera eficiencia con estudios mas amplios.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. de Ryalle, V. Goossens et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIV-XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Human Reproduction*, vol.32, Issue 10, 1 October 2017, p.1974-1994
2. Hasson J, Limoni D, et al. Obstetric and neonatal outcomes of pregnancies conceived after preimplantation genetic diagnosis: cohort study and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2017 Aug;35(2):208-218. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.05.003. Epub 2017 May 18.
3. Chen M, Wei S, et al. Can Comprehensive Chromosome Screening Technology Improve IVF/ICSI Outcomes? A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Oct 15;10(10):e0140779. doi: 10.1371/journal.pone.0140779. eCollection 2015.
4. Dahdouh EM, Balayla J, et al. Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015 Dec;104(6):1503-12. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.038. Epub 2015 Sep 16.
5. Dahdouh EM, Balayla J, et al. Impact of blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. *Reprod Biomed Online*. 2015 Mar;30(3):281-9. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.11.015. Epub 2014 Dec 11.
6. Cimadomo D, Capalbo A, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7193075. doi: 10.1155/2016/7193075. Epub 2016 Jan 28.
7. Danilo Cimadomo, Antonio Capalbo et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 7193075. Published online 2016 Jan 28. doi: 10.1155/2016/7193075
8. Gleicher N, Kushnir VA, et al Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Mar 15;12:22. doi: 10.1186/1477-7827-12-22.