

# El diagnóstico genético preimplantacional y sus nuevas indicaciones en reproducción asistida

C. Rubio<sup>a</sup>, L. Rodrigo<sup>a</sup>, A. Mercader<sup>a</sup>, E. Mateu<sup>a</sup>, C. Simón<sup>a,b</sup>, J. Remohí<sup>a,b</sup> y A. Pellicer<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Valencia. <sup>b</sup>Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Universidad de Valencia. Valencia.

<sup>c</sup>Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia. España.

## INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se presenta como una forma muy precoz de diagnóstico que, apoyándose en las nuevas técnicas de reproducción asistida, hace posible el estudio genético en los embriones antes de ser transferidos al útero y, por tanto, antes de que se haya producido la implantación.

El DGP se ha desarrollado gracias a los avances en las técnicas de reproducción asistida y la aplicación de las técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el estudio de anomalías génicas y cromosómicas en una única célula (blastómero). De este modo, en un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV) se obtienen varios embriones, en los cuales se analizan 1 o 2 blastómeros obtenidos mediante biopsia, lo que permite la transferencia de los embriones caracterizados como sanos o cromosómicamente normales.

La idea de un análisis genético preimplantacional no es reciente. Ya en 1968, Edwards y Gardner<sup>1</sup> pudieron determinar el sexo en células del trofoectodermo de blastocistos de conejo, basándose en la observación de la cromatina sexual. Sin embargo, los primeros intentos de DGP en embriones humanos tuvieron que esperar al desarrollo de la técnica de PCR a principios de los años ochenta. Los primeros casos de embarazos fueron publicados en 1990. Se trataba de parejas con enfermedades de herencia ligada a los cromosomas sexuales, y la identificación del sexo embrionario se realizó mediante la amplificación de una secuencia de ADN específica del cromosoma Y<sup>2</sup>. En la actualidad, la PCR se aplica en el DGP para enfermedades monogénicas<sup>3</sup>.

Posteriormente, se introdujo la técnica de FISH para la identificación de los cromosomas sexuales en

la determinación del sexo embrionario<sup>4,5</sup>. Actualmente, esta técnica se utiliza además para el estudio de anomalías estructurales<sup>6</sup> y de las aneuploidías más frecuentes<sup>7</sup>.

Desde que en 1990 se publicaron los primeros casos de niños nacidos tras DGP, la European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE), a través de su consorcio de DGP, ha recopilado los resultados y la evolución de más de 2.000 ciclos realizados en 37 centros que han dado lugar a 279 recién nacidos<sup>8</sup>. Estos datos confirman que el DGP se puede presentar en la actualidad como un tratamiento eficaz, con unas posibilidades de embarazo similares a las que ofrece un ciclo de FIV convencional.

Las indicaciones actuales del DGP de anomalías cromosómicas mediante FISH coinciden en parte con los casos en que es posible realizar un diagnóstico genético prenatal. Por otro lado, y de forma creciente, los laboratorios de FIV están incorporando estas técnicas con objeto de mejorar los resultados en grupos concretos de pacientes, como en el caso de un fallo repetido de implantación y el aborto recurrente de causa desconocida.

## METODOLOGÍA

### Biopsia embrionaria y fijación de blastómeros

La biopsia embrionaria se realiza en el tercer día de desarrollo *in vitro*, cuando los embriones tienen entre 6 y 8 células. La extracción de un número de células correspondiente a la cuarta parte de la masa embrionaria en este estadio no tiene implicaciones significativas en el desarrollo embrionario hasta blastocisto, ni en sus patrones metabólicos<sup>9</sup>. Los blastómeros extraídos son procesados para el estudio genético (FISH) y

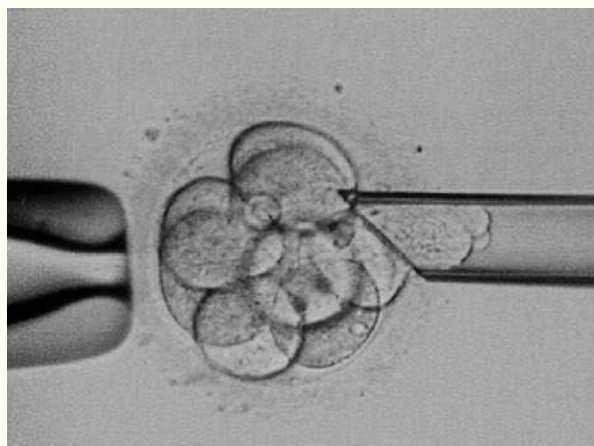


Fig. 1. Biopsia embrionaria.

los embriones se mantienen en cultivo hasta que se obtienen los resultados. Por ello, se comprende que las técnicas utilizadas para el análisis genético deben permitir un diagnóstico muy rápido, compatible con el período máximo de cultivo *in vitro* de embriones.

Los blastómeros se extraen mediante el método de aspiración, después de realizar un orificio en la zona pelúcida con una solución ácida o mediante láser. Se extraen 1 o 2 blastómeros, en los que se haya podido distinguir un núcleo interfásico único en su interior (fig. 1). La técnica de FISH requiere que el núcleo se extienda en un portaobjetos previamente desengrasado, con la precaución de eliminar por completo los restos de citoplasma que pueden quedar alrededor y conservar la integridad y la morfología del núcleo.

### Hibridación *in situ* fluorescente

Esta técnica utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen a secuencias cromosómicas específicas. De este modo, es posible enumerar las copias de un determinado cromosoma presentes en el núcleo de una célula.

Las sondas utilizadas en nuestros trabajos han sido de 2 tipos:

- Secuencias centroméricas (sondas CEP) y secuencias de ADN satélite (150-300 pb) altamente repetitivas: cromosomas 16, 18, X e Y.
- Secuencias específicas de *locus* (sondas LSI) de copia única (200-400 kb) o con un número reducido de copias, específicas de genes o *loci* génicos: cromosomas 13, 21 y 22.

Básicamente, la técnica consta de las siguientes fases:

- La desnaturalización de la doble cadena de ADN de la muestra biológica y de las sondas de ADN. Las extensiones y las sondas fluorescentes se pueden desnaturalizar por separado o bien de forma conjunta (codesnaturalización). En el primer caso, para desnaturalizar las muestras, se colocan los portaobjetos en una cubeta con una solución de formamida al 70% a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 5 min, y las sondas se desnaturalizan también durante 5 min en un eppendorf sumergido en un baño termostatzado a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ . En la codesnaturalización, la mezcla de sondas se coloca directamente sobre el área de hibridación del portaobjetos donde se encuentra la muestra, y se desnaturalizan la sonda y la muestra de forma conjunta a  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ .

- La hibridación bajo condiciones controladas de humedad y temperatura de la sonda de ADN con su secuencia complementaria en el núcleo que se pretende evaluar, formando así un heterodúplex. El tiempo de hibridación varía en función de la sonda utilizada.

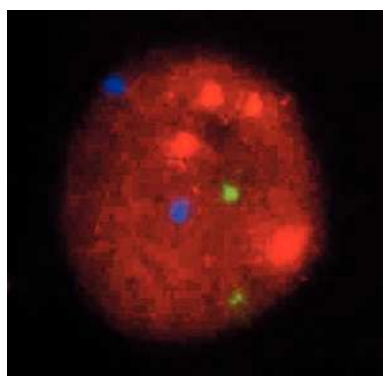
- La detección de las señales con microscopio de fluorescencia tras realizar una serie de lavados para eliminar el exceso de sonda unido inespecíficamente al núcleo evaluado. Para ello, se sumergen los portaobjetos durante 2 min en una cubeta coplin con 0,4 x SSC a  $73^\circ\text{C}$  en un baño térmico. A continuación se realiza un segundo lavado de 30 s en una cubeta con 2 x SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente. Se utiliza también una contratinción que facilita la visualización de toda la cromatina y la identificación de las marcas fluorescentes en el núcleo.

- La interpretación de los resultados es inmediata, mediante un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados. Se contabiliza el número de marcas fluorescentes que aparece en cada núcleo para todos los cromosomas analizados (fig. 2).

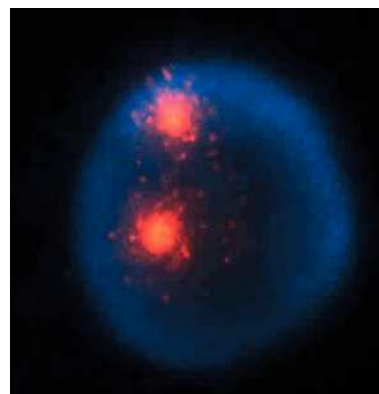
### FALLO REPETIDO DE IMPLANTACIÓN

El fallo de implantación (FI) se define como  $\geq 3$  episodios fallidos tras un ciclo de FIV o tras la transferencia de más de 10 embriones de buena morfología. El FI es un gran desafío para los clínicos, ya que sus causas pueden ser múltiples y no están muy bien definidas. En el FI podrían desempeñar un papel importante tanto los factores embrionarios como del endometrio. Básicamente, las causas del FI pueden ser las siguientes: defectos en el diálogo embrión-endometrio, efecto negativo de los protocolos de estimulación, malformaciones uterinas, genes de la implantación (identificados más de 1.000), factores inmunológicos, infecciones y problemas relacionados

Embrión normal: imágenes de dos rondas consecutivas de hibridación en un mismo blastómero



1313, 1616, 1818, 2121, 2222



XX

Fig. 2. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en blastómeros.

con el embrión. En algunas pacientes con FI, las tasas de implantación más bajas pueden deberse a su edad avanzada; sin embargo, hay un elevado porcentaje de pacientes jóvenes que presentan FI a pesar de tener embriones con buena morfología.

En las siguientes líneas nos centraremos únicamente en el papel del embrión y, en concreto, en el aspecto cromosómico. En este sentido, se han utilizado diferentes estrategias para mejorar el pronóstico en estas pacientes. Unas van dirigidas a seleccionar los embriones de mejor calidad y aumentar con ello las tasas de implantación, como el cultivo embrionario prolongado con la selección para la transferencia de los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (cocultivo, cultivo secuencial) y el DGP con la selección de embriones cromosómicamente normales. Otras estrategias se orientan en la mejora de la capacidad de implantación de estos embriones, como el *hatching* asistido (HA) o la extracción de fragmentos.

Algunos grupos han referido buenos resultados con la utilización del HA<sup>10</sup>, mientras que otros no han observado utilidad en este método. El HA se ha utilizado en pacientes con FI para solucionar las posibles deficiencias en la zona pelúcida o mejorar la capacidad de algunos embriones para realizar la eclosión de esta zona antes de la implantación.

El cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto también ha sido utilizado como un instrumento capaz de seleccionar los embriones con mayor probabilidad de implantación. De hecho, las tasas de im-

plantación y embarazo en pacientes con FI de nuestro programa de donación de óvulos fueron significativamente superiores en los ciclos en que se realizó la transferencia de blastocistos (el 32,7 y el 54,3%), respecto a las pacientes a quienes se realizó la transferencia en el segundo día de desarrollo embrionario (el 4,5 y el 13,3%). Sin embargo, los resultados no fueron tan prometedores en las pacientes con FI y con sus propios ovocitos. Las tasas de implantación y de embarazo cuando se transfirieron blastocistos fueron del 11,9 y el 19,6%, respectivamente, frente al 10,7 y el 35% cuando las transferencias se realizaron en segundo día<sup>11</sup>. Por otra parte, también se ha descrito un notable descenso de las tasas de implantación y embarazo en pacientes con ciclos repetidos de transferencia de blastocistos<sup>12</sup>.

En este contexto, el DGP es una propuesta ventajosa con relación a las otras mencionadas anteriormente, en la medida en que aporta información diagnóstica de la posible etiología del FI. Algunos estudios recientes han demostrado que las parejas con FI tienen una frecuencia estadísticamente superior de embriones con alteraciones cromosómicas. Además, el número de ciclos de reproducción asistida realizados parece predecir, de manera lineal, la tasa de embriones con cariotipo anormal: mientras que en las parejas con 2 ciclos frustrados de FIV la tasa de embriones anormales se sitúa alrededor del 40%, este valor llega a un 50% en el grupo con 3 intentos de FIV y al 67% en parejas con más de 5 ciclos de FIV sin embarazo<sup>13</sup>.

**TABLA I. Resultados del Instituto Valenciano de Infertilidad en pacientes con fallo de implantación**

|                                   | < 37 AÑOS  | ≥ 37 AÑOS  | TOTAL      |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|
| N.º de ciclos                     | 150        | 69         | 219        |
| N.º de embriones<br>analizados    | 944        | 380        | 1.324      |
| N.º de embriones<br>anormales (%) | 575 (60,9) | 272 (71,6) | 847 (64,0) |
| Transferencias (%)                | 128 (85,9) | 51 (73,9)  | 179 (81,7) |
| Gestaciones (%)                   | 50 (39,1)  | 15 (29,4)  | 65 (36,3)  |
| Tasa de implantación              | 26,6       | 15,7       | 23,7       |
| Aborto (%)                        | 7 (14,0)   | 6 (40,0)   | 13 (20,0)  |

En el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) comenzamos con la aplicación del DGP en pacientes con FI en el año 2000, y hasta el momento hemos realizado 219 ciclos en pacientes de nuestro programa de FIV con una edad media de  $35,1 \pm 3,6$  años. Las tasas de embarazo e implantación fueron del 36,3 y el 23,7%, respectivamente. La edad tuvo una importante influencia en el éxito del tratamiento, y los mejores resultados se obtuvieron en las mujeres < 37 años, en las que las tasas de embarazo e implantación fueron del 39,1 y el 26,6%, frente al 29,4 y el 15,7% en las pacientes ≥ 37 años (tabla I).

En nuestra primera serie de DGP en FI ya observamos un elevado porcentaje de embriones cromosómicamente anormales<sup>13</sup> que se ha mantenido hasta la actualidad (64,0%), más del doble del observado en nuestro grupo control. Las anomalías más frecuentes se observaron para el cromosoma 16 (el 21,8% de los embriones), el cromosoma 21 (18,7%) y el cromosoma 22 (20,6%).

En total, en nuestra serie 13 pacientes abortaron tras el DGP, en 6 de ellos se practicó una histeroembrioscopia con el resultado de cariotipo normal en todos. Nos llamó la atención en la mayor parte de estos casos la elevada respuesta a las gonadotropinas con valores de estradiol superiores a la media, por lo que podríamos suponer que los abortos se debieron más a esta circunstancia, en algunos casos asociada con la presencia de ovarios poliquísticos.

Otra observación importante en las pacientes con FI, tanto en nuestras series como en otros estudios, es el alto porcentaje de embriones con monosomías, cuyo bajo potencial de desarrollo podría ser la causa del FI. De hecho, Sandalinas et al han observado que sólo el 9% de los embriones monosómicos alcanzan el estadio de blastocisto, frente al 37% de los trisómicos<sup>15</sup>. Nuestros datos muestran que el 29,8% de los embriones monosómicos alcanzaron el estadio de blastocisto, mientras que el porcentaje de embriones trisómicos que lograron dicho estadio fue del 60%<sup>16</sup>.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en los estudios citogenéticos de abortos espontáneos, en los que no se encuentran monosomías (excepto la monosomía X y raramente la monosomía 21), por lo que se ha propuesto que las monosomías tendrían un efecto letal y no llegarían a implantarse.

### ABORTO DE REPETICIÓN DE CAUSA DESCONOCIDA

El aborto de repetición (AR) se ha definido clásicamente como ≥ 3 pérdidas gestacionales consecutivas o 5 abortos no consecutivos, aunque actualmente hay una tendencia a considerarlo a partir de 2 abortos consecutivos. La incidencia del AR en la población general es aproximadamente del 1%<sup>17</sup> y se han descrito numerosos factores que podrían contribuir a este proceso. Los factores implicados en el AR se podrían agrupar en 6 categorías: alteraciones endocrinas, anomalías anatómicas del útero, factores infecciosos, origen inmunológico, trastornos de la coagulación y trombofilias, y factores citogenéticos. Los protocolos de estudio de estas parejas permiten catalogar el origen del 50% de las pérdidas gestacionales en alguna de estas categorías; sin embargo, en el otro 50% la etiología sigue siendo desconocida<sup>18-20</sup>. Así pues, en estos casos se desconocen los mecanismos biológicos que conducen a las pérdidas reiteradas y los tratamientos aplicados son muchas veces empíricos, sin una clara mejora en la tasa de recién nacidos vivos<sup>21</sup>.

Entre los factores implicados, sabemos que las anomalías cromosómicas desempeñan un papel importante; de hecho, los estudios citogenéticos muestran que el 50-70% de los abortos espontáneos presentan alguna anomalía cromosómica numérica o estructural. La mayor parte de las anomalías son numéricas y se producen en parejas con un cariotipo normal, por lo que tales anomalías embrionarias surgirían *de novo* durante la gametogénesis o en el desarrollo embrionario. Tan sólo un 4,7% de las parejas serían portadoras de una anomalía cromosómica estructural, principalmente translocaciones, que pudiera dar lugar a abortos<sup>22</sup>.

Como ya hemos mencionado, aproximadamente el 95% de las anomalías cromosómicas encontradas en los abortos espontáneos son numéricas *de novo*, y las más frecuentes son las trisomías autosómicas (75,9%), seguidas por la monosomía para el cromosoma X (la alteración cromosómica que de forma individual se presenta con mayor frecuencia en las pérdidas gestacionales del primer trimestre [11,4%]), la triploidia (6,3%) y la tetraploidia (3,8%)<sup>23</sup>.

Entre las trisomías, los estudios citogenéticos clásicos sobre los abortos espontáneos muestran la mayor

incidencia para la trisomía 16 (13,8%), seguida de los cromosomas 22 y 21<sup>24</sup>. Sin embargo, Strom et al, en estudios realizados en biopsias coriales, encontraron la mayor frecuencia para la trisomía 22 (13,9%), seguida de las trisomías para los cromosomas 16 y 21<sup>23</sup>. Más recientemente, en un estudio citogenético de 420 abortos en 285 parejas con aborto de repetición, se ha encontrado también una elevada incidencia de trisomías para el cromosoma 15 (5,2%)<sup>25</sup>. En todos estos estudios, es también importante destacar la ausencia de monosomías para los autosomas, halladas sólo raramente para el cromosoma 21. Estos resultados sugieren que la ausencia de un cromosoma tiene un efecto más nocivo que las trisomías en las fases tempranas del desarrollo embrionario y la implantación, por lo que se las ha considerado responsables de FI y abortos preclínicos.

La incidencia de las anomalías cromosómicas en el AR es más controvertida. Mientras que algunos autores muestran una mayor frecuencia de abortos con anomalías cromosómicas en parejas con AR<sup>26</sup>, otros no han observado esta correlación<sup>27,28</sup>. Warburton et al encontraron que muchas de las trisomías recurrentes ocurrían en el grupo de mujeres de edad avanzada con mayor riesgo únicamente por el factor de la edad<sup>29</sup>. En otro estudio más reciente, realizado en 167 pacientes con 3-16 abortos antes de la semana 20, se ha descrito que tras un aborto aneuploide, la tasa de embarazos evolutivos se eleva al 68%, frente al 41% después de un aborto euploide<sup>28</sup>.

No obstante, para valorar el riesgo de recurrencia de las anomalías cromosómicas debemos tener en cuenta, además de la edad de la paciente, otros 2 factores: la edad gestacional en la que se producen las pérdidas y el número de abortos previos. La mayor incidencia de trisomías se ha observado en abortos embrionarios (6-10 semanas), con un valor del 35%, frente al 28% en las pérdidas preclínicas (< 6 semanas) y el 26% en las fetales (≥ 10-20 semanas)<sup>25</sup>. Por otro lado, se ha descrito una correlación negativa entre la frecuencia de anomalías cromosómicas y el número de abortos previos, con mayor porcentaje en parejas con 2-4 abortos<sup>30</sup>. Por ello, podríamos considerar que las anomalías cromosómicas embrionarias cobrarían especial importancia en las parejas con 2-4 abortos embrionarios previos.

Basados en estos hechos, iniciamos en 1996 un programa de DGP para pacientes con AR, con un doble objetivo: *a)* evaluar si había un incremento en la incidencia de alteraciones cromosómicas embrionarias, y *b)* medir la mejora de los resultados clínicos con la selección de embriones cromosómicamente normales antes de ser transferidos al útero. Utilizamos para el DGP

sondas para los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y. El criterio de inclusión fue la ausencia de detección de la causa de los abortos tras la realización de un protocolo diagnóstico de AR: ecografía vaginal e histerosalpingografía/histeroscopia, valores basales de FSH, LH, PRL, TSH y glucosa, cribado para trombofilia (valores plasmáticos de antitrombina, proteína S y C, y anticuerpos antifosfolípidicos) y cariotipo de la pareja.

Hasta el momento se han realizado en el IVI un total de 241 ciclos en pacientes con AR con una edad media de  $35,0 \pm 3,4$  años. En este grupo de pacientes con AR de causa desconocida el estudio cromosómico de los embriones ha mostrado su utilidad diagnóstica, ya que se ha comprobado que en la mayoría de las parejas el porcentaje de embriones anormales ha sido muy elevado (66,1%) y comparable con el observado en las parejas con un fallo repetido de implantación. La mayor incidencia de anomalías se observó para los cromosoma 16 (20,8%) y 21 (20,5%), seguidas de las anomalías para el cromosoma 22 (19,3%). Estos datos apoyan la idea de que las anomalías cromosómicas podrían ser las responsables de los abortos, como ya se indicaba en los primeros estudios realizados<sup>16,31-33</sup>.

Además, hemos constatado el beneficio terapéutico de esta técnica, ya que la transferencia de embriones euploides nos permitió mejorar su pronóstico reproductivo, comparable al de parejas sin esta patología. En nuestro grupo de estudio de pacientes menores de 37 años se consiguieron tasas de embarazo (cercanas al 39%), de implantación (aproximadamente del 30%) y de aborto (10%) comparables a la población control, y similares también a las tasas observadas en gestaciones espontáneas en mujeres de fertilidad probada<sup>34,35</sup>. En el grupo de pacientes ≥ 37 años, los resultados mostraron una tasa de embarazo del 30% y una tasa de aborto del 20% (tabla II).

En otro trabajo reciente, realizado en mujeres con AR, Werlin et al<sup>36</sup> también describieron mejores tasas

**TABLA II. Resultados del Instituto Valenciano de Infertilidad en pacientes con aborto de repetición**

|                                | < 37 AÑOS  | ≥ 37 AÑOS  | TOTAL      |
|--------------------------------|------------|------------|------------|
| N.º de ciclos                  | 163        | 78         | 241        |
| N.º de embriones analizados    | 965        | 382        | 1.347      |
| N.º de embriones anormales (%) | 613 (63,5) | 278 (72,7) | 891 (66,1) |
| Transferencias (%)             | 128 (78,5) | 50 (64,1)  | 178 (73,1) |
| Gestaciones (%)                | 50 (39,1)  | 15 (30,0)  | 65 (36,5)  |
| Tasa de implantación           | 33,3       | 22,0       | 26,4       |
| Aborto (%)                     | 5 (10,0)   | 3 (20,0)   | 8 (12,3)   |

de embarazo al realizar un DGP que cuando se lleva a cabo la transferencia de embriones sin analizar en los días 3 o 5. Por ello, el DGP se está proponiendo por diversos grupos como una alternativa terapéutica en parejas con AR de causa desconocida<sup>36,37</sup>.

En nuestro estudio, con DGP se redujo considerablemente la tasa de aborto en parejas con AR, pero a pesar de ello, 8 parejas volvieron a abortar. Se pudo realizar histeroembrioscopia en 5 de los casos, con el resultado de 3 cariotipos normales y 2 anormales con trisomía 15. Estos resultados indicarían que en algunas de estas pacientes, en las que el resultado de la embrioscopia fue un cariotipo normal, no podrían descartarse otras posibles causas, entre ellas las génicas (p. ej., mutaciones letales o translocaciones crípticas asociadas al cromosoma X), que se manifestarían con una inactivación preferente del cromosoma X y una tendencia repetida a la pérdida de fetos varones<sup>38,39</sup>. En los otros casos, en los que el resultado de la embrioscopia fue un cariotipo anormal, se refuerza la importancia de las anomalías cromosómicas en los AR, lo que implica la necesidad de analizar otros cromosomas no incluidos en nuestro estudio (como el 15) que también podrían estar asociados con los abortos. De hecho, en un estudio reciente sobre abortos de mujeres con AR ya se indicó un elevado porcentaje de anomalías para el cromosoma 15<sup>25</sup>, superior incluso al observado para los cromosomas 16 y 22, tradicionalmente asociados a los abortos espontáneos. Estos resultados nos han llevado a incluir el cromosoma 15 en los casos de DGP por AR.

La posibilidad de que otros cromosomas puedan estar involucrados en las alteraciones numéricas demuestra la necesidad de emplear las nuevas tecnologías, como quizás la *comparative genomic hybridization*<sup>40-42</sup>, para la evaluación de toda la dotación cromosómica de la célula, y también plantea la interesante cuestión sobre cuál sería la verdadera incidencia de anomalías cromosómicas en embriones humanos.

Con anterioridad a la aplicación del DGP para el estudio de aneuploidías, algunos autores sugirieron el uso de la FIV como una alternativa terapéutica en mujeres con AR de causa desconocida. Balasch et al<sup>43</sup> obtuvieron una tasa de embarazo evolutivo del 66%, pero Raziel et al<sup>44</sup> no encontraron ninguna mejora en los resultados. La FIV permitiría seleccionar para la transferencia los embriones con mejor morfología, y con ello evitar en parte la transferencia de los embriones con más riesgo de ser cromosómicamente anormales. Sin embargo, sabemos que algunas anomalías, como la monosomía X y las trisomías, son capaces de desarrollarse hasta blastocisto en un porcentaje similar al de los embriones normales. Por tanto, a nuestro

entender, la alternativa más aceptable en una pareja con AR que se vaya a realizar un nuevo ciclo de FIV sería ofrecer el DGP.

La donación de óvulos también se propuso como una alternativa en parejas con AR de causa desconocida<sup>45</sup>. En estas parejas, los buenos resultados obtenidos con donación de óvulos apoyaban la idea del origen ovocitario en algunos casos del AR y cuestionaban el posible efecto de factores sistémicos maternos. En la actualidad, la donación de óvulos sigue ofreciéndose como una alternativa en las parejas en las que todos los embriones son anormales en uno o más ciclos de DGP y se ha descartado el factor masculino.

Aunque no se puede descartar el papel del endometrio en las fases iniciales de la implantación, algunos autores sugieren que las anomalías cromosómicas, tanto en gametos como en embriones, serían las responsables de la baja eficiencia reproductiva humana, lo que da lugar a FI y pérdidas gestacionales tempranas<sup>46</sup>. También se ha sugerido que el AR podría ser la consecuencia de un fallo en los mecanismos de selección natural, responsables de controlar que los embriones de mala calidad no implanten. Se ha propuesto que podrían estar implicados en el AR<sup>47</sup> tanto una disminución en la selectividad endometrial como una elevada incidencia de embriones cromosómicamente anormales. Por último, y relacionado con el papel del endometrio, cabe mencionar que en el campo de la reproducción asistida también se ha sugerido la posibilidad del útero de alquiler en los casos donde el número de abortos previos es muy elevado y se ha descartado la causa fetal<sup>48</sup>.

## ORIGEN Y ETIOLOGÍA DE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

El origen de las anomalías cromosómicas, en concreto de las trisomías autosómicas, es principalmente materno, y sólo el 5-10% es de origen paterno. En el caso de la trisomía 16, se ha observado un origen materno en el 100% de los casos. Las trisomías autosómicas de origen materno están frecuentemente asociadas con errores en la meiosis I, excepto la trisomía 18, donde predominan los errores en la meiosis II<sup>49</sup>.

Para las trisomías de los cromosomas sexuales (XXX, XXY y XYY) la situación es diferente: el origen reside en un elevado porcentaje en no disyunción durante la meiosis paterna o en las divisiones poscigóticas<sup>50</sup>. En las monosomías X, el origen del cromosoma X es normalmente materno (en el 80% de los casos), lo que implica errores en la meiosis paterna, que da lugar a espermatozoides nulisómicos para los cromosomas sexuales<sup>51</sup>. También se ha propuesto que la

presencia de mosaicismo materno para los cromosomas sexuales podría dar lugar a embriones portadores de la monosomía 45,X<sup>52</sup>.

La triploidía es el tercer tipo de anomalía más frecuente en los abortos espontáneos. La mayor parte de las triploidías son de origen paterno<sup>53,54</sup>, debido a la fecundación de un ovocito por más de un espermatozoide<sup>55</sup> o también por la fecundación de un ovocito por un espermatozoide diploide, más frecuentes en varones oligozoospermicos<sup>54</sup>. La diploidía no es tan frecuente en ovocitos, ya que las alteraciones del huso meiótico provocan fundamentalmente aneuploidías<sup>56</sup>, aunque se ha descrito un aumento en la proporción de ovocitos diploides a medida que aumenta la edad materna<sup>57</sup>.

Como ya hemos mencionado, en la mayor parte de los casos los progenitores presentan cariotipos normales, lo que sugiere que se trata de anomalías cromosómicas *de novo*<sup>58</sup>. Se supone que la anomalía ha surgido como un evento esporádico en la gametogénesis, y la meiosis I materna es el estadio más vulnerable. De los estudios sobre abortos trisómicos<sup>59</sup> se concluye que estas no disyunciones se deben más al azar que a una predisposición biológica individual.

Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que los varones con problemas de fertilidad presentan un incremento de anomalías cromosómicas numéricas en sus espermatozoides<sup>60-62</sup>. Por otro lado, en estudios realizados en ovocitos de pacientes de FIV se ha observado que un 26% presenta aneuploidías<sup>63</sup>, y esta cifra se eleva hasta un 50% en los pacientes de edad avanzada<sup>64</sup>. Más recientemente, Sandalinas et al<sup>65</sup>, mediante la técnica de *spectral karyotyping*, han obtenido resultados similares, con un 29% de ovocitos aneuploides procedentes de mujeres menores de 35 años y un 56% de ovocitos aneuploides en mujeres mayores de 35 años. También se ha descrito el fenómeno de división prematura del centrómero en algunas familias con historia de abortos espontáneos e infertilidad. En estos casos, se ha sugerido que las anomalías en los centrómeros podrían dar lugar a un mayor riesgo de inestabilidad cromosómica<sup>66</sup>.

#### LIMITACIONES DEL DGP MEDIANTE FISH

En primer lugar, hay que tener en cuenta que la eficiencia de la hibridación de las sondas utilizadas para la FISH no es del 100%, esto implica que algunos de los embriones analizados se califiquen como no informativos para algunos de los cromosomas analizados y, por tanto, no puedan seleccionarse para la transferencia. En nuestro programa de DGP en el 90% de los embriones se obtuvo un diagnóstico para todos los

cromosomas analizados; en el 10% restante no se pudieron interpretar las señales de hibridación para uno o más cromosomas, ya sea por las características intrínsecas de las sondas utilizadas, por la morfología del núcleo o la calidad de la extensión. Manor et al obtuvieron resultados similares con una eficiencia de hibridación del 87% para los autosomas y del 97% para los cromosomas sexuales<sup>67,68</sup>.

Los resultados de un ciclo de DGP también están influenciados por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Para ello, es necesario que como resultado de la estimulación ovárica se obtenga un número mínimo de ovocitos. Vandervorst et al aconsejan cancelar los ciclos en que se espere obtener menos de 6 ovocitos, ya que las expectativas de transferencia y embarazo se reducen considerablemente<sup>69</sup>. Esto se debe a que durante todo el proceso, en cada paso se va reduciendo el número de embriones para una futura transferencia: desde la tasa de fecundación, que en nuestras pacientes de DGP es de 80%, la tasa de división, con el 77% de los cigotos fecundados con un buen desarrollo embrionario que permite la biopsia, hasta la fase final del análisis cromosómico, donde el porcentaje de embriones anormales puede exceder el 50%.

Por último, hay que tener en cuenta la presencia de mosaicismo en embriones humanos desde el estadio de 2 células. La incidencia de mosaicismo y su repercusión en un posible error de diagnóstico ha sido muy discutida. Munné et al<sup>70</sup> encontraron que el 39,6% de los embriones bloqueados y el 25,2% de los fragmentados y/o con desarrollo lento presentaban mosaicismo, pero este porcentaje descendía al 14,1% en los embriones con buena evolución. En nuestro programa de DGP, en los embriones en que hemos analizado 2 blastómeros se ha hallado un 6,5% con resultados discordantes entre las 2 células, por lo que en caso de embarazo, siempre se debe recomendar la práctica de una amniocentesis.

#### CONCLUSIÓN

La introducción del DGP en el campo de la medicina reproductiva ha revolucionado el estudio de la pareja infértil. El análisis de un blastómero de un embrión en el tercer día de desarrollo mediante el método de FISH permite la selección de embriones cromosómicamente normales para la transferencia, sin afectar negativamente al potencial de desarrollo o de implantación del embrión. El DGP se está convirtiendo en un procedimiento cada vez más frecuente en los tratamientos de FIV en las pacientes con mal

pronóstico y con una predisposición a tener un mayor número de embriones cromosómicamente anormales. Este grupo incluiría, entre otras, las parejas con fallos repetidos de implantación tras varios ciclos de FIV y las parejas con aborto de repetición de causa desconocida.

# BIBLIOGRAFÍA

- Edwards RG, Gardner RL. Sexing of five rabbit blastocysts. *Nature* 1968;214:576-7.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344:768-70.
- Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2002;8:11-20.
- Griffin DK, Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Delhanty JDA. Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod* 1991;6:101-5.
- Veiga A, Santaló J, Vidal F, Calderón C, Giménez C, Boada M, et al. Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection. *Hum Reprod* 1994;9:2156-9.
- Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM. Chromosome translocations modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1998;18:1437-49.
- Munné S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L, et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13,14,15,16,18,21,22. *Prenat Diagn* 1998;18:1459-66.
- ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002;17:233-46.
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, et al. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;5:708-14.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, et al. Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum Reprod* 1998;13:1331-5.
- Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, et al. Cocultured of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2638-46.
- Shapiro B, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Dramatic declines in implantation and pregnancy rates in patients who undergo repeated cycles of in vitro fertilization with blastocyst transfer after one or more failed attempts. *Fertil Steril* 2001;76:538-42.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP et al. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 1998;68:1128-31.
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *RBMonline* 2003;6:232-7.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderón G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001;16:1954-8.
- Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003;18:182-8.
- Stirrat GM. Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology, causes and management. *Lancet* 1990;336:673-5.
- Tho P, Byrd JR, McDonough PG. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. *Fertil Steril* 1979;32:389-95.
- Coulam C. Unexplained recurrent pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 1996;29:999-1004.
- Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod* 1994;9:1328-32.
- Plouffe L, White EW, Tho SP, et al. Etiological factors of recurrent abortion and subsequent reproductive performance of couples: have we made any progress in the past 10 years? *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:313-21.
- Eiben B, Bartels I, Bahr-Porch S, Borgmanns S, Gatz G, Gellert G, et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 1990;47:656-63.
- Strom CM, Ginsberg N, Applebaum M, Bozorgi N, White M, Caffarelli M, et al. Analysis of first trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:458-61.
- Hassold TJ, Chen N, Funkhouser T, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1998;44:151-78.
- Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002;17:446-51.
- Ryynänen M, Leskinen S, Heinonen S, Kirkinen P. Recurrence risk of a serious, noninherited chromosomal abnormality. *Fertil Steril* 1997;68:439-42.
- Cowchock FS, Gibas Z, Jackson LG. Chromosome errors as a cause of spontaneous abortion: the relative importance of maternal age and obstetric history. *Fertil Steril* 1993; 59:1011-5.
- Stern JJ, Dorfmann AD, Gutiérrez-Nájjar AJ, Cerrillo M, Coulam CB. Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1996;65:250-3.
- Warburton W, Kline J, Stein Z, Hutzler M, Chin A, Hassold T. Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 1987;41:465-83.
- Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* 2000;73:300-4.
- Vidal F, Giménez C, Rubio C, Simón C, Pellicer A, Santaló J, et al. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:309-12.
- Simón C, Rubio C, Vidal F, Giménez C, Moreno C, Parrilla JJ, et al. Increased chromosome abnormalities in preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod Fertil Dev* 1998;1:87-92.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, et al. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999;71:1033-9.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1998;319:189-94.

35. Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 1996;65:503-9.
36. Werlin L, Rodi I, De Cherney A, Marelllo E, Hill D, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003;80:467-8.
37. Chen SH, Munné S. Can preimplantation genetic diagnosis (PGD) reduce the risk for recurrent pregnancy loss? *Postgrad Obstet Gynecol* 2003;23:1-5.
38. Lanasa MC, Hogge WA, Kubik CJ, Ness RB, Harger J, Nagel T, et al. A novel X chromosome-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2001;9:563-8.
39. Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Fujimori K, Okamura K. Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2001;76: 908-14.
40. Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;106: 210-7.
41. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA, Munné S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;78: 543-9.
42. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003;80:860-8.
43. Balasch J, Creus M, Fábregues F, Cívico S, Carmona F, Martorell J, et al. In-vitro fertilization treatment for unexplained recurrent abortion: a pilot study. *Hum Reprod* 1996;11:1579-82.
44. Raziel A, Herman A, Strassburger D, Soffer Y, Bukowsky I, Ron-El R. The outcome of in vitro fertilization in unexplained habitual aborters concurrent with secondary infertility. *Fertil Steril* 1997;67:88-92.
45. Remohí J, Gallardo E, Levy M, Valbuena D, De los Santos MJ, Simón C, et al. Oocyte donation in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 1996;11:2048-51.
46. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;8:333-43.
47. Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod* 2002;17:1959-63.
48. Raziel A, Friedler S, Schahter M, Strassburger D, Ron-El R. Successful pregnancy after 24 consecutive fetal losses: lessons learned from surrogacy. *Fertil Steril* 2000;74:104-6.
49. Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998;13:313-9.
50. Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 1995;33:101-33.
51. Chandley AC. The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human populations. *Ann Genet* 1981;24:5-11.
52. Reinisch LC, Silver KL, Dumars KW. Sex chromosome mosaicism in couples with repeated fetal loss [abstract]. *Am J Hum Genet* 1981;33:117.
53. Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry. *Am J Hum Genet* 2000;66:1807-20.
54. Egozcue S, Blanco J, Vidal F, Egozcue J. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod* 2002;17:5-7.
55. McFadden D, Jiang R, Langlois S, Robinson WP. Dispermy: origin of diandric triploidy. *Hum Reprod* 2002; 17:3037-8.
56. Eichenlaub-Ritter U, Cucurkam S, Betzendahl I. Studies on the aneugenic properties of trichlorfon, a pesticide, vermicide and drug used in the treatment of Alzheimer patients [abstract book 1]. *Hum Reprod* 1999;14:240-1.
57. Roberts CG, O'Neill. Increase in the rate of diploidy with maternal age in unfertilised in-vitro fertilization oocytes. *Hum Reprod* 1995;10:2139-41.
58. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 1990; 5:519-28.
59. Hassold T, Hunt PA, Sherman S. Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. *Curr Opin Genet Develop* 1993; 3:398-403.
60. Pfeffer J, Pang MG, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, et al. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72:472-8.
61. Arán B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X,Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999;72:696-701.
62. Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, et al. Detection of aneuploidy for chromosomes 4,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:1266-73.
63. Plachot M, Veiga A, Montagut J, De Grouchy J, Calderón G, Lepretre S, et al. Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum Reprod* 1988;3:627-35.
64. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999;72:837-44.
65. Sandalinas M, Márquez C, Munné S. Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 2002;8:580-5.
66. Bajnóczy K, Gardó S. «Premature anaphase» in a couple with recurrent miscarriages. *Hum Genet* 1993;92:388-90.
67. Manor D, Kol S, Lewit N, Lightman A, Stein D, Pillar M, et al. Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum Reprod* 1996;11:2502-6.
68. Manor D, Stein D, Itskovitz-Eldor J. Preimplantation diagnosis by FISH: the Rambam experience. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:308-9.
69. Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod* 1998;13:169-76.
70. Munné S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994;51:373-9.