

## Diagnóstico genético preconcepcional

Dra. M. Soledad Sepúlveda

Dr. [Fernando Zegers-Hochschild](#)

[Unidad de Medicina Reproductiva](#)

La probabilidad de embarazo en un ciclo de tratamiento de fecundación in vitro (FIV) depende en parte, del número de embriones transferidos al útero. Diversos protocolos de estimulación hormonal son utilizados para obtener tantos ovocitos como sea posible. Sin embargo, el número de ovocitos a inseminar está determinado por el número máximo de embriones en división que pueden o deben ser transferidos, considerando por una parte la eficiencia y por otra parte los riesgos de multigestación. No existiendo parámetros claros que permitan la elección del ovocito a inseminar el procedimiento se realiza utilizando la morfología del complejo cúmulo corona que rodea al ovocito. Sin embargo, este método es poco preciso y solo refleja la madurez meiótica del gameto femenino, pero no su calidad.

El éxito de un procedimiento de Reproducción Asistida depende además de la calidad de los embriones transferidos. Es por esto que la tecnología reproductiva actual sigue buscando las mejores condiciones para su cultivo, que permitan la obtención de embriones morfológicamente normales. Sin embargo, existen factores “ocultos” que no es posible evaluar al microscopio de luz, que afectan el desarrollo posterior del embrión. Dentro de estos están las anomalías cromosómicas que pueden dar origen a embriones que no se van a implantar o que abortarán. Tratando de detectar los defectos cromosómicos que presentan los embriones se ha desarrollado una técnica anterior al diagnóstico prenatal, que se denomina “diagnóstico genético preimplantacional” (PGD).

Desde hace una década el PGD, realizado en embriones de 8 células, se usa como una alternativa al diagnóstico prenatal convencional<sup>1</sup>. Los primeros embarazos luego de PGD ocurrieron en 1989, en una serie de parejas que tenían riesgo de enfermedades ligadas al cromosoma X<sup>2</sup>. Este tipo de procedimiento se realiza actualmente en Europa y USA reportándose hasta la fecha más de 100 niños nacidos vivos<sup>3-6</sup>.

Para el estudio de aberraciones cromosómicas en embriones se ha utilizado la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que se basa en el uso de sondas de ADN marcadas que se unen específicamente al ADN de las células fijadas. Utilizando diferentes sondas fluorescentes, se pueden analizar simultáneamente varios cromosomas en la misma célula y tener los resultados luego de aproximadamente 5 horas. La técnica analiza el contenido genético de una o más células del embrión antes de ser transferido al útero. Para ello, se realiza una perforación en la zona pelúcida del embrión, y las células son removidas mediante una aspiración suave para ser fijadas y analizadas. Durante este lapso de tiempo el embrión es mantenido en cultivo. Debido a la totipotencialidad de las células en esta temprana etapa del desarrollo, el removerlas no afecta el desarrollo posterior del embrión.

El método ha mostrado ser exitoso puesto que al seleccionar los embriones a transferir se aumentan las tasas de implantación. Sin embargo, esto puede implicar el desecho de embriones y por tanto, no es aceptable en nuestro medio. Por esto nos parece importante desarrollar una metodología semejante, denominada Diagnóstico Genético Preconcepcional (DGP), que analiza

los cromosomas presentes en el polocito del ovocito antes de la fecundación. Estos se corresponden con el contenido cromosómico del ovocito, por ejemplo, si el polocito carece de un cromosoma determinado, el ovocito necesariamente presenta un cromosoma extra.

Cuando ocurre la fecundación cada progenitor aporta 23 cromosomas al cigoto, pero en algunos casos ocurren aneuploidías, esto es, que hay un cromosoma extra o ausente. Dependiendo de que cromosoma es el afectado, muchas de las aneuploidías determinan un desarrollo anormal del embrión, que usualmente no permite su implantación o produce un aborto espontáneo. La frecuencia de anomalías de este tipo está relacionada con la edad de la mujer. En mujeres menores de 30 años ocurren con una frecuencia de 1 en cada 1000 nacimientos y esto aumenta a 1 de cada 350 nacimientos en mujeres de 35 años. A los 40 años la frecuencia aumenta al 1% y a los 45 años al 4%<sup>7</sup>.

## Futuro en CLC

Actualmente, la Unidad de Medicina Reproductiva está desarrollando un programa de investigación que incluye el análisis de 5 cromosomas (13, 16, 18, 21, 22) en el polocito de ovocitos humanos (DGP). Los cromosomas señalados anteriormente son escogidos por llegar a término (13, 18, 21) o por ser más frecuentes en abortos (16, 22). De esta forma se pretende bajar la probabilidad de tener embriones aneuploides, lo que llevaría a un aumento de la tasa de implantación, una reducción de la tasa de aborto y eventualmente la prevención de Síndrome de Down en esta población.

Puesto que la probabilidad de implantarse de un ovocito es entre un 15% y 25%, resulta muy valioso poder contar con una herramienta que permita la selección del ovocito que va a ser inseminado y poder aumentar así la eficiencia del procedimiento. Esta probabilidad de implantarse del embrión humano es tan baja *in vitro* como *in vivo* y se han intentado múltiples formas de mejorarla como la eclosión asistida, el cultivo hasta blastocisto, la transferencia de citoplasma, etc. Sin embargo, por una parte los excelentes resultados embarazos con donación de ovocitos a mujeres mayores y por otra parte el análisis genético efectuado a los embriones, apuntan a que la eficiencia del proceso reproductivo está dada por la calidad ovocitaria que disminuye con la edad de la mujer<sup>8</sup>.

Esta técnica se utilizará en pacientes del programa de Reproducción Asistida que tenga una o más de las siguientes características: i) múltiples intentos de fecundación *in vitro* fracasados; ii) ciclos previos con embriones de baja calidad; iii) edad superior a 38 años; iv) ciclos con abortos previos.

Mediante técnicas de micromanipulación se perfora la zona pelúcida y se extrae el polocito por aspiración, el cual se fija y procesa para el análisis de cromosomas. Así es posible que el biólogo al cabo de unas horas, pueda identificar aquellos ovocitos que tengan una constitución cromosómica normal (para los cromosomas estudiados). Los ovocitos son inseminados por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para evitar que más de un espermatozoide ingrese al ovocito por la perforación generada en la zona pelúcida al extraer el polocito (Figuras 1, 2).

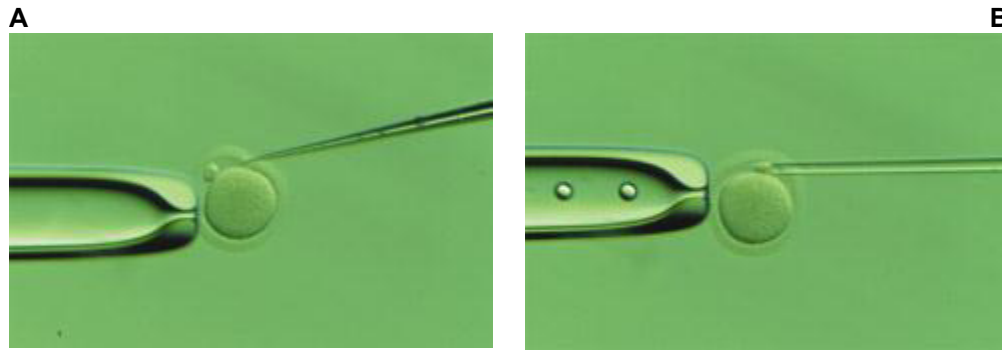


Figura 1. Biopsia de polocito. a) perforación mecánica de la zona pelúcida con micropunzón de vidrio. b) aspiración del polocito con micropipeta de 10 µm de diámetro.

Figura 2.

Las pacientes serán sometidas a los protocolos de estimulación establecidos para la superovulación controlada que se realiza normalmente para un procedimiento de fecundación asistida. Los ovocitos son obtenidos por aspiración de los folículos 35-36 horas después de la colocación de hCG, en medio de cultivo y mantenidos a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta que se realice la biopsia del polocito.

**Biopsia del polocito:** Bajo el microscopio invertido (Olympus IX-70) y utilizando un par de micromanipuladores (Narishigue ON2-99D) se toma el ovocito por presión negativa con una pipeta de holding y con un micropunzón se rasga la zona peluada. Luego por ese orificio se introduce una micropipeta de 10 µm de diámetro y mediante aspiración se recoge el polocito, el cual se guarda en una gota de medio de cultivo numerada. **Fijación y denaturación del DNA:** El polocito es tratado por 5 minutos en medio hipotónico de citrato de sodio y luego fijado sobre un portaobjetos. Los preparados son colocados por 10 min a 78°C para la denaturación del DNA, sobre una platina caliente.

**Inmunofluorescencia indirecta para el análisis de cromosomas:** Las sondas para cada cromosoma son mezcladas y se co-incuba durante 3 a 5 horas colocando una microgota sobre el lugar donde esta el extendido de cromosomas. Luego se observa en el microscopio de fluorescencia utilizando un set de filtros especiales para estas sondas.

**Selección de ovocitos e ICSI:** Luego de analizar los polocitos de cada ovocito se escoge para inyectar aquellos ovocitos que no presentan anomalías en los cromosomas estudiados. Se insemina utilizando la técnica convencional de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).



## Referencias

1. Handyside AH & Delhanty JDA. (1997). *Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises*. *Trends Genet.* 13: 270-275.
2. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy R & Winston RM. (1990). *Pregnancies from biopsed human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification*. *Nature* 344: 768-770.
3. Grifo JA, Tang YX, Cohen J, Gilbert F, Sanyal MK, Rosenwaks. *Pregnancy after embryo biopsy and amplification of DNA from X and Y chromosomes from single blastomeres*. *Journal of the American Medical Association* 6: 727-729, 1992.
4. Munné S, Weier H-U G, Stein J, Grifo J, Cohen J: *A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 10: 82-90, 1993.
5. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J: *Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos*. *Human Reproduction* 8: 2185-2191, 1993.
6. Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Ferraretti AP, Massey JB & Scott R. (1999). *Positive outcome after preimplantational diagnosis of aneuploidy in human embryos*. *Human Reprod.* 14: 2199-2203.
7. Hassold T. and Chiu D. *Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy*. (1995). *Human Genetics* 70: 1117.
8. Dailey T, Dale B, Cohen J & Munné S (1996). *Association between non-disjunction and maternal age in meiosis II human oocytes detected by FISH analysis*. *Am J Hum Genet.* 59: 176-184.