

416 Ángel Rubio López^a
Encarna Gallego Pastor^b
Alberto García Enguidanos^b
Clara Luna Cañas^b
Eva Rodríguez Mendez^b
Alicia Leiva Tapia^b
Patricia Ceballos del Fresno^b
Ángel Santolaya Gallardo^b

^aServicio de Obstetricia y Ginecología.
Hospital Universitario de Getafe. Getafe (Madrid). España.
^bFIV Recoletos. Madrid. España.

Correspondencia:

Dr. A. Rubio López.
Servicio de Obstetricia y Ginecología.
Hospital Universitario de Getafe.
Carretera Madrid-Toledo, km. 12500. 28905 Getafe (Madrid).
España.
Correo electrónico: angelrl@inicia.es

Fecha de recepción: 5/7/2007.
Aceptado para su publicación: 8/7/2008.

Diagnóstico genético preimplantacional en un caso de una paciente portadora de una inmunodeficiencia combinada severa. Revisión crítica de este procedimiento en ciclos de FIV-ICSI

Preimplantation genetic diagnosis in a patient carrier of severe combined immunodeficiency. Critical review of this procedure in IFV-ICSI cycles

RESUMEN

Objetivo: Realizar un análisis crítico, a partir de un caso clínico del diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

Pacientes y métodos: Se describe a una paciente con una enfermedad de origen genético (inmunodeficiencia combinada severa) en la que el DGP fue de vital importancia para su tratamiento.

Conclusiones: El DGP es un arma terapéutica de gran relevancia en la reproducción asistida pero sus indicaciones, salvo en enfermedades monogénicas y las ligadas al sexo están todavía en debate.

PALABRAS CLAVE

Enfermedad genética. Inmunodeficiencia. Tratamiento. Fecundación.

ABSTRACT

Objective: To perform a critical analysis from a clinical case of preimplantation genetic diagnosis (PGD).

Patients and methods: A patient is described who has a disease of genetic origin (severe combined immunodeficiency) in which PGD was of vital importance for her treatment.

Conclusions: PGD is a very important tool in assisted reproduction but its indications, except in monogenic diseases and those linked to sex, are still under debate.

KEY WORDS

Genetic disease. Immunodeficiency. Treatment. Fertilisation.

INTRODUCCIÓN

La inmunodeficiencia combinada severa es un raro síndrome, que abarca diversas etiologías y varios cuadros clínicos, que se produce por la ausencia combinada de la función de los linfocitos B y T.

El defecto más frecuente por el que se da esta alteración (en un 45% de los casos) es una deficiencia en la cadena gamma común de los linfocitos T. Esta ausencia se hereda como una enfermedad ligada al cromosoma X autosómica recesiva.

El cuadro clínico se basa en la aparición, desde las primeras épocas de la vida, de infecciones causadas por microorganismos normales (varicela, rotavirus, adenovirus, virus de Epstein-Barr, etc.), pero con un desarrollo mucho más severo, y otras causadas por gérmenes oportunistas, como el citomegalovirus, *Candida* o *Pneumocystis carinii*, muchas de las cuales tienen un final fatal.

El diagnóstico específico pasa por una detección mediante técnicas de biología molecular de los genes causantes.

El tratamiento definitivo se centra actualmente en el trasplante de células madre de médula ósea o de cordón umbilical de un sujeto compatible (tasa de supervivencia del 70%, sobre todo si es de un hermano y antes de los 3,5 meses de vida).

Muy recientemente, la terapia génica está aportando una gran esperanza a estos pacientes, aunque todavía no es de aplicación común.

Además, el tratamiento sintomático (antibacterianos, antivíricos) y profiláctico (vacunas, inmunoglobulinas intravenosas) es vital para la supervivencia por las repetidas infecciones que se presentan en estos casos.

CASO CLÍNICO

Paciente de 33 años, que presenta como antecedente más importante ser portadora de una inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X. Este cuadro se diagnosticó genéticamente.

La paciente tuvo un hijo afectado de la enfermedad, que falleció a los pocos meses de vida, y 2 interrupciones voluntarias del embarazo en el segundo trimestre por ser los 2 fetos varones y portadores de la enfermedad.

Se programó un ciclo de fertilización in vitro-inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV-ICSI), con diagnóstico genético preimplantacional, y se realizó selección del sexo; antes de ello, se solicitó un seminograma con REM al varón, que fue normal, una analítica hormonal a la paciente (que demostró que presenta un patrón de síndrome de ovario poliquístico) y una analítica completa con serología a ambos que resulta también normal.

Se realizó un tratamiento según un protocolo largo, realizando un frenaje previo con nafarelina nasal (Synarel®, 800 µg/24 h) durante 14 días. Cuando se comprobó (ecográfica y analíticamente) que el frenaje era correcto, se comenzó la estimulación con 150 U de hormona foliculostimulante recombinante (Gonal®); tras 10 días de estimulación, se indujo la ovulación con 250 µg de gonadotropina coriónica humana recombinante (HCGr) (Ovitrelle®).

En la punción bajo anestesia se obtuvieron 10 ovocitos metafase II.

En el día +1 se comprobó la fecundación en 8 casos, de los que en el día +3 se pudieron biopsiar, tras la digestión de la zona pelúcida con ácido tirodes, 6 embriones. Los núcleos de las células obtenidas se aislaron y se fijaron por el método de Tarkowsky, procediendo al estudio mediante hibridación in situ fluorescente con sondas para los cromosomas X e Y.

Se comprobó la existencia de 3 embriones XX, 2 XY y un X0. Los embriones con la dotación cromosómica XX se seleccionaron para su transferencia a la paciente en día +5, bajo visión ecográfica.

Se apoyó la fase lútea con prostaglandina vaginal (Progeffik®) y a los 11 días tras la transferencia se comprobó una β-HCG positiva con un valor de 350 MU/ml.

Catorce días más tarde se realizó a la paciente una ecografía en la que se objetivó un embrión con LCF+.

DISCUSIÓN

El diagnóstico genético preimplantacional es una estrategia con 10 años de vida; la técnica se instauró para intentar dar una solución a las enfermedades ligadas al sexo y más tarde se extendió para la detección de múltiples trastornos genéticos y cromosómicos.

Se conoce que el 30% de los embriones derivados de las técnicas de reproducción asistida presentan anomalías cromosómicas asociadas¹.

Este porcentaje asciende hasta el 60% en los casos de mal pronóstico, como bajas respondedoras, pacientes añosas, fallos de implantación o pacientes con abortos de repetición.

Un porcentaje elevado de los embriones aneuploides no llegan al estadio de blastocito (75%), comparado con el 62% de los embriones euploides, que sí lo alcanza; esto sería una buena criba para esos embriones. Pero hay que tener en cuenta otro aspecto importante: no todas las anomalías cromosómicas detienen la evolución del embrión; de hecho es fácil encontrar trisomías con bastante frecuencia en embriones que alcanzan el estadio de blástula. Estos embriones podrían transferirse, aunque su tasa de implantación sería prácticamente nula². Para estos casos, sólo el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) diagnosticaría estas alteraciones y nos ayudaría a elevar la tasa de implantación.

Un cuadro donde las aneuploidías se dan muy frecuentemente son los abortos.

Si nos centramos en qué trastornos cromosómicos se dan con más frecuencia en los abortos espontáneos tenemos:

- El 27% de los casos son trisomías autosómicas y, por orden de frecuencia, en primer lugar del cromosoma 16, seguido del cromosoma 22 y del 21. En casos de abortos de repetición, recientemente se ha detectado que el cromosoma 15 es muy relevante³.

- El 10% son poliploidías.

- El 9% son monosomías del cromosoma X.

De tal forma, en estas circunstancias, para disminuir la tasa de abortos y la de los abortos de repetición, el DGP tendría un papel preponderante.

Comentaremos a continuación los casos donde la utilización del DGI es más controvertida.

En primer lugar tenemos su uso muy discutido en abortos de repetición.

Se sabe que casi el 70% de los abortos tempranos (antes de la sexta semana) presentan una alteración cromosómica.

En el caso de los abortos de repetición, la tasa de causa desconocida es casi del 50%⁴, pero en el 50% de estos casos también se encuentran alteraciones

cromosómicas, de tal modo el uso del DGP en estos casos estaría indicado para mejorar el pronóstico de estas parejas, aunque en contra de esta aseveración tenemos que el 70% de estos pacientes puede conseguir una gestación espontánea que llega a término sin el uso de ninguna técnica⁵.

Varios trabajos (no todos aleatorizados y prospectivos) se relacionan con ello; 2 de los estudios se han publicado en 2003, aunque no han establecido resultados definitivos por el escaso número de casos y porque no compararon a estas pacientes con abortos de repetición con un grupo control fiable (en las dos ocasiones se compararon con pacientes sometidas a DGP por enfermedades ligadas al sexo).

Del primer trabajo publicado en la revista *Fertility* sólo se puede obtener como resultado definitivo que la edad < 37 años es un factor de buen pronóstico (tasa de gestación evolutiva por transferencia del 29% en menores de 35 años comparado con el 5% en mayores de 35 años)⁶. En el segundo estudio, publicado también en 2003, se comparó a 71 pacientes con abortos de repetición con 28 pacientes con enfermedades ligadas al sexo; en el caso del primer grupo de los 67 ciclos realizados se derivó en una tasa de implantación del 28%, con una tasa de gestación del 34%, y en el grupo control la tasa de gestación fue del 29%. Un dato importante que se debe tener en cuenta es que de los 86 DGP realizados en pacientes con abortos de repetición, en un 22,1% no hubo embriones para transferir.

Uno de los pocos estudios prospectivos con un grupo control real, al que no se le realizó diagnóstico genético por tener abortos de repetición, fue publicado como *abstract* en 2004; en él, a 15 pacientes con esta patología se le realizó un DGP, con un resultado del 60% de tasa de gestación en comparación con 12 pacientes en que no se realizó la técnica con una tasa del 41%.

Plateau et al⁸ publicaron, en 2005, otro trabajo prospectivo pero de cohorte. En él se realizó esta técnica a 49 mujeres con abortos de repetición. En el subgrupo de mujeres menores de 37 años, se transfirieron 63 embriones normales euploides en 31 ciclos, realizados con una tasa de implantación del 17%; en el otro subgrupo de mayores de 37 años, esta tasa descendió al 2,7% (en este caso 37 embriones euploides se transfirieron en 18 ciclos).

A favor de esta técnica encontramos 2 estudios de Munné. El primero de ellos es del año 2005⁹. En

este estudio se demuestra que antes de aplicar la técnica la tasa de pérdidas fetales es del 87% (262/301), y después del diagnóstico preimplantacional, nos encontramos una tasa del 15,7%. En pacientes mayores de 35 años, la tasa esperada de pérdidas gestacionales sería del 44,5%, pero con DGP se reduciría al 12%; curiosamente, no se encuentran diferencias significativas en las tasas de gestación y de implantación entre pacientes añosas y jóvenes.

También a favor de esta técnica nos encontramos con un trabajo multicéntrico, retrospectivo y controlado con las limitaciones que esto conlleva, aunque situado en esta revisión por el gran número de pacientes¹⁰.

Este trabajo incluyó 2.279 ciclos de DGP. La tasa de gestación por ciclo es del 26,7%, la tasa de aborto fue del 14,5 % para las edades comprendidas entre los 35 y los 40 años y del 22,2% si ésta se encuentran por encima de los 40 años. Estas cifras, según los autores, están por encima de la media de la población de pacientes sometidas a FIV-ICSI (tabla 1).

El autor intenta explicar las discrepancias entre estos datos con los estudios anteriores, con resultados bastante peores, considerando de vital importancia el hecho de que no es necesario biopsiar 2 blastómeras del total (además, para ellos la media de blastómeras totales en el conjunto de embriones generales es de 6,8 y no de 8, como reconocen otros autores, en el día +3); por tanto, la tasa de implantación por ese motivo sería bastante mayor.

Es importante destacar que en este trabajo se diferencian 2 tipos de abortos; por un lado, los embrionarios (24%) y, por otro, los fetales (un 76%).

Otro artículo publicado por Rubio et al¹¹ en 2005 también aporta buenos resultados para el DGP, ya que de un total de 221 ciclos obtienen una tasa de gestación del 36,5%, con un porcentaje de embriones anómalos del 66,1%. Esto es semejante, según la autora, a los datos aportados por la ESHRE en 2002¹².

Otro aspecto muy controvertido es su utilización en fallos de implantación.

Se define como fallo de implantación a 3 o más intentos fallidos de FIV-ICSI, con una media de 10 o más embriones de buena calidad.

Gianarolli et al¹³, en 1999, no encontraron diferencias significativas con el uso del DGP en estos casos.

Tabla 1. Tasa de gestación interrumpida en pacientes sometidas a FIV-ICSI en relación con la presencia o ausencia de DGP o de abortos de repetición

	35-40 años (tasa abortos)	> 40 años (tasa abortos)
Población FIV	19%	40,6%
Población DGP	14,1%	22,2%
Con abortos de repetición	13,7%	
Sin abortos de repetición	14,5%	

DGP: diagnóstico genético preimplantacional; FIV: fertilización in vitro.

En un trabajo del año 2002, en el que se comparaba a pacientes con fallos de implantación con pacientes con enfermedades ligadas al sexo, se obtuvieron unos resultados semejantes con relación a la tasa de gestación y tasa de implantación (el 34%, el 19,8 frente al 33,3%, el 24,1%)¹⁴.

En el artículo antes referido, para el caso de los abortos de repetición, Rubio et al¹¹ analizaron 129 ciclos; por un lado, la tasa de embriones aneuploides era del 64%, con una tasa de gestación del 32,5%. Este resultado es mucho más elevado que la revisión aportada por la ESHRE. Debemos incidir en un dato importante: la tasa de embriones con alteraciones cromosómicas de tipo mosaico es muy elevado, de ahí la gran importancia que para estos autores tiene biopsiar 2 blastómeras en cada embrión, dato que ya se detectó en trabajos anteriores. Este detalle puede hacer (para estos especialistas) que los resultados se eleven bastante.

Es importante definir que la tasa de embriones aneuploides aumenta con el número de ciclos de FIV-ICS que no han dado resultado; esta tasa oscila del 40% en pacientes con 2 o más ciclos al 67% en los casos en que el fallo de los tratamientos realizados se da en 4 o más ocasiones.

Por último, como todo en estas técnicas, la edad de la paciente es de vital importancia. En un trabajo del año 2005¹⁵, se comprobó este hecho: la tasa de gestación e implantación en pacientes mayores de 40 años fue escasa.

Como tercer apartado tenemos la ventaja que podría aportar en el factor masculino severo.

Desde hace algunos años, se observan varios hechos importantes. Por un lado, que los espermatozoi-

420 des con alteraciones severas en su número y morfología presentan con gran frecuencia defectos cromosómicos importantes¹⁶. En segundo lugar, que las parejas que presentan un factor masculino severo, que necesitaron realizar una ICSI con espermatozoides de testículo extraídos mediante biopsia testicular (tesa), presentaban una alta tasa de embriones aneuploides^{17,18}. De tal forma, el DGP podría tener su utilidad en estas parejas y podría diagnosticarse un gran número de anomalías cromosómicas, principalmente en los cromosomas sexuales (esto es más relevante en casos de oligozoospermia severa o en azoospermia). De todos modos, aunque hay algún trabajo que intenta demostrar la eficacia del DGP para estos casos, no está demostrada su utilidad. A favor de su uso encontramos 2 artículos firmados por el mismo autor, uno en 2004¹⁹ y otro, más reciente, de 2006²⁰, en que, con 59 pacientes con alteraciones seminales severas, se describe que en estos casos las alteraciones cromosómicas, tanto en los espermatozoides como en los embriones resultantes, son muy frecuentes (el 50 y el 34%, respectivamente).

Otro artículo escrito por Rubio et al, del grupo IVI, también demuestra la gran incidencia de aneuploidías en los embriones procedentes de los varones con azoospermia, tanto obstructiva (59%) como no obstructiva (69,7%). En estos ciclos es conveniente remarcar la alta tasa de mosaicismo y defectos en los cromosomas sexuales. Comparándolo con los controles, las tasas de gestación y de implantación fueron similares, pero en las no obstructivas la fre-

cuencia de abortos era muy superior (el 25 frente al 8,3%) a los mismos controles. Al realizar DGP, un 52,9% de los embriones biopsiados tenían alteraciones, y al final, tras la técnica, la tasa de gestación se situó en un 52%, con una implantación del 38,3%. La tasa de abortos fue similar a los controles.

Por último, se discute su indicación para mejorar la tasa de embarazo en pacientes de edad avanzada.

En pacientes añosas, la tasa de cromosopatías asciende al 60-70%; si a esto le añadimos que la eficacia de la valoración morfológica de los embriones se reduce bastante con la edad de la paciente, el DGP mejoraría en gran medida el pronóstico de este grupo de población de edad elevada. En un reciente metaanálisis no se encontraron diferencias significativas en relación con la tasa de niño en casa, embarazo evolutivo (11-15%, 15-22%) y aborto por el uso de DGP en pacientes con más de 35 años²¹.

Este metaanálisis también demuestra que la tasa de embarazo múltiple fue menor en los ciclos con diagnóstico preimplantacional, aunque esto no es muy significativo, ya que el número de embriones transferidos en los controles fue mayor.

Otro dato observado en estas pacientes es que presentar al menos un embrión euploide en un ciclo anterior es uno de los factores pronósticos más importantes para el éxito de los ciclos con DGP. Las pacientes con más de 37 años sin embriones euploides presentan una tasa de gestación del 8%, comparado con un 30% en casos de presentar uno o dos embriones euploides en ciclos anteriores²².

BIBLIOGRAFÍA

1. Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M, Munne S. Chromosome abnormalities in 1225 cleavage stage human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2000;1:17-26.
2. Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendia P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:497-506.
3. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriages: a case-control study. *Hum Reprod*. 2002;17:446-51.
4. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Human Reprod Update*. 2002;8:463-81.
5. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Human Reprod*. 1997;12:387-9.
6. Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Mareello E, Hill D, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2003;80:467-8.
7. Werlin L, Rodi I, De Cherney A, Mareello E, Hill D, Munne S. PGD as beneficial tool in women with recurrent pregnancy loss and advanced maternal age. [Abstract P-299]. En: Programs and abstract of the 60th Annual Conference of the ASRM. Philadelphia: 2004;S241.
8. Platteau P, Staessen C, Michielis A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetics diagnosis for

- aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005;83:393-7.
9. Munne S, Chen S, Fisher J, Colls P, Zheng X, Steven J, et al. Preimplantation genetics diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005;28:331-5.
 10. Munné S, Fisher J, Warne A, Chen S, Zouves C, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril*. 2006;85:326-32.
 11. Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu A, Buendía P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *RBM*. 2005;11:497-506.
 12. ESHRE PGD Consortium Steering Committee 2002: data collection III. *Human Reprod*. 2002;17:233-46.
 13. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti J. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patient undergoing in vitro fertilization with poor prognosis. Identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril*. 1999;72:837-42.
 14. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohí J, Simon C. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online*. 2002;6:232-7.
 15. Taranissi M, El-Touhky T, Verlinsky Y. Influence of maternal age on the outcome of PGD for aneuploidy screening in patients with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 2005;10:628-32.
 16. Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, et al. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod*. 2005;20:2140-52.
 17. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Iammarrone E. Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically determined male infertility. *J Endocrinol Invest*. 2000;23:711-6.
 18. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I, et al. Comparison of aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non obstructive azoospermic men. *Human Reprod*. 2004;19:1570-4.
 19. Kahraman S, Sertyel S, Findikli N, Kumtepe Y, Oncu N, Melil S, et al. Effect of PGD on implantation and ongoing pregnancy rates in cases with predominantly macrocephalic spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:79-85.
 20. Kahraman S, Findikli N, Biricik A, Oncu N, Ogur C, Sertyel S, et al. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:752-61.
 21. Twisk M, Mastenbroek S, Van Wely M, Heineman MJ, Van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. [Review]. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;25:CD005291.
 22. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. *Fertil Steril*. 2005;84:319-24.