

Artículo

Estudiantil

Diagnóstico Genético Preimplantación

Laura del Pilar Cadena ¹
Norma Cecilia Serrano ²
María Carolina Páez Leal ³

RESUMEN

Las técnicas de diagnóstico preimplantación representan una alternativa del diagnóstico prenatal, logrando establecer alteraciones genéticas en los preembriones antes de ser implantados en el útero materno. Para su aplicación requieren de la combinación de programas de reproducción asistida y biología molecular, y es lo bastante sensible y segura, lo que permite detectar un número considerable de patologías genéticas frecuentes.

Palabras clave:

Diagnóstico Preimplantación, Biopsia de Blastómera, Biopsia de Cuerpo Polar, FISH (Hibridización *in situ* por fluorescencia), PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

INTRODUCCIÓN

Cuando se realiza diagnóstico prenatal a través de las técnicas convencionales como amniocentesis, cordocentesis y biopsia de vellosidades coriónicas, la pareja se ve enfrentada al dilema de qué hacer, si el resultado de dicho procedimiento confirma una alteración genética. El diagnóstico preimplantación (DPI), ha traído como beneficio el lograr establecer la condición genética del preembrión antes de que este sea implantado en el útero materno, y de esta manera evitar una interrupción voluntaria de la gestación en curso.

Esta nueva técnica combina los conocimientos que se tienen sobre los procedimientos de reproducción asistida, como la fertilización *in vitro*

¹ Estudiante IV Semestre. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Bucaramanga.

² MD MSc Genética Humana. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Bucaramanga.

³ Estudiante VII Semestre. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Bucaramanga.

Correspondencia: e-mail: lapca@usa.net

(IVF) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), con técnicas de biología molecular como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Hibridización in situ (FISH), utilizando como sustrato, el material genético de una sola blastómera o del primer y segundo cuerpo polar.

El presente artículo busca revisar las indicaciones, beneficios y desventajas del diagnóstico preimplantación.

ANTECEDENTES

La idea del diagnóstico preimplantación no es nueva, desde 1967 Bob Edwards logró con éxito el sexage de preembriones de conejo en estado de blastocisto, que posteriormente fueron implantados lográndose la gestación ¹.

A partir de aquí se comenzó a escribir la historia del DPI y en ella se encuentra una fecha relevante para nuestro país que fue 1994, año en el que se presentó en Colombia el primer embarazo obtenido tras diagnóstico preimplantacional. Se realizó el diagnóstico determinando la presencia o no de la mutación y el sexo de los preembriones, en una pareja cuya mujer era portadora de hemofilia A, y el resultado fue el nacimiento de un niño sano ².

El éxito del DPI, está basado en la combinación de las técnicas de reproducción asistida, IVF e ICSI con técnicas de biología molecular, PCR y FISH. Después de la fertilización in vitro, el cigoto humano hace una división aproximadamente cada 24 horas, se compacta hasta llegar al estado de mórula, y continúa su división hasta alcanzar el estado de blastocisto, entre 5 a 6 días posteriores a la fertilización ³. Para el DPI se requiere la remoción de una o dos células de este preembrión en desarrollo, aunque también puede ser analizado el primer y segundo cuerpo polar ⁴. Sin embargo el optar por biopsiar el preembrión u oocito depende de la información genética que se esté buscando.

BIOPSIA DE CUERPO POLAR

La biopsia de cuerpo polar limita la información sólo a defectos genéticos heredados por vía materna ³, reduciendo considerablemente el número de preembriones que puedan ser transferidos como resultado de un posible *crossing-over* entre cromosomas homólogos. La probabilidad de que ocurra un *crossover* entre un gen y el centromero, depende de la distancia que exista entre ellos, por lo tanto en parejas heterocigotas para un gen recesivo telomérico, la mitad de los cuerpos polares analizados podrán ser heterocigotos como resultado de *cossing-over*. Una cuarta parte podría ser homocigotos para el gen normal, y solo una cuarta parte podrían tener la posibilidad de ser transferidos ⁴.

La información genética del cuerpo polar obtenido a través de la biopsia puede ser analizada de dos formas, primero a través de sondas que reconozcan específicamente cada uno de los cromosomas (FISH), con el fin de detectar aneuploidias, como trisomías 13, 18 y 21 ⁵. Segundo, para análisis de defectos de gen simple, amplificando el gen afectado a través de PCR.

Dado que es desconocido el significado biológico que tienen el primer y el segundo cuerpo polar para el desarrollo pre y postimplantación del preembrión, se hace necesario la observación de cambios desarrollados por el oocito al cual se le ha removido el primer o segundo cuerpo polar. En este tipo de oocitos se observó que no había, disminución en las tasas de fertilización, diferencias en la proporción de clivajes, ni aumento en el porcentaje de preembriones con poliespermia, y cerca del 60% de los preembriones productos de oocitos con remoción del cuerpo polar se desarrollaron hasta el estado de blastocisto, porcentaje similar a los oocitos no manipulados. Por lo tanto se puede establecer que la biopsia de cuerpo polar no altera el desarrollo del preembrión ⁶⁻⁸.

BIOPSIA DE BLASTÓMERA

Posterior a la fertilización in vitro, el preembrión en estado de clivaje puede ser biopsiado removiendo una o dos de sus blastómeras para estudio genético. De la misma manera como se había analizado para el cuerpo polar, se puede obtener información de la condición citogenética del preembrión a través del FISH, y descartar aneuploidias frecuentes como la 13, 18, y 21, o entrar a analizar defectos monogénicos a través de PCR.

La primera aplicación clínica de esta técnica de DPI, se describió en 1991 ⁹, amplificando secuencias específicas del cromosoma Y por PCR, para determinar el sexo de los embriones obtenidos a partir de parejas con riesgo de enfermedades ligadas al cromosoma X. En estos ensayos solo los embriones femeninos fueron transferidos. Sin embargo debido a los errores en el diagnóstico del sexo, ésta técnica ha venido siendo reemplazado por el FISH, la cual con mayor precisión determina la presencia o ausencia del cromosoma Y.

Queda aparentemente resuelto el problema para determinar el sexo de preembrión, y la utilización del PCR se encamina a determinar alteraciones monogénicas, teniendo como inconveniente los falsos diagnósticos por contaminación del DNA de espermatozoides que quedan pegados a las blastómeras, esto es resuelto utilizando el ICSI para la fertilización y no el IVF. El DPI se enfrenta a otro problema técnico, la desaparición de alelos, por ejemplo la no amplificación de uno de los dos alelos en una sola célula heterocigota, lo que hace bastante probable los falsos diagnósticos especialmente en enfermedades autosómicas recesivas, donde los padres

son portadores de mutaciones diferentes, tal como ha sido reportado para el diagnóstico de Fibrosis Quística a través de biopsia de blastómera ^{10,11}.

INDICACIONES

Dada la complejidad de procedimiento, tiene indicaciones precisas y no debe ser entendido, ni utilizado como una prueba de tamizaje genético prenatal. Va dirigido aquellas parejas con un riesgo relativamente elevado (25% o 50%) de tener descendencia afectada por anomalías genéticas y que reúne uno o ambos de los siguientes criterios:

- Mujeres mayores de 35 años que se encuentran en programas de reproducción asistida, como Fertilización in vitro (IVF) o ICSI, por problemas de fertilidad. En este grupo se busca descartar alteraciones citogenéticas del preembrión a través de FISH.
- Padres portadores de alteraciones monogénicas, o de alteraciones cromosómicas, previamente estudiadas.

Para el diagnóstico de alteraciones monogénicas por PCR, es necesario conocer el gen implicado en dicho defecto, sus mutaciones y los primers que amplifican la región del gen a estudiar. Por lo tanto, no es suficiente el antecedente del defecto genético diagnosticado por clínica para lograr incluir a la pareja en un programa de DPI, es obligatorio el conocimiento del gen implicado. Esto limita el diagnóstico, por el momento, a unas pocas patologías como se relaciona en la Tabla 1. Limitación que se irá solucionando poco a poco con el desarrollo del Proyecto del Genoma Humano.

METODOLOGÍA

El procedimiento para el diagnóstico preimplantación se fundamenta en dos etapas específicas, la primera de ellas es la biopsia de cuerpo polar o de la blastómera, y la segunda se basa en las técnicas de biología molecular para el análisis del material genético obtenido.

Biopsia de blastómera o del cuerpo polar. Esta técnica descrita por Handyside a los inicios de los noventa ^{11,12}, consiste en la biopsia de una o dos células del preembrión en estadio de ocho blastómeras, o del primer o segundo cuerpo polar del oocito.

La obtención de la blastómera o del cuerpo polar puede lograrse a través de tres técnicas, la aspiración, la expulsión y la división mecánica ¹³⁻¹⁵. Siendo la aspiración la más utilizada actualmente, debido a su fácil aplicación y rapidez. La aspiración y la expulsión son utilizadas para obtener blastómeras y cuerpo polar, mientras que la técnica de expulsión sólo es utilizada para la biopsia de blastómera ¹⁶.

a) Aspiración. Esta técnica consiste en la remoción de una célula por medio de succión ayudada con una micropipeta. Para tal fin, debe romperse la zona pelúcida ya sea usando aguja o un de ácido, el más utilizado es el ácido tiroideo que tiene un pH de 2,5 ¹⁷. Para la aspiración se utilizan dos pipetas, una de agarre y la otra que contenga el ácido tiroideo con la cual se aspira la blastómera. Esta técnica ha demostrado ser más rápida y su confiabilidad se compara con la técnica convencional donde se utilizan tres pipetas ^{18, 19} (Fig. 1).

Tabla 1. Alteraciones genéticas reconocidas actualmente por Diagnóstico Preimplantación.

ENFERMEDAD	UBICACIÓN DEL GEN IMPLICADO	CARACTERÍSTICA DE LA ALTERACIÓN
Fibrosis Quística	7q31	Autosómica recesivo
B-Thalasemia	11p15	Autosómica recesivo
Síndrome de Tay-Sachs	15q23-q24	Autosómica recesivo
Neurofibromatosis	17q11.2	Autosómica dominante
Enfermedad de Huntington	4p16	Autosómica dominante
Síndrome de Turner	Carencia del segundo cromosoma sexual (45 X0)	Aneuploidia
Síndrome de X frágil	Xq27.3	Recesiva ligada a X
Hemofilia A	Xq28	Recesiva ligada a X
Síndrome de Lesch-Nyhan	Xq26	Recesiva ligada a X
Poliposis Coli Adenomatosa	17p13	Autosómica dominante
Síndrome de Klinefelter	Aparición de un tercer cromosoma sexual (47 XXY)	Aneuploidia
Epidermiosis ampollar distrófica	3p21	Autosómica dominante
Anemia Falciforme	11 B6A3	Autosómica recesivo
Síndrome de Marfan	15q21	Autosómica dominante
Retinitis Pigmentaria	3q21-q24	Autosómica dominante o recesivo o ligada a X
Distrofia Muscular de Duchenne	Xp21	Recesiva ligada a X
Síndrome de Down	Presencia de un tercer cromosoma 21	Aneuploidia
Síndrome de Edwards	Presencia de un tercer cromosoma 18	Aneuploidia
Síndrome de Patau	Presencia de un tercer cromosoma 13	Aneuploidia

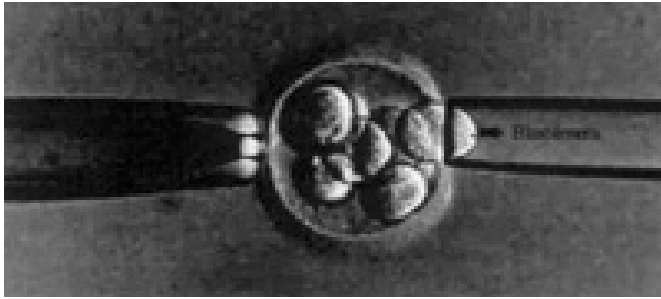


Figura 1. Procedimiento de aspiración de blastómera ¹⁹.

b) *Expulsión*. Para la realización de este procedimiento se han descrito tres maneras diferentes, mutuamente excluyentes, las cuales no han demostrado ventajas aparentes la una respecto a la otra.

1. Se utiliza una pipeta biselada para perforar la zona pelúcida en dos puntos; por uno de ellos se agrega solución salina, buscando producir un flujo que desplace una blastómera hasta el agujero libre para que salga por él. Se debe tener en cuenta que el ángulo y la presión del flujo sean exactos previniendo la alteración de las blastómeras que quedan y evitando que salgan más de las necesarias.
2. Con ayuda del ácido tiroideo se perfora la zona pelúcida y después se remueve la blastómera con una microaguja, realizando movimientos como si se estuviera cosiendo.
3. Al igual que en las dos anteriores se requiere una incisión de la zona pelúcida, ya sea con disección o ayuda de ácidos; luego la blastómera es expulsada haciendo presión con una aguja desde afuera (Fig. 2).

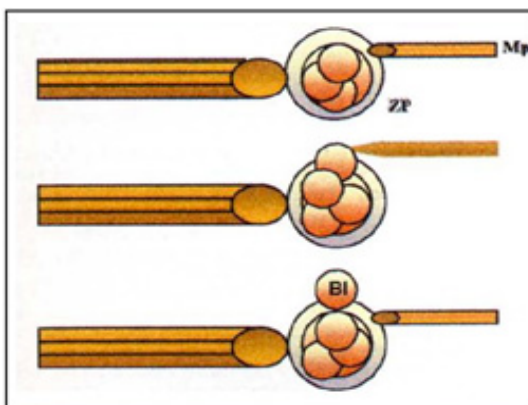


Figura 2. Técnica de Expulsión. En ella se especifican las tres maneras de hacerlo. ZP (Zona Pelúcida), BI (Blastómera) y Mp (Micropipeta).

c) *División Mecánica*. Esta técnica utiliza una microhojilla que corta la zona pelúcida, posteriormente con una pipeta de Pasteur se separan y extraen las blastómeras necesarias para la evaluación (Fig. 3). ²⁰

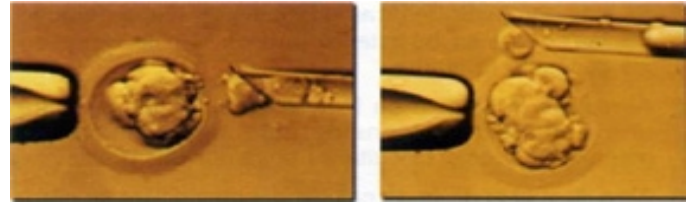


Figura 3. Técnica de División Mecánica ²⁰.

Técnicas de Biología Molecular. El trabajar con preembriones requiere de resultados rápidos. Para el buen desarrollo del estudio se ha estandarizado que la toma de la biopsia se realice en la mañana, a las 60 horas de la fertilización, serán luego remitidas las muestras al laboratorio para proceder al estudio molecular, FISH o PCR, según sea el caso, con el fin obtener el resultado en la tarde, y proceder a efectuar la implantación en el útero materno.

a) *Hibridación in Situ por Fluorescencia (FISH)*. Esta técnica permite la observación de los cromosomas a través de sondas marcadas que visualizan las secuencias complementarias a ellas. El FISH permite el reconocimiento de un cromosoma, partes de este y translocaciones entre ellos ²¹.

Esta metodología puede aplicarse en núcleos interfásicos o en metafase. Es la más eficiente para detectar aneuploidias, o también los alelos del gen en estudio, independiente de si se expresan o no en esa etapa de la división celular, ya que en los comienzos del clivaje del preembrión solo se manifiestan los genes maternos ²².

b) *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. La PCR se ha convertido actualmente en una herramienta útil para la detección de mutaciones específicas, ya que permite obtener múltiples copias de una secuencia de DNA a partir de una única copia, obteniendo la cantidad de DNA necesario para ser visualizado en una electroforesis ²³.

Una vez obtenidos los resultados de la condición genética de los preembriones estudiados, se establece a través de criterios morfológicos la viabilidad de éstos y se escogerán los que finalmente serán transferidos al útero materno; esta decisión deberá ser tomada por la pareja.

La tasa de embarazo por transferencia embrionaria después del diagnóstico es igual a la tasa por fertilización in vitro con preembriones no manipulados, cuyo valor es de aproximadamente del 30% ²⁴.

VENTAJAS

Relacionadas con el estadio del preembrión al tomar la biopsia.

1. Es más apropiado realizar la biopsia en etapa de ocho células porque en los estados previos sólo se expresan los genes de la madre.
2. Al realizar la biopsia en fase de dos células se sufre una pérdida muy considerable de la masa del preembrión y esto dificulta su posterior desarrollo¹⁶.
3. Al realizar el análisis de células del blastocisto se corre el riesgo de estudiar no células pluripotenciales sino diferenciadas, cosa que no ocurre en estados previos donde las células expresan todos sus genes.
4. Cuando se desea reconfirmar la anomalía detectada, es más favorable haber realizado la biopsia del primer cuerpo polar porque nos da un tiempo más prolongado para hacer una segunda biopsia, de una blastómera.

Relacionadas con la técnica de biología molecular

1. Al utilizar el FISH se puede determinar un amplio número de aneuploidias con una sola blastómera, pues se pueden estudiar a la vez cerca de 6 cromosomas y su sensibilidad varía entre 88% y 96%,²².
2. La sensibilidad para detectar una alteración monogénica por medio de PCR, oscila entre el 89.5% y el 96%, para cualquiera de los dos tipos de muestra tomadas^{25,26}.

CONCLUSIONES

El diagnóstico preimplantación, en la actualidad es la única opción real de conocer la condición genética del preembrión antes de ser implantado en el útero materno. La información genética se limita a la constitución cromosómica, logrando reconocer las aneuploidias más frecuentes, 13, 18, 21, translocaciones balanceadas que porten los padres, y por otro lado permite el reconocimiento de alteraciones monogénicas como consecuencia de genes mutados, y de los cuales ya se tiene información.

Es una técnica sensible y segura que permite detectar un número considerable de patologías frecuentes y de un alto grado de compromiso sistémico, ampliando las opciones de una pareja con riesgos para concebir hijos afectados

El futuro del diagnóstico preimplantación está ligado a los avances en el Proyecto del Genoma Humano, en la medida en que se amplió el conocimiento sobre el mapa genético humano, se tendrá una mayor probabilidad de diagnosticar las diferentes patologías genéticas. De igual forma su aplicación esta asociada a los progresos en DNA recombinante, encaminados en un futuro al desarrollo de la terapia génica del embrión previa a su implantación.

AGRADECIMIENTOS

Manifestamos nuestra gratitud a la Dra. Carolina Lucena y al Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES) por su valioso aporte para la elaboración

de este artículo. Igualmente a las alumnas Mayerlyn Ortega y Patricia Vides por su colaboración en el trabajo del Seminario, base del presente artículo.

SUMMARY

The diagnosis technique for pre-implantation represent an alternative of the prenatal diagnosis, allowing to establishes genetic alterations in the preembryo before implanted in the maternal uterus. To apply this thecnique requires the combination of assisted reproduction and molecular biology. The sensitivity and safety of this technique allow to detect a wide number of frequent genetic pathologies.

Key words: Preimplantation diagnosis, blastomere biopsy, polar body biopsy, FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), PCR (Polymerase Chain reaction).

REFERENCIAS

1. Edwards RD, Gardner RL. Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature* 1967;214:576-7.
2. Lucena E, Lizcano-Gil L, Lucena A, y col. Programa de Análisis genético de blastómeras antes de la implantación (B.A.B.I.). Cecolfes, Santafé de Bogotá, 1999.
3. Edwar RG, Hollands P. New advances in human embryology: implications of the preimplantation diagnosis of genetic disease. *Hum Reprod* 1988;3:549-56.
4. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990;5:826-46.
5. Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GH, Pieters MH, Winston RM. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation (FISH). *Hum Mol Genet* 1993;2:1183-5.
6. Verlinky Y, Cieslak J, Freidine M, et col. Pregnancies following preconception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in situ hybridization. *Hum Reprod* 1995;10:1923-7.
7. Verlinsky Y, Cieslk J, Freidime M, et al. Polar body diagnosis of common aneuploidies. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:157-62.
8. Verlinsky Y, Cieslk J, Ivakhnenko V et al. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body FISH analysis. *Fertil Steril* 1996;66:126-9.
9. Handyside AH, Kontogianni IEH, Hardy K, Winston RML. Pregnacies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:770-86.
10. Grifo JA, Tang YX, Munné S., et al. Healthy deliveries from biopsied human embryos. *Hum Reprod* 1994;9:912-6.
11. Harper JC, Handyside AH. The current status of preimplantation diagnosis. *Curr Obstet Gynecol* 1994;4:143-9.
12. Dealhanty J, Harper J. Genetic diagnosis before. *BMJ* 1997;315:828-9
13. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, et al. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990;5:826-9.
14. Nijs M, Camus M, Van Steirteghem A. Evaluation of different biopsy methods of blastomeres from 2-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1988;3:999-1003.
15. Krzyminska U, Lutjen J, O'Neill C. Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. *Hum Reprod* 1990;5:203-8.
16. Tarin J, Handyside A. Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril* 1993;59(5):943-50
17. Gibbons W., Gittlin S., Lanzendorf S., et al. Preimplantation genetic diagnosis for Tay Sachs disease: successful pregnancy after preembryo biopsy and gene amplification by polymerase chain reaction. *Fertil Steril* 1995;63(4):723-8
18. Chen S, Chao K, Ming Y, et al. The simplified two pipette technique is more efficient than the conventional three-pipette method for blastomere biopsy in human embryos. *Fertil Steril* 1998;69(3):569-74
19. www.nejm.org/content/1994/0331/0018/1200.asp
20. www.cecolfes.com
21. Góngora J, Bernal J. Fibras ADN e Hibridación *in situ* Fluorescente de alta resolución. *Médicas UIS* 1999;13(4):220-5
22. Liu J, Tsai Y-L, Zheng X-Z, et al. Potencial use of repeated fluorescence in situ hybridization in the same human blastomere for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 1998;70(4):729-33.
23. Mullis KB. Reacción en cadena de la polimerasa. *Investigación y Ciencia* 1984:30-7
24. Diagnóstico preimplante. En: Seminario "Fertilidad y reproducción". OMS, Chipre, Noviembre 17-20, 1994
25. Liu J, Lissens W, Devroey P, et al. Efficiency of polimerase chain reaction assay for cystic fibrosis in single human blastomeres according to the presence or absence of nuclei. *Fertil Steril* 1993;59(4):815-9.
26. Sermon K, Lissens W, Devroey P, et al. Amplification of exon 11 of the gene for the a-chain of B-N-acetilhexosaminidase in single human blastomeres. *Fertil Steril* 1995;63(2):407-9.