



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

**Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)**

Grado en Biotecnología

2014-2015

Valencia, 01/09/2015

**Diagnóstico genético preimplantacional:
Revisión de la metodología y de las
aplicaciones clínicas actuales.**

Autora: Cristina M^a Carmona Serrano

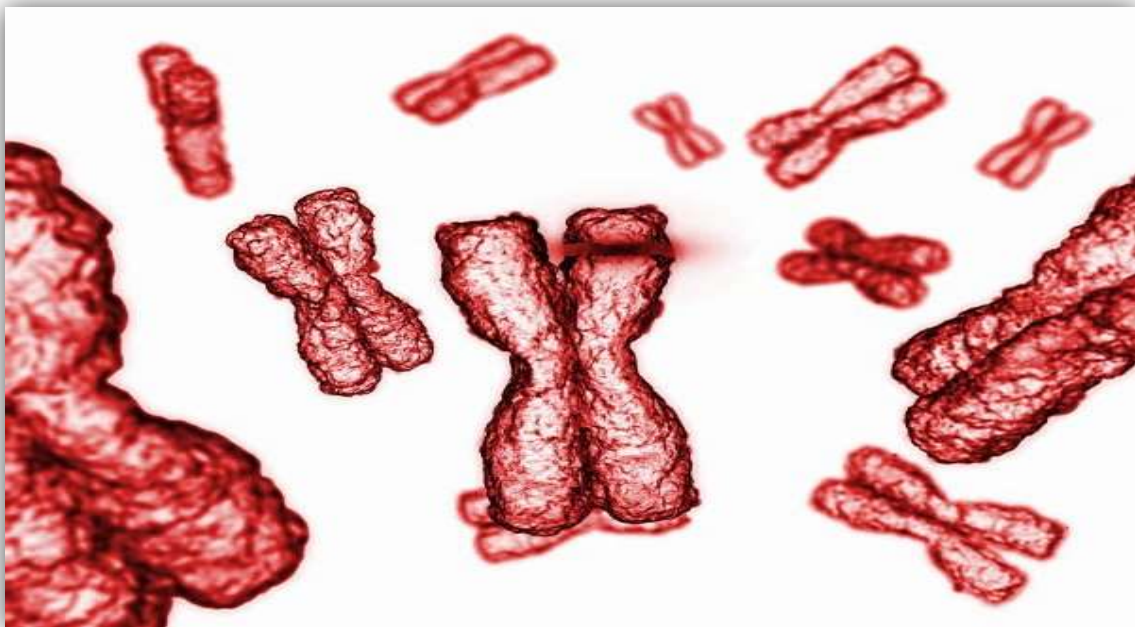
Directora: Inmaculada Molina Botella

Tutora UPV: Inmaculada Molina Botella

Diagnóstico genético preimplantacional: Revisión de la metodología y de las aplicaciones clínicas actuales.

Cristina M^a Carmona Serrano

Valencia, Septiembre de 2015



PALABRAS CLAVE: Diagnóstico genético preimplantacional, Reproducción asistida, Biopsia de blastómeros, Embrión, FISH, PCR, CGH.

RESUMEN:

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es una forma de diagnóstico temprano que se desarrolló gracias a la aparición de las técnicas de reproducción asistida que hoy conocemos como la Fecundación In Vitro (FIV) y la Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Este diagnóstico nos permite de forma precoz detectar mediante estudios genéticos enfermedades monogénicas, anomalías cromosomales así como determinar el sexo de los embriones antes de transferirlos al útero y por tanto antes de que se produzca la implantación. Por lo tanto, el objetivo generalmente será seleccionar aquellos embriones sanos evitando la transmisión de enfermedades genéticas y hereditarias así como los síndromes de predisposición al cáncer.

Los primeros casos de embarazo fueron publicados en 1990 y se dieron en parejas con enfermedades hereditarias ligadas al sexo. Actualmente, las principales indicaciones del DGP

son los casos de enfermedades hereditarias relacionadas con alteraciones cromosómicas o bien con mutaciones genéticas y también para seleccionar un embrión sano y HLA (Antígenos de histocompatibilidad) compatible en los casos de DGP con fines terapéuticos a terceros.

Todos los datos relativos a las enfermedades estudiadas y a los resultados obtenidos en Europa son recopilados en el registro de la European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) que publica periódicamente las tasas de gestación obtenidas así como la fiabilidad de las distintas metodologías utilizadas.

El DGP se ha desarrollado en estos últimos años gracias a la combinación de la biología molecular con las nuevas técnicas de reproducción asistida. Las dos técnicas más utilizadas para el DGP son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación in situ fluorescente (FISH), aunque recientemente se están desarrollando las metodologías de CGH-array que permiten mejorar la eficiencia de los análisis genéticos.

La metodología más utilizada para la realización del DGP es el análisis genético de los blastómeros obtenidos de embriones en día 3 de desarrollo. El procedimiento consiste en retirar 1 o 2 blastómeros a través de un orificio realizado en la zona pelúcida. A continuación, se procede a analizar genéticamente estas células por diferentes técnicas (PCR o FISH). Según los resultados de este análisis se seleccionarán aquellos embriones no afectados y se transferirán al útero materno. Recientemente se están analizando también las células del trofoectodermo de blastocistos en días 5 y 6 de desarrollo.

Como conclusión, el DGP proporciona una opción que anteriormente no existía para aquellas parejas que desean tener su propia descendencia y además quieren prevenir el riesgo de tener un hijo afectado por cualquier enfermedad detectable mediante DGP o bien para otras aplicaciones como HLA-typing, con fines terapéuticos a terceros.

Tutora UPV: Prof. Dña. Inmaculada Molina Botella

ÍNDICE:

- 1. INTRODUCCIÓN: ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL DGP. Pág. 10-14.**
- 2. OBJETIVOS. Pág. 14.**
- 3. MATERIAL Y MÉTODOS. Pág. 14-15.**
- 4. INDICACIONES PARA EL DGP. Pág. 15-24.**
 - 4.1. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS. Pág. 15-17.
 - 4.1.1. Anomalías cromosómicas numéricas. Pág. 15-16.
 - 4.1.2. Anomalías cromosómicas estructurales. Pág. 16-17.
 - 4.2. ENFERMEDADES LIGADAS A CROMOSOMAS SEXUALES. Pág. 17-18.
 - 4.3. ENFERMEDADES MONOGÉNICAS. Pág. 18-23.
 - 4.3.1. Dominante. Pág. 19.
 - 4.3.2. Recesiva. Pág. 19.
 - 4.3.3. Cánceres hereditarios. Pág. 19-22.
 - 4.3.3.1. Clasificación de los cánceres hereditarios según su tipo de herencia. Pág. 20-21.
 - 4.3.3.1.1. Cánceres hereditarios dominantes. Pág. 20.
 - 4.3.3.1.2. Cánceres hereditarios recesivos. Pág. 20-21.
 - 4.3.3.2. Clasificación de los cánceres hereditarios según su penetrancia y edad de aparición. Pág. 21-22.
 - 4.3.3.2.1. Síndromes graves de alta penetrancia y de posible aparición temprana. Pág. 21-22.
 - 4.3.3.2.2. Síndromes que requieren la valoración caso a caso para un DGP. Pág. 22.
 - 4.3.4. Enfermedades genéticas de aparición tardía. Pág. 22-23.
 - 4.4. CON FINES TERAPÉUTICOS A TERCEROS. Pág. 23-24.
- 5. METODOLOGÍA/PROCEDIMIENTOS DEL DGP. Pág. 24-31.**
 - 5.1. FIV-ICSI. Pág. 24.
 - 5.2. BIOPSIA EMBRIONARIA. GENERALIDADES. OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO PARA EL ANÁLISIS. Pág.25-27.
 - 5.2.1. Biopsia del corpúsculo polar. Pág. 25.
 - 5.2.2. Biopsia de blastómeros. Pág. 25-26.
 - 5.2.3. Biopsia de blastocisto. Pág. 26-27.
 - 5.3. PERFORACIÓN ZONA PELÚCIDA. Pág. 27-30.
 - 5.3.1. Método mecánico. Pág. 27.
 - 5.3.2. Método químico. Pág. 27-28.
 - 5.3.3. Láser. Pág. 28-30.
 - 5.3.3.1. Contacto directo. Pág. 29.
 - 5.3.3.2. Sin contacto. Pág. 29-30.

5.4. BIOPSIA DE EMBRIÓN DÍA 3. Pág. 30-31.

6. ANÁLISIS GENÉTICO. Pág. 32-44.

6.1. PREPARACIÓN DE LOS BLASTÓMEROS. Pág. 32-34.

6.1.1. Fijación de blastómeros para hibridación in situ fluorescente (FISH). Pág. 32-33.

6.1.2. Entubado de blastómeros para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y CGH. Pág. 33-34.

6.2. TESTS CITOGENÉTICOS. Pág. 34-43.

6.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Pág. 35-36.

6.2.2. Hibridación in situ fluorescente (FISH). Pág. 36-40.

6.2.3. Array de hibridación genómica comparada (CGH). Pág. 40-42.

6.2.4 Otros abordajes. Pág. 43-44.

7. DISCUSIÓN. Pág. 44-45.

8. CONCLUSIÓN. Pág. 46.

9. BIBLIOGRAFÍA. Pág. 46-50.

10. ANEXOS. Pág. 50.

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1 Procedimiento para un DGP.

Figura 2 Dotación cromosómica humana.

Figura 3. FISH.

Figura 4. Translocación.

Figura 5. Patrón de herencia ligado a X.

Figura 6. Procedimiento DGP con fines terapéuticos a terceros.

Figura 7. Pasos biopsia blastómeros. Laboratorio de diagnóstico preimplantacional.

Figura 8. Biopsia método químico. Laboratorio de diagnóstico preimplantacional.

Figura 9. Biopsia embrionaria con perforación de la zona pelúcida mediante ácido Tyrodes.

Figura 10. Placa para biopsia embrionaria con láser.

Figura 11. Sistema láser.

Figura 12. Biopsia con láser.

Figura 13. Biopsia embrionaria.

Figura 14. Aspiración de blastómeros.

Figura 15. Comparación de las diferentes biopsias.

Figura 16. Información sobre el procesado de blastómeros.

Figura 17. Fijación de blastómeros para FISH.

Figura 18. Fijación blastómeros para FISH.

Figura 19. Calidad de los núcleos para una buena fijación.

Figura 20. Entubado de blastómeros para PCR.

Figura 21. Manipulación del blastómero en el *Tubing*.

Figura 22. DGP en atrofia muscular espinal (SMA).

Figura 23. FISH de blastómeros para los cromosomas sexuales.

Figura 24. Translocaciones robertsonianas.

Figura 25. Translocaciones recíprocas.

Figura 26. Esquema del protocolo de arrays de CGH para el estudio de aneuploidías de 24 cromosomas sobre blastómeros.

Figura 27. Interpretación de array CGH sobre blastómeros.

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Enfermedades ligadas al cromosoma X más relevantes.

Tabla 2. Enfermedades monogénicas dominantes más graves.

Tabla 3. Enfermedades monogénicas recesivas más graves.

Tabla 4. Cánceres hereditarios dominantes.

Tabla 5. Cánceres hereditarios recesivos.

Tabla 6. Cronología de un ciclo FIV con DGP.

ABREVIACIONES.

aCGH: Array de Hibridación Genómica Comparada.

ADO: Fenómeno de Pérdida Alélica.

APC: *Adenomatous Poliposis Coli*.

BACs: Cromosoma Artificial Bacteriano.

BSA: Suero Albúmina Bovina.

CEP: Secuencias Centroméricas.

CGH: *Comparative genomic hybridization*.

CMTF: Carcinoma Medular de Tiroides Familiar.

CP: Corpúsculo Polar.

DGP: Diagnóstico Genético Preimplantacional.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

dNTP: Desoxirribonucleótido.

DOP-PCR: *Degenerate Oligonucleotide Primed PCR*.

ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embriology*.

FAP: Síndrome Familiar de Poliposis Adenomatosa Coli.

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*.

FIV: Fecundación In Vitro.

FSH: Hormona folículoestimulante.

HLA: Antígenos de Histocompatibilidad. *Human Leukocyte Antigen*.

HOC: Hiperestimulación Ovárica Controlada.

HSA: *Human Serum Albumin*.

ICSI: Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides.

IVI: Instituto Valenciano de Infertilidad.

LH: Hormona Luteinizante.

LSI: Secuencias Específicas de Locus.

MDA: *Multiple Displacement Amplification*.

MEN 2A: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2A.

MEN 2B: Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2B.

NGS: *Next Generation System*.

PAF: Poliposis Adenomatosa.

PCF: Poliposis Colónica Familiar.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*.

PRE-PCR: *Primer Extension Pre-Amplification*.

PZD: Disección Parcial de Zona.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*.

STR: Repeticiones Polimórficas Cortas en Tándem.

TEL: Secuencias Subteloméricas.

TIFF: *Tagged Image File Format*.

VHL: Síndrome de Von Hippel-Lindau.

WGA: *Whole Genome Amplification*.

ZP: Zona Pelúcida.

FÓRMULACIÓN QUÍMICA:

Ca²⁺: Calcio.

HCl: Ácido clorhídrico.

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*.

KCl: Cloruro de potasio.

Mg²⁺: Magnesio.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

MOPS: *3-(N-morpholino) propanesulfonic acid*.

UNIDADES DE MEDIDA:

Kb: Kilobase.

Mb: Megabase.

μl: Microlitros.

μm : Micrómetros.

ml: Mililitros.

M: Molar.

ng: Nanogramos.

Pb: Pares de bases.

pg: Picogramos.

1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL DGP.

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se presenta como una forma muy precoz de diagnóstico prenatal que utilizando las nuevas técnicas de reproducción asistida (Inyección Intracitoplasmática y Fecundación *In Vitro*) hace posible el estudio genético en los embriones antes de ser transferidos al útero y por tanto antes de su implantación.

El DGP implica el análisis cromosómico o genético del material biológico que procede de un embrión obtenido por técnicas de fecundación *in vitro* (FIV), estos test genéticos posibilitan el poder detectar tanto enfermedades monogénicas como anomalías cromosómicas. El objetivo principal de este diagnóstico temprano es seleccionar aquellos embriones libres de carga genética asociada a determinadas enfermedades hereditarias.

Los primeros intentos de diagnóstico genético preimplantacional en embriones humanos ocurrían alrededor de los años 80, cuando se desarrolló la técnica de la PCR. Sin embargo, los primeros embarazos fueron publicados en 1990 y se trataba de parejas con enfermedades de herencia ligada a los cromosomas sexuales, en las cuales la identificación del sexo embrionario se realizó mediante la amplificación de una secuencia de DNA específica del cromosoma Y. Es en este año pues, cuando el DGP se introduce como una alternativa posible al diagnóstico genético prenatal (DP) pensado para aquellas parejas con riesgo de transmitir un defecto genético particularmente severo, evitando la decisión de interrumpir el embarazo. Los avances en la biología molecular y en las técnicas de FIV están permitiendo perfeccionar el DGP. (LÓPEZ-PEDRAZA et al., 2012).

Desde que en 1990 se publicaron los primeros casos de niños nacidos tras un DGP, la *European Society for Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), a través de su consorcio de DGP, ha ido recopilando año tras año, los resultados y la evolución de 12.397 ciclos que han dado lugar a 2.027 recién nacidos hasta Octubre de 2005. La primera recopilación de datos de este grupo incluyó un total de 392 ciclos de DGP realizados hasta septiembre de 1998 y la publicación en 2010 recoge un total de 6160 ciclos de DGP realizados en 2009 en 60 centros adscritos, lo que refleja un aumento en el número de parejas que se someten a un tratamiento de este tipo.

En el ámbito nacional, el departamento de Biología Celular de la Universidad Autónoma de Barcelona fue pionero en este campo, concretamente en los estudios citogenéticos mediante la utilización de la FISH. La primera publicación de un embarazo conseguido en España mediante DGP fue realizada de forma conjunta por este grupo y el Instituto Dexeus en 1994, en una pareja en la que la mujer era portadora de hemofilia y en la actualidad la aplicación de esta técnica se va extendiendo a otros centros en diversas comunidades autónomas.

Por otro lado, la incorporación de la técnica de PCR para el estudio de mutaciones concretas en enfermedades monogénicas, ofreció la posibilidad de poder detectar más patologías, algunos ejemplos de ello, el diagnóstico de fibrosis quística realizado por primera vez en España por el Hospital La Fe de Valencia en colaboración con el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) en 2000; la enfermedad de Huntington en 2001 por el equipo de reproducción de la Fundación Jiménez Díaz... y así se fueron incorporando equipos como *Reprogenetics* en el 2003, Centro de Medicina Embrionaria en el 2004, Sistemas Genómicos en 2005... Además debido al desarrollo de la técnica de DGP para nuevas enfermedades hereditarias es, hoy en día, posible su aplicación para cualquier enfermedad monogénica estudiada y de la cual se sabe el gen causante de la alteración. (BICK and LAU, 2006).

La mayor limitación del DGP es su baja eficiencia, ya que solo el 20-30% de las mujeres que se someten a DGP llegan a conseguir gestación.

Se distinguen dos conceptos importantes dentro de lo que llamamos diagnóstico genético preimplantacional:

– En primer lugar el **DGP** (Diagnóstico Genético Preimplantacional), es un diagnóstico del genotipo del embrión respecto a la presencia o no del alelo causante de una enfermedad genética o de una alteración cromosómica presente en alguno de los progenitores.

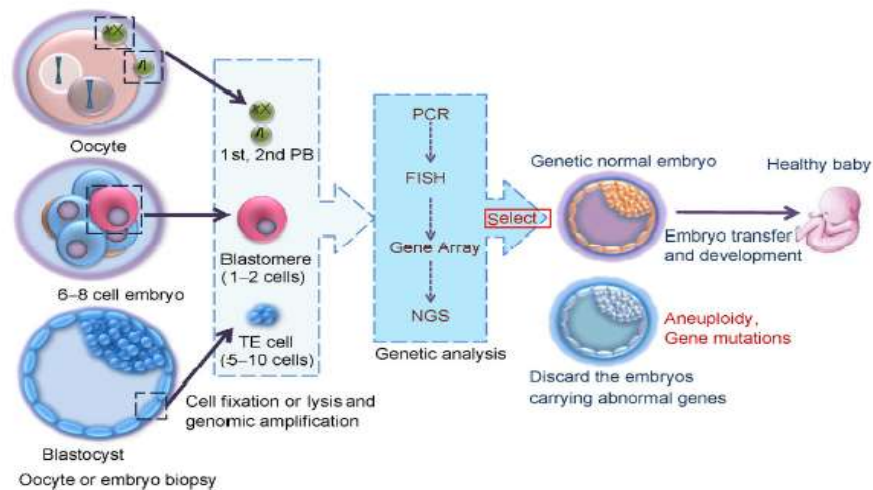


Figura 1. Procedimiento para un DGP. Fuente: YAN, L.Y.; WEI, Y.; HUANG, J.; ZHU, X.H.; SHI, X.D.; XIA, X.; YAN, J.; LU, C.L.; LIAN, Y.; LI, R.; LIU, P. & QIAO, J., 2014. *Advances in preimplantation genetic diagnosis/screening. Sci. China Life Sci.*, Vol.57, No.7, 665-671.

– En segundo lugar tenemos el **SGP** (*Screening* Genético Preimplantacional), en este caso se trata de una selección de aquellos embriones que son cromosómicamente normales de todos aquellos embriones que se obtienen en un ciclo de FIV-ICSI. A diferencia del DGP, en este caso no existe alteración cromosómica conocida de los progenitores. Por lo tanto, en la presente revisión se omitirán los estudios relativos al *screening* de aneuploidías o SGP. (LÓPEZ-PEDRAZA et al., 2012).

El DGP detecta enfermedades genéticas que son trastornos que afectan a uno o más genes. Los genes son los ladrillos de la herencia. Se heredan y se transmiten de padres a hijos. Los genes codifican proteínas que son las encargadas de realizar la mayor parte de las funciones celulares. Cuando se produce una mutación en un gen o varios genes, el resultado afecta directamente a las proteínas codificadas por estos genes, como consecuencia, las proteínas no realizan su función o bien, la realizan incorrectamente, pudiendo derivar en una enfermedad genética. Tenemos varios tipos de enfermedades genéticas detectables mediante DGP, en esta revisión nos centraremos en las enfermedades monogénicas y cromosómicas. (GÓMEZ, 2002).

Las **enfermedades monogénicas** son aquellas enfermedades causadas por la mutación de un solo gen y se clasifican en:

- **Enfermedades autosómicas dominantes.** Se producen debido a la alteración de un gen incluido en uno de los 22 pares de cromosomas autosomas (cromosomas del 1 al 22). Puede dar un fenotipo clínico visible si por lo menos uno de los dos alelos del mismo gen se ve alterado. Lo trasmite uno de los dos padres. Algunos ejemplos son la Distrofia miotónica, la Enfermedad de Huntington o la enfermedad De Charcot-Marie-Tooth tipo 1.

- **Enfermedades autosómicas recesivas.** Estas enfermedades, debidas también a mutaciones en un gen ubicado en un autosoma, aparecen solamente en una condición, cuando ambos alelos del gen están mutados. Esto presupone que los dos padres del individuo afectado son portadores del gen defectuoso. Incluyen entre otras la Fibrosis Quística, B-Talasemia y Atrofia muscular espinal.
- **Enfermedades ligadas al cromosoma X.** Como su nombre indica, son producidas por mutaciones en algún gen localizado en el cromosoma sexual X. Incluyen: Síndrome de X frágil, Distrofia muscular de Duchene-Becker y Hemofilia.

Las **enfermedades cromosómicas** son enfermedades relacionadas a las alteraciones o anomalías de los cromosomas y se pueden clasificar en:

- Alteraciones en el número de cromosomas también llamadas aneuploidías.
- Alteraciones en la estructura del cromosoma (translocaciones, deleciones, inversiones, reestructuraciones complejas). (GÓMEZ, 2002).

Así mismo, podemos aplicar el DGP a la detección del sexo del embrión, o bien para seleccionar embriones HLA compatibles con fines terapéuticos a terceros o también en la detección de cánceres hereditarios y enfermedades genéticas de aparición tardía.

Para detectar una de estas posibles enfermedades genéticas u alteración cromosómica se procede a analizar el genotipo del embrión mediante DGP. Esta metodología consiste básicamente en la realización de una Fecundación in vitro o Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV/ICSI) seguido de un cultivo de los embriones obtenidos in vitro hasta el día 3 de desarrollo. En este estadio los embriones presentan entre 6 y 8 células. El DGP implica en primer lugar la realización de la biopsia de una o dos blastómeros (que son células embrionarias indiferenciadas resultantes de la segmentación del cigoto después de la fecundación) de cada embrión y posterior realización del análisis genético de los blastómeros de todos los embriones biopsiados mediante la utilizando distintos test genéticos (FISH, la PCR y la CGH). Aquellos embriones que sean diagnosticados como sanos serán los elegidos para ser transferidos al útero materno en día 4 o 5 de desarrollo en estadio de mórula o blastocisto. (LEMER and URBINA, 2008).

Otra posible opción consiste en la biopsia de blastocisto a los 5 o 6 días de la inseminación. En un blastocisto tenemos zonas ya diferenciadas, principalmente el trofoectodermo que formará posteriormente la placenta y la masa interna celular que participará en la formación del embrión.

En general, se utilizan **tres tipos de test genéticos**, el primero, la **FISH** (Hibridación Fluorescente In Situ) se aplica para la identificación de alteraciones cromosómicas (numéricas o estructurales) o para la selección de sexo en el caso de enfermedades ligadas al sexo. Se basa principalmente en la complementariedad de las bases del DNA y la capacidad de las cadenas del mismo de unirse a "sondas", las cuales son pequeños fragmentos de DNA complementarios a las regiones cromosómicas que quieren estudiarse y que se han marcado con un colorante fluorescente. Estas sondas se adherirán específicamente a los cromosomas que se busca identificar, de modo que la visualización de dicha fluorescencia en una muestra estudiada, implicará la presencia de la alteración cromosómica buscada, mientras que su ausencia significará la ausencia de la transmisión de la enfermedad. (KANAVAKIS and TRAEGER-SYNODINOS, 2002).

La **PCR** (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se utiliza generalmente para la identificación de enfermedades monogénicas, enfermedades de aparición tardía, cánceres

hereditarios y para la búsqueda de complementación de HLA. Es un procedimiento para sintetizar in vitro grandes cantidades de una región determinada del DNA, en nuestro caso, de la región que contiene el gen mutado causante de la enfermedad, produciéndose una amplificación exponencial del producto de PCR tras varios ciclos.

En ambas técnicas, se encuentra la posibilidad de que se dé una condición llamada mosaicismo en el embrión (presencia de 2 líneas celulares con distintos genotipos o cariotipos resultado de un error en la división celular muy temprano en el desarrollo fetal), por lo que existe la posibilidad de encontrar blastómeros cromosómicamente normales y anormales en un mismo embrión. Esto puede afectar a los resultados de los estudios genéticos, en los que se analicen 2 blastómeros sanos pero haya uno no incluido en los seleccionados para analizar genéticamente que presente la alteración cromosómica o mutación, dándose así un diagnóstico erróneo. (STEFFANN et al., 2014).

Por último, y más novedosa, la técnica **CGH** (hibridación genómica comparada) que consiste en comparar el DNA de una célula a evaluar, con el contenido de DNA de un control normal. Este método permite la detección de alteraciones del material genético estudiado y ha ido sustituyendo poco a poco a la FISH.

Algunas de las diferencias del CGH con la FISH son que en la CGH no se necesita definir a priori qué cromosomas se quieren evaluar, porque se evalúa la totalidad del DNA de la célula; mientras que en el FISH la evaluación es parcial, dado que se tienen que elegir las sondas de los cromosomas específicos a estudiar, los que se determinan de acuerdo a los antecedentes familiares o el diagnóstico realizado en la pareja. La técnica de CGH requiere de mayor tiempo de procesamiento lo cual determina que sólo se realice en casos específicos para diagnósticos embrionarios preimplantatorios.

Sin embargo, con los arrays CGH no se podrán diagnosticar aquellas alteraciones que no supongan una pérdida o una ganancia neta de material genómico tales como: las mutaciones puntuales, los reordenamientos equilibrados (translocaciones recíprocas, robertsonianas, inversiones y/o las inserciones balanceadas), mosaicismos.... Sin embargo, en lo que respecta a los reordenamientos equilibrados y a los mosaicismos bajos, se ha calculado que tan solo alrededor de un 1% de estas alteraciones cursan finalmente en patología. Además se debe tener en cuenta que podrían encontrarse mínimas alteraciones fuera de las regiones escrutadas por las sondas del kit, las cuales no serán detectadas salvo que se varíe la resolución. (ERCOLI et al., 2009).

Se han desarrollado otros abordajes nuevos conforme se ha ido desarrollado la biología molecular, así el uso de una PCR Multiplex en DGP, que posee las ventajas de un protocolo tan general basado en marcadores que se pueden aplicar a familias afectadas por la misma enfermedad, independientemente de las mutaciones que presente, evitando tener que diseñar un protocolo para cada caso, siempre que la familia sea informativa para el marcador estudiado. Otra ventaja es que cuando los marcadores se sitúen a ambos lados de la mutación, se detectarán recombinaciones, aumentando la fiabilidad del diagnóstico. (THORNHILL and SNOW, 2002).

Otra incorporación novedosa en el diagnóstico con DGP es la amplificación de todo el genoma gracias a la tecnología de *Whole Genome Amplification* (WGA) que permite amplificar el genoma entero de una célula hasta 1000 veces, lo que posee ciertas ventajas cuando se quiere amplificar diversas secuencias con *primers* incompatibles en PCR Multiplex, también hay otras técnicas como la MDA (Multiple Displacement Amplification) que produce DNA de buena calidad. También encontramos recientemente otros métodos como Real Time PCR, PCR Multiplex fluorescente, utilización de Microarrays o con el desarrollo de las nuevas tecnologías

de secuenciación el uso de *Next Generation Sequencing* para el diagnóstico de DGP. (TAN et al., 2014).

En resumen, el DGP proporciona una opción para aquellas parejas que desean tener su propia descendencia y además quieren prevenir el riesgo de tener un hijo afectado por cualquier enfermedad detectable mediante DGP u para otras aplicaciones como *HLA-typing*. A su vez, el DGP plantea nuevas cuestiones sobre si surgirán con el tiempo problemas en los niños a los cuales se les realizó este diagnóstico genético.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica será la **recopilación de toda aquella información actualizada sobre el diagnóstico genético preimplantacional (DGP)** disponible en los diferentes medios de difusión de información y fuentes bibliográficas, revisando el estado de la técnica y sus aplicaciones en clínica.

Así mismo, se tratará de realizar una breve introducción sobre el tema en la cual se describa el estado actual del DGP en Europa y sus antecedentes. A continuación, se hablará sobre el grueso del trabajo, comenzando por explicar las principales indicaciones del DGP, siguiendo con la metodología o procedimientos más corrientes empleados en esta técnica de diagnóstico y finalmente describiendo los diferentes tests genéticos que se utilizan para la detección de las diferentes enfermedades hereditarias en los embriones.

Por último, se culminará el trabajo añadiendo una breve discusión y conclusión sobre el tema tratado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La elaboración de esta revisión se ha basado en la búsqueda de **material bibliográfico** relacionado con aspectos técnicos y clínicos del diagnóstico genético preimplantacional (DGP).

Ha resultado imprescindible la recopilación y clasificación de toda la información sobre metodología, procedimientos y aplicaciones en materia de reproducción asistida y diagnóstico genético preimplantacional. Junto con la recopilación estructurada de artículos científicos, revisiones y otros recursos bibliográficos se ha realizado un estudio profundo del estado del arte, los procedimientos y aplicaciones sobre este tipo de diagnóstico genético realizado previo a la implantación del embrión en el útero materno, con la necesidad de obtener los embriones mediante técnicas de reproducción asistida. Por ello, también será necesario conocer las diferentes técnicas y procedimientos en el laboratorio de reproducción asistida dedicado al DGP. Toda esta recopilación de información se ha realizado utilizando diferentes bases de datos disponibles en red que sirven como herramienta necesaria para realizar una búsqueda precisa y actualizada del tema a estudiar.

Los recursos bibliográficos facilitados por el IVI tanto en formato papel como electrónico han un apoyo fundamental para la realización de esta revisión. También mencionar que ha sido de gran importancia la utilización del portal de difusión Dialnet como fuente de artículos y libros de interés y la obtención de literatura médica de las bases de datos Pubmed y Medline con la selección de artículos mediante las palabras clave <DGP>, <PGD>, <Diagnóstico genético preimplantacional>, <Preimplantation genetic diagnosis>, <Genetic diagnosis with in vitro fertilization>, <Biopsy methods>, <PCR and DGP>, <FISH and DGP>, <CGH and DGP>, <Indications for DGP>, <PGD procedures> y <NGS and DGP> y publicados entre el año 1986-2015.

Se seleccionaron unos 57 artículos científicos, revistas, publicaciones y revisiones sobre el DGP o relacionado con este. Además de apoyarse en la consulta de unas 9 páginas webs. Estos artículos y revisiones serán fundamentales para la estructuración y el desarrollo de este trabajo.

Por otro lado, los conocimientos adquiridos durante el Grado han sido imprescindibles para la elaboración de este trabajo, especialmente en lo referido a las materias impartidas *Biotecnología de la reproducción y Genética molecular*.

Siguiendo estos métodos, se ha obtenido una revisión del tema bien estructurada y con información actualizada así como una serie de conclusiones que se exponen en el apartado correspondiente, y que servirán como material de apoyo para la comunidad científica.

4. INDICACIONES PARA EL DGP.

El diagnóstico genético preimplantacional es el diagnóstico tanto de alteraciones genéticas como cromosómicas (aneuploidías, poliploidías...) en los embriones que se obtienen mediante las diferentes técnicas de reproducción asistida (FIV, ICSI) y cuyo objetivo principal es seleccionar e identificar aquellos embriones no afectados para su posterior transferencia e implantación en el útero materno.

Se realiza en pacientes que presentan alto riesgo de transmitir a la descendencia enfermedades genéticas tanto monogénicas como cromosómicas. Recientemente se ha extendido su utilización a los cánceres hereditarios y con fines terapéuticos a terceros.

4.1. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.

4.1.1. Anomalías cromosómicas numéricas.

En primer lugar el DGP aplicado a la detección de **anomalías cromosómicas numéricas** o **aneuploidías**, en este caso, se estudiará la dotación o número de cromosomas que tiene el embrión mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). Generalmente se estudian nueve cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y) esto permite detectar el 85% de las aneuploidías, muy utilizado para PGS. También se puede estudiar con CGH-array que detecta variaciones en el número de cromosomas de la muestra analizada. El objetivo de este diagnóstico será pues, seleccionar aquellos embriones con un número correcto de cromosomas (la dotación cromosómica normal de la especie humana es de 46, XX para las mujeres y de 46, XY para los varones). Constituyen las alteraciones genéticas más frecuentes de la población en general. Su incidencia se incrementa con el aumento de la edad materna. (BREZINA and KUTTEH, 2014).

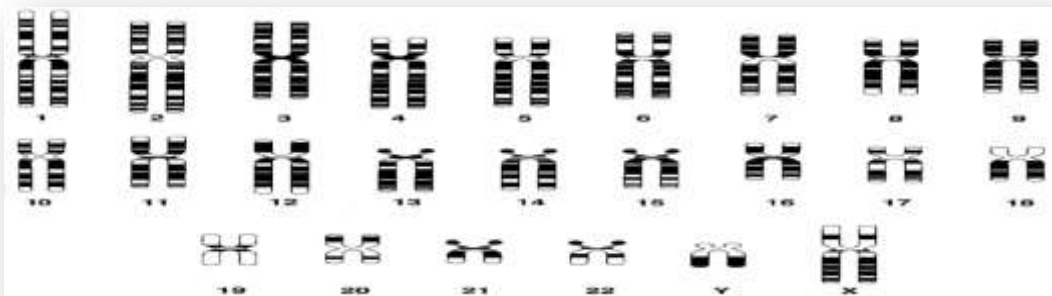


Figura 2. Dotación cromosómica humana. Fuente: Blog de genética de la UCM. <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/cariotipo/carioP.htm>

Las enfermedades más frecuentes que son causadas por este tipo de alteraciones son: Síndrome de Down (Trisomía del cromosoma 21), Síndrome de Edwards (Trisomía del cromosoma 18), Síndrome de Patau (Trisomía del cromosoma 13).

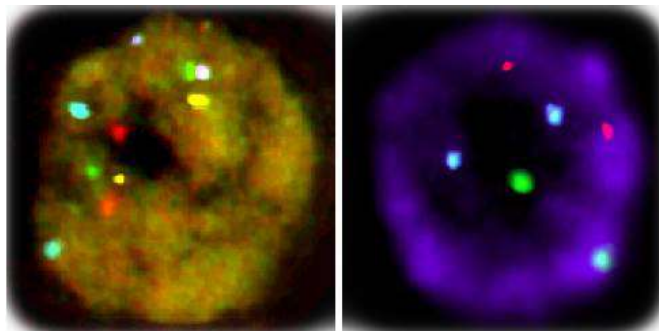


Figura 3. FISH. Fuente: CIALAB, 2014. Diagnóstico prenatal. Alicante, España, visto el 3 de Mayo de 2015. <http://www.cialab.com/diagnosticoPrenatal.php>

4.1.2. Anomalías cromosómicas estructurales.

Por otro lado tenemos el DGP para el estudio de **anomalías cromosómicas estructurales** tales como translocaciones, inversiones, deleciones... indicado para parejas en los que alguno de los dos porta anomalías cromosómicas en el cariotipo. Se seleccionarán por lo tanto aquellos embriones sanos o equilibrados para la anomalía cromosómica estudiada. Utilizando también FISH de esta manera distinguimos entre embriones con translocaciones desequilibradas, y normales o equilibrados. También se puede realizar por CGH-array. (BREZINA and KUTTEH, 2014).

Estas anomalías se producen cuando el material de un cromosoma se rompe y se reordena de forma que esta reordenación puede implicar un aumento o pérdida de material cromosómico. Los reordenamientos cromosómicos suelen ocurrir en el 0,2% de la población de recién nacidos, siendo mucho más frecuentes entre los hombres infértiles y las parejas que experimentan repetidos fallos de implantación (2,5%) y abortos recurrentes (9,2%). A continuación, se explican los cambios estructurales que pueden sufrir los cromosomas:

- **Translocaciones cromosómicas:** es un cambio en la estructura del cromosoma, por el cual fragmentos de diferentes cromosomas se intercambian. Un individuo con una translocación no es afecto si no hay pérdida o ganancia de material, o bien, si la rotura del cromosoma no afecta a ningún gen, en estos casos la translocación se considera “equilibrada”. En el caso contrario, será considerada como “desequilibrada” y será la que tratemos de detectar y descartar el embrión que posea esta alteración.
- **Translocaciones recíprocas:** se da cuando dos fragmentos terminales de dos cromosomas diferentes (no homólogos) se rompen e intercambian posiciones, lo que puede conducir a embarazo de fetos con anomalías. Los portadores de estas translocaciones tienen pocas probabilidades de producir gametos normales o equilibrados y la proporción de formas desequilibradas pueden variar de un 23% a un 81%. Para detectar translocaciones recíprocas se aplica un FISH en metafase usando sondas teloméricas y centroméricas, de manera que la ausencia de una señal del telómero indica que existe una translocación, indistinguible con un FISH en interfase.



Figura 4. Translocación. Fuente: INVITRA. ONLINE FERTILITY MAGAZINE, 2014. *Genetic disorders and PGD*, España, visto el 15 de Abril de 2015. <http://www.invitra.com/genetic-disorders-and-pgd/>.

- **Translocaciones robertsonianas:** es un tipo de reordenamiento que ocurre exclusivamente entre los cromosomas con un brazo corto pequeño (13, 14, 21, 22 y 15), denominados acrocéntricos. En este tipo de alteración estructural, los brazos cortos de los cromosomas se pierden y los brazos largos se unen en este punto, sin embargo, como los brazos cortos de estos cromosomas no contienen información genética relevante, esta alteración se considera “equilibrada” y sin consecuencias médicas para esta persona.
- **Deleciones:** se dan cuando una parte del cromosoma se ha perdido o eliminado. Las deleciones pueden ocurrir en cualquier punto de cualquier cromosoma y pueden variar en longitud. Como es evidente, la gravedad de la patología sufrida dependerá de la longitud y posición en la que se ha dado la deleción, así como si afecta a un gen que cumple una función importante para el organismo.
- **Duplicaciones:** en este caso se observa una duplicación de del material de parte de un cromosoma, resultando en un exceso de información
- **Inserciones:** este tipo de alteración implica que una parte de material de un cromosoma se ha insertado en una posición inusual dentro del mismo cromosoma o en un cromosoma diferente. Cuando se produce como consecuencia pérdida o ganancia de material genético puede derivar en alguna patología.
- **Inversiones:** implica que parte del cromosoma ha sufrido un giro, de forma que la secuencia estará parcialmente invertida, en la mayoría de los casos no provoca problemas de salud. Para que se produzca este suceso es necesario una doble rotura y un doble giro de 180º del segmento formado por las roturas. Hay dos tipos de inversiones según su relación con el centrómero:
 - **Pericéntricas:** Incluyen al centrómero. Se detectan fácilmente al microscopio óptico pues implican un cambio en la forma del cromosoma.
 - **Paracéntricas:** No incluyen al centrómero y por tanto tampoco afectan a la forma del cromosoma.

Estas aberraciones en las cuales no se aumenta ni se pierde material genético se denominan “equilibradas”. Sin embargo, el embrión resultante tiene mayor riesgo de heredar una aberración “no equilibrada” dependiendo del tipo de aberración cromosómica que posean los progenitores. Las aberraciones “no equilibradas” resultan en fallos en el embarazo y serios efectos en la salud del niño después del nacimiento. Generalmente, están presentes en menos del 1% de los adultos fenotípicamente normales y son detectadas en uno de los progenitores en el 2-5% de las parejas con abortos recurrentes. (GÓMEZ, 2002).

4.2. ENFERMEDADES LIGADAS A CROMOSOMAS SEXUALES.

Otra indicación de DGP es para la **selección del sexo del embrión** y que en el caso de enfermedades genéticas graves recesivas ligadas al cromosoma X, se utilizan para seleccionar embriones hembras portadoras o sanas, pero nunca varones que en un 50% de los casos padecerán la enfermedad. Por lo tanto, podemos identificar los cromosomas sexuales X e Y y

así determinar el sexo de los embriones en enfermedades ligadas al sexo (más de 300 enfermedades). Hay muchas enfermedades ligadas al cromosoma X pero las más conocidas son:

Tabla 1. Enfermedades ligadas al cromosoma X más relevantes.

Hemofilia
Distrofia muscular de Duchenne.
Síndrome de X frágil.
Síndrome de Lesch-Nyham.
Síndrome de Hunter (mucopolisacaridosis tipo II).
Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X.
Síndrome de Bruton (agammaglobulinemia ligada al cromosoma X).
Síndrome de Fabry.
S. Alport
Incontinencia Pigmenti
Déficit OrnitinTranscarbamilasa
Enfermedad de Norrie
Mucopolisacaridosis II y IIIA

Este diagnóstico es útil ya que distinguiendo los embriones varones (XY) de las hembras (XX) y transfiriendo sólo embriones hembra, se evita que el embrión se vea afectado por este tipo de enfermedades ligadas al sexo. (BICK and LAU, 2006).

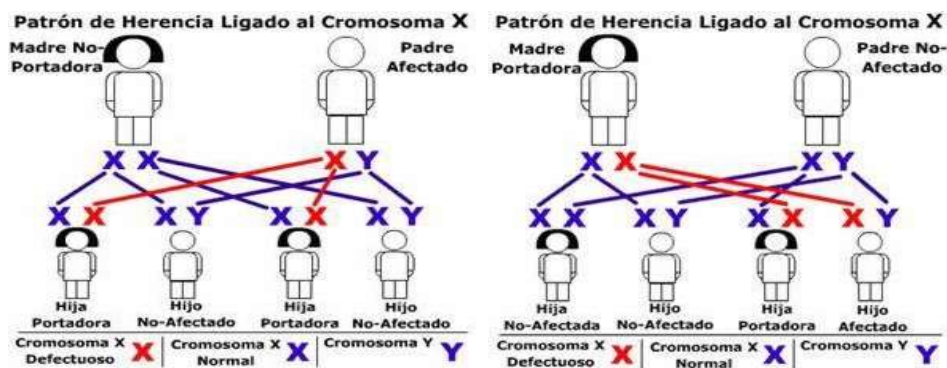


Figura 5. Patrón de herencia ligado a X. Fuente: -PROFESOR EN LÍNEA, 2006. Herencia ligada al sexo, España, visto el 14 de Abril de 2015. http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Herencia_ligada_sex.html

Lo mismo pasa en el caso de enfermedades ligadas a Y donde sólo los varones padecerán la enfermedad. Por lo tanto, un varón afectado transmitirá la enfermedad a todos sus hijos, pero a ninguna de sus hijas. Este tipo de herencia es muy poco frecuente. Los diagnósticos se pueden realizar mediante FISH o CGH-array. (BREZINA and KUTTEH, 2014).

4.3. ENFERMEDADES MONOGÉNICAS.

Por último, se aplica el DGP para el estudio de **enfermedades genéticas monogénicas**, para cuando uno de los dos miembros de la pareja es portador de una enfermedad grave hereditaria monogénica causada por una mutación conocida. Por ejemplo: fibrosis quística, distrofia muscular, síndrome X frágil, esclerosis tuberosa, poliquistosis renal, talasemias, distrofia miotónica de Steinert...Actualmente pueden diagnosticarse más de 90 enfermedades monogénicas (incluyendo los síndromes de cáncer hereditarios), este listado está abierto y se incorporan nuevas enfermedades (**Anexo 1**). La técnica más conocida para este tipo de diagnóstico es la PCR. Cabe añadir que las enfermedades monogénicas pueden ser dominantes o recesivas:

4.3.1. Dominante: en estos casos con que el embrión reciba un gen defectuoso de sus progenitores heredará la enfermedad. Son fáciles de predecir ya que cada niño afectado tendrá un padre afectado por esta misma enfermedad. Cuando uno de los padres está afectado, el hijo tiene un 50% de probabilidades de heredar la enfermedad. (GIRARDET and CLAUSTRES, 2001).

Las más graves son las siguientes:

Tabla 2. Enfermedades monogénicas dominantes más graves.

Síndrome de Marfan
Neurofibromatosis tipo 1.
Acondroplasia
Charcot_Marie-Tooth
Polineuropatía amiloide
Huntington
Distrofia miotónica tipo 1
Poliposis adenomatosa
Epidermolisis Bullosa
Poliquistosis renal dominante

4.3.2. Recesiva: en estos casos se requieren dos copias del gen afectado (materna y paterna) para que el embrión herede la enfermedad con una probabilidad del 25%. Aquellos que hereden solo una copia serán portadores de la enfermedad pero no enfermos. Sólo pocos síndromes raros obedecen al modelo hereditario recesivo, y en una pequeña proporción de casos las mutaciones aparecen de “novo”, y se transmiten posteriormente a la descendencia. (GIRARDET and CLAUSTRES, 2001).

Las más graves son:

Tabla 3. Enfermedades monogénicas recesivas más graves.

Tay-Sach
Beta talasemia
Fibrosis quística
Atrofia muscular espinal
Anemia falciforme
Poliquistosis renal recesiva

4.3.3. Cánceres hereditarios.

Gracias al avance en el conocimiento del Genoma humano y en los mecanismos genéticos asociados a la aparición de tumores malignos, se puede explicar la causa del desarrollo de determinados cánceres agrupados en una misma familia.

Aproximadamente un 5-10% de todos los cánceres son hereditarios. En estos casos, el individuo portador posee una mutación en la línea germinal que le predispone a sufrir una mayor susceptibilidad para desarrollar un tumor determinado y además, poder transmitir dicha mutación a su descendencia.

Aplicar el DGP para la identificación de mutaciones que predisponen a sufrir **cánceres hereditarios de alta penetrancia** es de vital importancia, generalmente indicado para parejas con cierto riesgo a padecerlas, o con antecedentes familiares. Por lo tanto, una identificación, de manera precoz, de este grupo de personas de alto riesgo permite que sean atendidas de forma específica, aquellas familias donde se identifica la causa genética de la predisposición a tumores pueden ser candidatas a ser incluidas en procesos de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP). (SILVESTRE OLTRA, 2010).

Se conocen más de 50 tipos de síndromes de cáncer familiar (**Anexo 1**), en los que se pueden incluir tanto síndromes que predisponen únicamente a cáncer y otros síndromes con cuadros clínicos complejos con predisposición a algún tipo de tumor. Además, dentro de estos síndromes, la penetrancia puede ser desde casi el 100% (penetrancia completa) hasta muy baja. La edad de aparición es variable, pudiendo ser de aparición temprana o más tardía. La gravedad de los tumores también varía.

Como en el resto de patologías de origen genético, es necesaria la valoración de las características de la enfermedad (penetrancia, expresividad, gravedad, edad de aparición, existencia de tratamientos curativos, etc.) antes de la autorización de un DGP.

Un ejemplo son las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 asociadas a los cánceres de mama y de ovario. Una ventaja de aplicar el DGP en estos casos es que se previene el nacimiento de bebés sanos en el momento del nacimiento pero que más tarde tendrán un riesgo de poseer el gen mutado que les hará necesitar de por vida un seguimiento, una monitorización, análisis y tratamientos invasivos como cirugía para mejorar su calidad de vida. (DRÜSEDAU et al., 2013).

Tenemos varias formas de clasificar estos cánceres hereditarios. Según su tipo de herencia y según su penetrancia y edad de aparición.

4.3.3.1. Clasificación de los cánceres hereditarios según su tipo de herencia.

4.3.3.1.1 Cánceres hereditarios dominantes: El 50% de los hijos heredarán el gen que podrá desarrollar el cáncer.

Tabla 4. Cánceres hereditarios dominantes.

- Neurofibromatosis Tipo 1 y 2.
- Neoplasia múltiple endocrina (MEN 1, 2ª y 2B).
- Poliposis Adenomatosa familiar
- Von-Hippel Lindau.
- Li-Fraumeni.
- Retinoblastoma.
- Tumor de Wilson familiar
-Xerodermia pigmentosa.

4.3.3.1.2. Cánceres hereditarios recesivos: Los padres son portadores asintomáticos con un 25% de posibilidades de tener un hijo con el gen que desarrollará el cáncer.

Tabla 5. Cánceres hereditarios recesivos.

-Anemia de Fanconi
-Ataxia teleangiectásica

-Síndrome de Bloom
-Cáncer colorrectal
-Síndrome de Wiskott-Aldrich

4.3.3.2. Clasificación de los cánceres hereditarios según su penetrancia y edad de aparición.

4.3.3.2.1. Síndromes graves de alta penetrancia y de posible aparición temprana.

Susceptibles a ser incluidos directamente en protocolos de DGP. Poseen características como una alta penetrancia, un alto riesgo de transmisión a la descendencia, posible aparición temprana, ausencia de tratamientos curativos y gravedad de los mismos. (SILVESTRE OLTRA, 2010).

Retinoblastoma.

El retinoblastoma es la neoplasia más frecuente del ojo durante la infancia, y la tercera en frecuencia en todas las edades, siguiendo al melanoma y al carcinoma metastático. Representa del 2,5 al 4% de todos los cánceres pediátricos, pero al 11% de los cánceres en el primer año de vida.

El 40% de los casos de retinoblastoma se consideran hereditarios, con una herencia autosómica dominante, aunque sólo en el 10-20% hay antecedentes familiares, esto se debe a la frecuente aparición de mutaciones de “novo”. La penetrancia del tumor en los portadores de una mutación en RB1 es muy elevada alcanzando hasta el 90%. (SILVESTRE OLTRA, 2010).

Poliposis Adenomatosa Familiar.

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) o poliposis colónica familiar (PCF) es una enfermedad hereditaria infrecuente. Caracterizada por la aparición de numerosos pólipos adenomatosos gastrointestinales y por un desarrollo de cáncer colorrectal en prácticamente el 100% de los pacientes que no reciben un tratamiento adecuado.

La PAF clásica (más de 100 pólipos) presenta una herencia autosómica dominante, y su penetrancia es superior al 95%. El responsable es el gen APC (*Adenomatous Poliposis Coli*) situado en el cromosoma 5 (5q21). La mutación genética de este gen provoca la aparición de una mucosa hiperproliferativa en todo el tracto intestinal. Se estima que es responsable del 1-2% de todos los casos de cáncer colorrectal, por lo que representa el segundo síndrome más frecuente de predisposición hereditaria a esta neoplasia.

La PAF atenuada (menos de 100 pólipos) presenta en un 30% de los casos una herencia autonómica recesiva. Asociada normalmente a la mutación del gen MYH. (SILVESTRE OLTRA, 2010).

Síndrome de Von Hippel Lindau.

El Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) es un síndrome familiar de predisposición a diversos tipos de neoplasias, siendo las más características el angioma/hemangioblastoma de retina, el hemangioblastoma cerebeloso y el carcinoma renal.

Este síndrome posee una herencia autosómica dominante y está causado por mutaciones germinales en el gen VHL, situado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25.5). La

ausencia de la proteína que codifica el gen VHL hace que no se pueda reprimir la expresión de determinados genes provocando una sobreexpresión, independiente de hipoxia, de factores de angiogénesis. (SILVESTRE OLTRA, 2010).

Neoplasia endocrina múltiple (MEN 2A, MEN 2B, CMTF).

Diversos tipos de mutaciones del oncogén RET causan tres síndromes autosómicos dominantes: la Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2A (MEN 2A), la MEN 2B y el Carcinoma Medular de Tiroides Familiar (CMTF). En los tres casos el riesgo de la aparición del carcinoma medular de tiroides es superior al 95%, lo que supone casi una penetrancia completa. (SILVESTRE OLTRA, 2010).

Síndrome de Li Fraumeni.

El síndrome de Li-Fraumeni es un síndrome raro de predisposición familiar a múltiples formas de cáncer que pueden sucederse desde la edad infantil hasta la adulta. Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante de alta penetrancia que está debida, en el 70% de los casos, a mutaciones germinales en el gen TP53.

- ✓ Tumores típicos: Sarcoma de partes blandas, Osteosarcoma, Tumor cerebral, Cáncer adrenocortical, Cáncer de mama y Leucemia aguda.
- ✓ Otros tumores: Melanoma, Estómago, Colon, páncreas, Esófago y Tumores gonadales de células germinales. (SILVESTRE OLTRA, 2010).

4.3.3.2.2. Síndromes que requieren la valoración caso a caso para un DGP.

Entre los síndromes de cáncer familiar, hay una gran cantidad que no entran en el grupo anteriormente mencionado por diferentes motivos (baja penetrancia, riesgo de aparición de tumores escaso, edades de aparición tardías, etc.). Sin embargo, algunos de estos no deben ser excluidos del programa de DGP, siendo necesaria la valoración de cada caso familiar para la autorización de un DGP.

Tratándose de enfermedades oncológicas, en muchos casos la gravedad es innegable. En muchos de estos casos familiares la herencia es autosómica dominante con un riesgo de transmisión del 50%. La penetrancia aunque no completa, en muchos de los tumores que pueden entrar en este grupo puede ser moderadamente elevada, muchas veces alrededor del 50-60%. Por otro lado, aunque la monitorización y tratamientos profilácticos cada vez están mostrando mejores resultados en el aumento de la supervivencia de estos pacientes, aún no son la alternativa única para los mismos por lo que se debe valorar las técnicas de reproducción asistida y DGP en algunas de estas familias. (RUBIO et al., 2004).

Algunos ejemplos: Síndrome de cáncer de mama/ovario, Cáncer de colon no Polipósico, Síndrome de Cowden, Anemia de Fanconi, Neurofibromatosis (Tipo 1 y 2), Síndrome de Nijmegen, Síndrome de Peutz-Jeghers y Esclerosis Tuberosa.

4.3.4. Enfermedades genéticas de aparición tardía.

El DGP para la **identificación de trastornos genéticos tardíos** conlleva la posibilidad de una detección de la enfermedad sin ni siquiera saber si los padres portan o no la enfermedad, un ejemplo claro es la enfermedad de Huntington, una enfermedad autosómica dominante que tiene un riesgo del 50% de ser heredada. Para los individuos portadores de una mutación responsable de una de estas enfermedades que deseen evitar su transmisión a su

descendencia, el diagnóstico genético preimplantacional se presenta como una alternativa muy válida al diagnóstico prenatal. El DGP obligará a muchos pacientes sin problemas de fertilidad a someterse a un ciclo de Fecundación in vitro (FIV) pero evitará la necesidad de interrumpir el embarazo en caso de que el feto sea portador de la mutación. Debido también a su carácter neurodegenerativo irreversible, muchos pacientes con parientes afectados de alguna enfermedad de aparición tardía optan por no conocer su estatus genético pero siguen queriendo asegurarse de que la mutación (si la portasen) no es transmitida a sus descendientes. Para estos casos, existen dos tipos de DGP: el DGP por exclusión y el DGP con no-revelación. (FLORENSA, 2011).

✓ El DGP por **exclusión** consiste en la selección (mediante marcadores familiares) de embriones libres de cualquier alelo proveniente del abuelo/a afecto. De este modo, ni los pacientes, ni los profesionales encargados de dicho análisis, ni nadie del personal de la clínica de FIV puede conocer el estatus genético del paciente, evitando así cualquier revelación al respecto. El mayor inconveniente de este método es que el 50 por ciento de embriones diagnosticados como afectados (por ser portadores de un alelo proveniente del abuelo) serán en realidad sanos.

✓ Por otro lado, el DGP con **no-revelación** consiste en la evaluación de los genes del individuo que quiere tener descendencia y la realización de un ciclo de FIV, con o sin DGP según el resultado de la evaluación, sin que éste sea revelado al paciente. Los pacientes no serán informados de ningún aspecto relacionado con el ciclo de FIV; ni del número de ovocitos obtenido, ni del número de embriones obtenido tras fecundación, ni de los embriones biopsiados ni de los transferidos o congelados. A menudo los profesionales se verán forzados a simular una transferencia embrionaria porque no existen embriones sanos para transferir o porque, aunque éstos no hayan sido analizados, ninguno de ellos ha llegado al estadio de blastocisto. Es de vital importancia que el mínimo necesario de personas implicadas en el proceso de FIV sea informado del estatus genético del paciente para evitar sospechas en el paciente. (FLORENSA, 2011).

Un ejemplo sería detectar las mutaciones asociadas al gen de la proteína precursora amiloidea (APP) que se relacionan con la enfermedad de Alzheimer.

4.4. CON FINES TERAPÉUTICOS A TERCEROS.

La última indicación sería un **DGP con fines terapéuticos a terceros**. El primer uso del DGP para el análisis de mutaciones y la búsqueda de un HLA compatible fue reportado en el 2001. El niño en este caso dona células madre o algún tejido humano para trasplantar a su hermano enfermo. Esta aplicación del DGP surgió por los problemas de incompatibilidad de grupos sanguíneos, por lo tanto, cuando un niño necesita un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas que tengan un mismo HLA, se puede utilizar el DGP para concebir un hijo con el mismo HLA que el hermano afectado con enfermedades como la anemia de Fanconi. (BREZINA and KUTTEH, 2014).

La posibilidad de combinar el DGP para alteraciones genéticas y el emparejamiento de los antígenos de histocompatibilidad HLA, nos posibilita una selección de embriones sanos y que además son HLA compatibles. Se busca la compatibilidad molecular total del HLA para conseguir eliminar los problemas de rechazo que conllevan los trasplantes de médula ósea. (SOUTULLO, 2006).

Tras el nacimiento del niño sano, sus células madre hematopoyéticas (HSC) del cordón umbilical se utilizarán con el fin de ser trasplantadas a la médula ósea del familiar afecto.

A la hora de seleccionar los embriones adecuados se tiene en cuenta qué tipo de herencia tiene la enfermedad, por lo tanto, en enfermedades monogénicas recesivas el porcentaje de embriones HLA compatibles será de $\frac{1}{4}$ y de $\frac{3}{4}$ para sanos y portadores. HLA compatibles y sanos y/o portadores serán $\frac{3}{16}$. Para enfermedades monogénicas dominantes el porcentaje de embriones sanos es de $\frac{2}{4}$ y de sanos y HLA compatibles $\frac{2}{16}$. Si sólo se requiere el tipaje para emparejamiento de HLA, el porcentaje de embriones apropiados será de $\frac{1}{4}$. Aun así, el número de familias que ha recibido este tipo de procedimiento es pequeño ya que la probabilidad de éxito asociada con la FIV y la posibilidad de encontrar un embrión igualado son ya de por sí bajas. (CIVICA, 2012).

Otra limitación del **DGP de compatibilidad HLA** es que es poco probable si el niño afectado ha heredado un haplotipo HLA recombinante de uno de los progenitores, ya que la probabilidad se reduce a 1 de 23 casos para que el hermano sano herede ese alelo recombinante idéntico del progenitor. Basados en los datos de la ESHRE, se han realizado más de 500 ciclos de DGP-HLA hasta octubre de 2011, normalmente para la exclusión de enfermedades como la talasemia mayor, anemia de Fanconi o leucemia. (BICK and LAU, 2006).

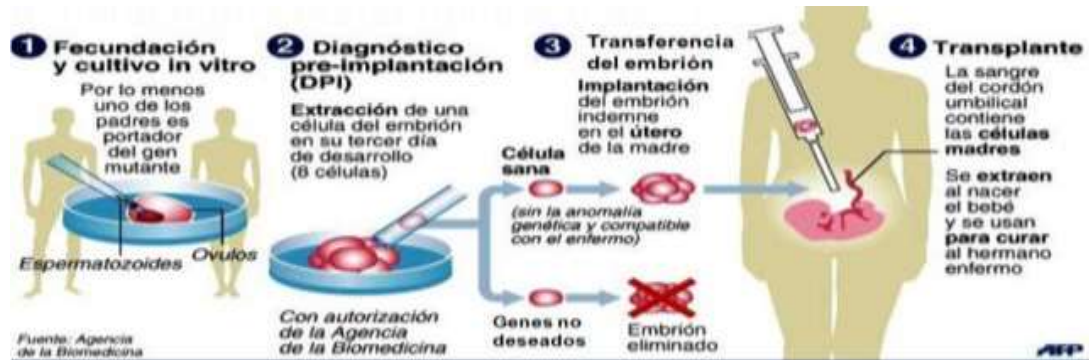


Figura 6. Procedimiento DGP con fines terapéuticos a terceros. Fuente: CIVICA. ASOCIACIÓN DE INVESTIGADORES Y PROFESIONALES POR LA VIDA, 2012. ¿Hay alternativa a la tecnología de los “bebés medicamento”? por Nicolás Jouve de la Barreda España, visto el 20 de Abril de 2015. <http://www.investigadoresyprofesionales.org/drupal/content/%C2%BFhay-alternativa-la-tecnolog%C3%AD-de-los-%E2%80%9Cbeb%C3%A9s-medicamento%E2%80%9D>

5. METODOLOGÍA/PROCEDIMIENTOS DEL DGP.

5.1. FIV-ICSI.

El procedimiento del DGP incluye una hiperestimulación ovárica controlada (HOC) con FSH (Hormona foliculoestimulante) y LH (Hormona luteinizante) que permite obtener múltiples ovocitos, como la que tendríamos en cualquier procedimiento de reproducción asistida, seguido de la recuperación de los ovocitos. Normalmente la técnica de reproducción asistida de elección es ICSI, generando así, embriones con ausencia de espermatozoides y células de la granulosa adheridas a la zona pelúcida, que sí se encuentran presentes durante una fecundación in vitro convencional (FIV), esto evita riesgos de contaminación durante el análisis genético posterior. Seguidamente, los embriones se mantienen en cultivo hasta que se obtienen los resultados, por ello las técnicas de análisis genético deben permitir un diagnóstico muy rápido, compatible con el periodo máximo de cultivo in vitro de embriones. (BICK and LAU, 2006).

5.2. BIOPSIA EMBRIONARIA. GENERALIDADES. OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO PARA EL ANÁLISIS.

Normalmente, se realiza una biopsia de 1 o 2 blastómeros de cada embrión en el día 3. Con estas células llamadas blastómeros se realiza un análisis genético bien usando FISH o PCR. Aquellos embriones que sean diagnosticados como sanos serán los elegidos para ser transferidos al útero materno en día 4 o 5.

La biopsia embrionaria es una técnica que consiste en extraer una o dos células de un embrión en división (dañándolo lo menos posible) para analizarlas genéticamente mediante diferentes técnicas y así poder seleccionar aquellos embriones libres de una determinada alteración genética antes de ser transferidos al útero. El resultado posibilita la identificación de anomalías en estadios previos a la implantación, evitando el desarrollo de anomalías genéticas y previniendo el aborto espontáneo provocado por éstas. (RUBIO et al., 2004).

En condiciones in vitro, después de la fecundación, el cigoto humano se divide aproximadamente cada 24 horas durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. La biopsia se puede realizar en diferentes estadios, biopsia de corpúsculo polar, biopsia de blastómeros y biopsia de blastocisto. En la **tabla 6** se muestra la cronología que sigue un ciclo de FIV con DGP. (BICK and LAU, 2006).

Tabla 6. Cronología de un ciclo FIV con

Día 0	Aspiración folicular e ICSI.
Día 1	Valoración de la fecundación a las 18-20 horas.
Día 2	Valoración del desarrollo embrionario a las 24 horas.
Día 3	Biopsia embrionaria de los embriones evolutivos. Comienzo del análisis genético.
Día 5	Selección para la transferencia de los embriones normales o no afectados con buena evolución. Soporte luteal esencial para el desarrollo del endometrio antes de la transferencia de embriones.

5.2.1. Biopsia del corpúsculo polar: el ovocito maduro se caracteriza por la presencia del primer corpúsculo polar (CP) que tiene 23 cromosomas bivalentes. El segundo corpúsculo polar aparece tras la fecundación por el espermatozoide y contiene 23 cromátidas maternas. Se puede realizar la aspiración del primer CP o de los dos CP, principalmente cuando se realizan estudios para PCR o translocaciones. Esta técnica actualmente está en desuso ya que no se puede emplear cuando la información paterna es esencial para el diagnóstico (mutaciones dominantes, translocaciones y aneuploidías derivadas del padre). (SEPÚLVEDA and PORTELLA, 2012).

5.2.2. Biopsia de blastómeros: el mejor estadio para realizar la biopsia es cuando los embriones adquieren entre 6 y 8 células, equivalente al día 3 de desarrollo, ya que se ha comprobado que en este momento, la extracción de 1 o 2 blastómeros no afecta negativamente a su posterior desarrollo hasta blastocisto. **Esta revisión se centrará en la biopsia de embriones en día 3.** (LÓPEZ-PEDRAZA et al., 2012; ERCOLI et al., 2009; GLEICHER et al., 2014).

En general, la biopsia embrionaria es una técnica invasiva que permite la obtención de 1 o 2 blastómeros de un embrión en división sin diferencias en la tasa de implantación posterior. Un tema muy discutido es el número necesario de blastómeros a biopsiar y analizar para conseguir un equilibrio entre la eficacia y la eficiencia del estudio genético y el impacto sobre el embrión. El número de blastómeros a extraer dependerá de la calidad del embrión y del análisis genético a realizar (VAN DE VELDE et al., 2000; PARRIEGO et al., 2003).

Para la técnica FISH (detección de anomalías cromosomales estructurales y numéricas) si la calidad del embrión lo permite y son embriones de 8 células se extraen 2, en cambio, si el número de células es menor, se extrae únicamente un blastómero. En los protocolos de PCR sólo se transferirán aquellos embriones con resultados confirmados en dos blastómeros (2 repeticiones necesarias para obtener resultados más robustos). Hay autores que recomiendan extraer siempre dos células para evitar un posible error de diagnóstico (COULAM et al, 2007).

Hay estudios que demuestran que la biopsia embrionaria en la etapa de 8 células no es perjudicial para el desarrollo posterior del blastocisto debido a que el índice mitótico es alto y esto compensa con mayor rapidez la célula extraída para la biopsia y además, el escaso grado de compactación en los embriones permite que este estadio celular sea el idóneo para realizar el proceso. (HATDY et al., 1990; CIESLAK JANZEN et al., 2006)

Al parecer, si se extrae una célula en el estadio de 4 células, durante el desarrollo del blastocisto se reduce la relación de la masa celular interna con el trofoectodermo. (TARIN et al., 1992). Los embriones en estadio de 6-8 células presentan un cierto grado de compactación debido a la formación de uniones celulares calcio-dependientes. Esto se soluciona con la utilización de un medio sin calcio que bloquee estas uniones celulares. (DUMOULIN et al., 1998).

El número mínimo de células que debe poseer un embrión para ser considerado apto para la biopsia está establecido en 5, siendo recomendable descartar del procedimiento aquellos embriones de muy baja calidad. Otro criterio a tener en cuenta es el grado de fragmentación, que no debe ser superior a un 30%. (MARTINEZ, 2008). Siempre que sea posible se biopsiarán células mononucleadas. Si el estudio genético requiere el análisis de 2 blastómeros, se biopsiarán solamente aquellos embriones que tengan 6 ó más células. En caso de pérdida del núcleo o fallo en el diagnóstico se puede “rebiopsiar” el embrión.

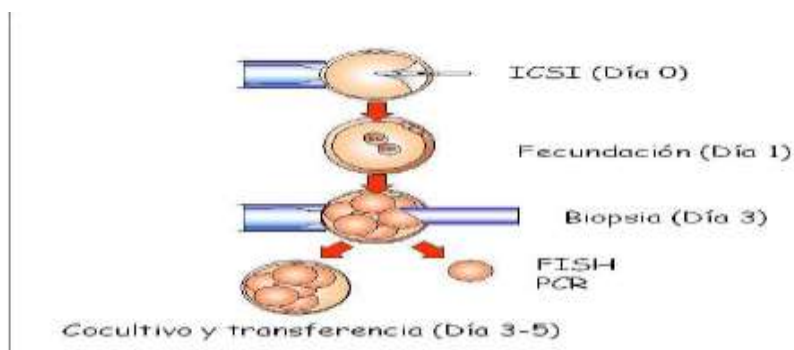


Figura 7. Pasos biopsia blastómeros. RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1218. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

5.2.3. Biopsia de blastocisto: en este estadio, en los días 5 y 6 de desarrollo, el embrión puede tener hasta 300 células. En esta fase, el embrión se ha diferenciado en trofoectodermo, que originará más tarde la placenta, y en masa celular interna, que originará el feto. Esto supone una ventaja ya que se considera una biopsia menos invasiva, se toman 4-5 células del trofoectodermo, sin alterar así la masa celular interna, destinada al desarrollo fetal, no viéndose afectada ni por la extracción de alguna célula, ni por la presencia de sustancias químicas como las que se utilizan para la perforación de la zona pelúcida. Otra ventaja de la biopsia en estadio de blastocisto es la posibilidad de obtener una mayor cantidad de material genético debido a que se obtienen mayor número de células. Esto mejora la exactitud y fiabilidad del DGP. Además, se biopsian solo aquellos embriones que han alcanzado el estadio de blastocisto y, que por lo tanto, se han desarrollado correctamente. Sin embargo, pese a las

grandes ventajas, precisa de demasiado tiempo, estando los embriones listos para su transferencia como pronto en día 6, por este motivo se recomienda criopreservar los embriones mientras se está realizando el DGP, lo que disminuye la viabilidad del embrión. (LÓPEZ-PEDRAZA et al., 2012; RODRIGO et al., 2014; ERCOLI et al., 2009; DENG and WANG, 2015).

5.3. PERFORACIÓN ZONA PELÚCIDA.

Para extraer cualquier célula de un embrión es preciso perforar previamente la zona pelúcida. Encontramos 3 métodos de perforación:

- **Mecánico.** Utilización de un punzón. Se recomienda para la biopsia del 1º CP en ovocito.
- **Químico.** El orificio se realiza con ácido Tyrodes.
- **Láser.** El orificio se realiza mediante un láser acoplado al microscopio.

De cualquiera de estas formas, se realiza una eclosión asistida que consiste en crear, de forma artificial, un orificio en la zona pelúcida. Cada laboratorio usa uno u otro método dependiendo de la experiencia del embriólogo que lo vaya a realizar y de las técnicas puestas a punto en el laboratorio. De todos modos, el procedimiento requiere cuidado en su ejecución para que no haya lisis celular en el embrión. (RODRIGO et al., 2014; BONILLA-MUSOLES et al., 2009; GARCÍA, 2007).

Según estudios realizados, se ha visto que la eclosión asistida no afecta a la tasa de anomalías cromosómicas en los nacidos vivos. (MA et al., 2006).

5.3.1. Método mecánico: se realiza en una gota de 20 µL de medio con HEPES. En primer lugar el ovocito decumulado (en el caso del corpúsculo polar) o el embrión se sujeta con la pipeta holding y la zona pelúcida es traspasada de manera tangencial con una micropipeta PZD (Diseción parcial de zona) en dirección de las agujas del reloj desde la 1:00 a las 11:00. El embrión se libera entonces de la pipeta “holding” y la parte de la zona pelúcida ensartada se fricciona contra dicha pipeta hasta que se disgrega la ZP y se consigue una hendidura. Finalmente, la micro-aguja es retirada, quedando abierto un pequeño orificio en forma de ojal cerrado (de unos 50 micrómetros) que permite la salida del embrión tras la eclosión o la entrada de micropipetas para eliminar los fragmentos.

Se conoce un nuevo método tridimensional de disección llamado PZD tridimensional en el que se practica un segundo corte en la ZP debajo del primero, es decir, perpendicular al primer corte, de forma que se obtiene un agujero en forma de cruz. En este nuevo método, se consigue una mayor flexibilidad a la hora de orientar el ovocito e introducir la pipeta de biopsia. Se aplica fundamentalmente para la biopsia de CP. Su principal inconveniente es que consume mucho tiempo y se requiere de un aprendizaje meticuloso, suele producir agujeros de diferentes tamaños, muchos de los cuales no son óptimos.

En cuanto al método mecánico, aunque posee la ventaja de una ejecución más simple, no da muy buenos resultados debido a que el orificio que se crea por la aguja de disección produce una estrangulación posterior del blastocisto cuando intenta eclosionar (COHEN et al., 1990).

Otra alternativa, con resultados esperanzadores es el piezo-micromanipulador que consiste en un sistema de vibración de alta frecuencia que rompe la zona pelúcida. El

inconveniente es que es un método costoso. (NAKAYAMA et al., 1999; RODRIGO et al., 2014; BONILLA-MUSOLES et al., 2009; GARCÍA, 2007).

5.3.2. Método químico: es el método más utilizado. Consiste en disolver la ZP y practicar un orificio de 30-35 μm en la misma, mediante el uso del ácido Tyrodes (pH 2.3-2.4). El protocolo comienza con la preparación en una placa de dos gotas centrales con el ácido Tyrodes rodeadas de microgotas de 30 μL con medio tamponado de biopsia G-PGD (tampón MOPS, sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , suplementado con HSA, nunca gaseado) donde se colocan los embriones (**Figura 8**). El medio de biopsia se deja atemperar durante 20 minutos a 37°C , cubriendo la placa con aceite mineral. A continuación, se colocan las micropipetas de aspiración y Tyrodes paralelas a

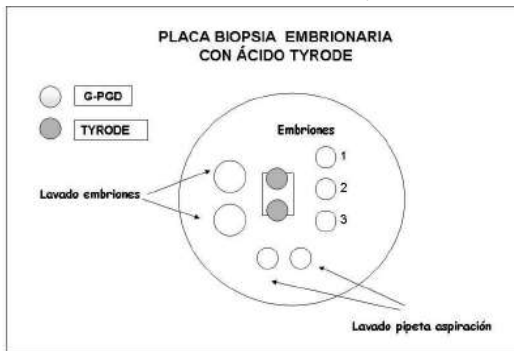


Figura 8. Biopsia método químico. RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1220. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

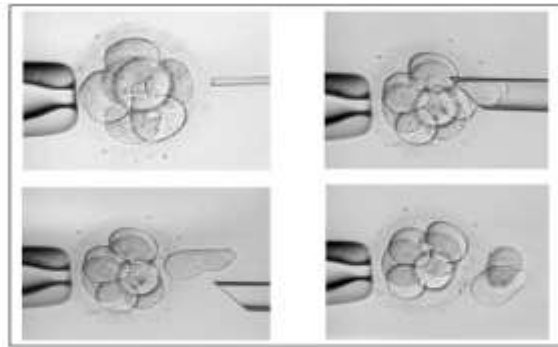


Figura 9. Biopsia embrionaria con perforación de la zona pelúcida mediante ácido Tyrodes. Fuente: GARCÍA, J.A., 2007. Enfermería en reproducción humana. Librería-Editorial Dykinson, 228 páginas.

la derecha y la pipeta holding (que sujeta en todo momento al embrión) a la izquierda, alineada con las anteriores. Seguidamente, se depositan los embriones en la placa de biopsia y se pasan al microscopio invertido (máximo 2-3 embriones por cada placa). Se enfoca la gota de ácido Tyrodes con un objetivo 10X y se aspira una cantidad suficiente de ácido, neutralizando el flujo cuando el nivel de ácido sea el adecuado. Antes de pasar a la gota que contiene el embrión se purga la pipeta de aspiración en la gota de G-PGD de lavado. Después, se sujeta firmemente el embrión con la pipeta "holding" y se aproxima la pipeta que contiene el ácido a la posición de las 3:00 horas liberando el ácido suavemente hasta que se observe que la ZP se va disolviendo y se comienza a apreciar la formación de un orificio de aproximadamente 30-35 μm de diámetro. En este momento se debe aspirar ligeramente el medio en las cercanías del orificio formado para evitar la acidificación excesiva del medio. Esta técnica necesita de una manipulación muy rápida y precisa para poder evitar la exposición innecesaria del embrión al pH ácido y como consecuencia, una pérdida de viabilidad.

Una de las ventajas de esta técnica es que es económica y está al alcance de cualquier laboratorio, sin embargo, se expone al embrión a la solución ácida y a una abertura permanente. (RODRIGO et al., 2014; BONILLA-MUSOLES et al., 2009; GARCÍA, 2007).

5.3.3. Láser: hoy en día se están utilizando los sistemas de láser de infrarrojos (**Figura 11**) que liberan el rayo láser a través del objetivo del microscopio, es decir, no se requiere de un contacto directo con la zona diana, debido a que se produce una rotura térmica provocada por la

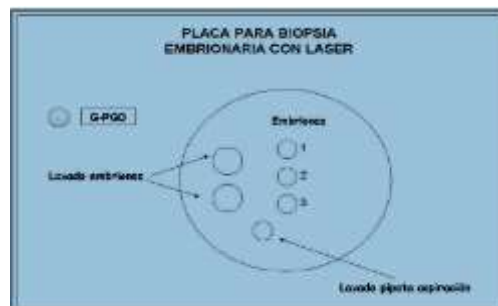


Figura 10. Placa para biopsia embrionaria con láser. RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1221. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

absorción de la energía del láser por la ZP. La absorción de la radiación por la placa y el medio de cultivo son mínimas.

5.3.3.1. Contacto directo: En el modo con contacto directo, el láser se dirige a través de una fibra óptica en contacto con la ZP del embrión. La radiación empleada es de una longitud de onda correspondiente a la franja ultravioleta. Sin embargo, esta técnica se dejó de emplear por las ventajas que suponían utilizar el método sin contacto y el potencial mutagénico de la radiación ultravioleta.



Figura 11. Sistema láser. Fuente: BONILLA-MUSOLES, F.; DOLZ, MORENO y RAGA, 2009. REPRODUCCIÓN ASISTIDA: Abordaje en la práctica clínica. *Médica Panamericana*. Pág.348-350.348-350.

5.3.3.2. Sin contacto: En el modo sin contacto se utiliza un láser de diodo infrarrojo de 1480 nm cuyo haz es proyectado de forma tangencial al embrión mediante un sistema de lentes ópticas. En este caso, la apertura en la zona pelúcida se consigue por degradación por fototermólisis de su matriz proteica produciendo desnaturalización de las proteínas que la conforman, ocasionada por la elevación de la temperatura del agua al ser calentada por el láser. Una modificación reciente de este método consiste en utilizar el láser para reducir el grosor de la zona pelúcida, sin llegar a abrir un agujero. La realización del orificio en la ZP mediante láser (**Figura 12**) dependerá de la energía del pulso, del tiempo de duración de este (1,7-2 ms recomendado), de la superficie de incidencia del rayo y de su capacidad de difusión por la solución empleada en el proceso. Es aconsejable un menor número de disparos pero de mayor intensidad. Se recomienda mover el embrión para evitar lesiones térmicas de los blastómeros cercanos debido al sobrecalentamiento de la zona que ha estado expuesta al láser. El efecto en la ZP es muy localizado y los orificios son redondos y precisos. El tiempo de exposición se reduce mucho. Una de las ventajas del método es que es muy rápido y reproducible, sin embargo, es caro, se expone al embrión y la abertura es permanente y de gran tamaño. (RODRIGO et al., 2014; BONILLA-MUSOLES et al., 2009; GARCÍA, 2007).

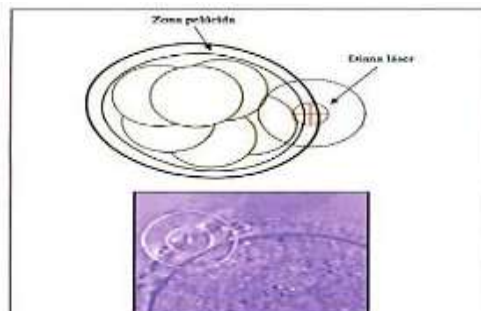


Figura 12. Biopsia con láser. Fuente: BONILLA-MUSOLES, F.; DOLZ, MORENO y RAGA, 2009. REPRODUCCIÓN ASISTIDA: Abordaje en la práctica clínica. *Médica Panamericana*. Pág.348-350.348-350.

Parece que no existe diferencia entre los embriones biopsiados con láser o con ácido Tyrodes, aunque se ha observado que la formación del blastocisto es más temprana cuando se utiliza láser.

El láser endurece el área de la ZP expuesta, pudiendo hacer más difícil la aspiración del blastómero. (MALTER et al., 2001). Aun así, el láser posee ventajas frente al ácido como la velocidad y precisión en su ejecución, no es tóxico para el embrión, reduce la experiencia técnica necesaria para llevarla a cabo (JORIS et al., 2003).

Se observó en un estudio prospectivo aleatorio (MAKRAKIS et al., 2006) que la tasa de implantación era significativamente más alta en el método láser y que además, la tasa de embarazo era mayor aunque no significativa.

En otro estudio comparativo entre el método químico y el láser, se obtuvieron resultados similares en cuanto al desarrollo del blastocisto y la proporción de blastocistos obtenidos. (JONES et al., 2006).

Diversos estudios han relacionado el tamaño del orificio en la ZP con el incremento de la frecuencia de gemelos monocigóticos (HERSHLAG et al., 1999; SCHIEVE et al., 2000) por lo que se recomienda no realizar aberturas muy pequeñas que puedan causar la herniación del blastocisto. Tampoco son recomendables las aberturas muy grandes ya que se corre el riesgo de la salida de algún blastómero que comprometa la capacidad de desarrollo del embrión.

5.4. BIOPSIA DE EMBRIÓN DÍA 3.

Los métodos de trabajo que utilizan los laboratorios que utilizan el DGP no son exactamente iguales y difieren en ciertos puntos. Por ello, la ESHRE ha intentado formular unas guías con unos estándares mínimos que aconsejan seguir, y que incluyen tanto al equipamiento del laboratorio como a la cualificación necesaria del personal que realiza la biopsia de los embriones. (BONILLA-MUSOLES, DOLZ, et al., 2009).

Para realizar el proceso de biopsia es necesario usar un medio suplementado con un 10% de HSA para evitar que el embrión y el blastómero extraído se fijen a la placa. Además, debe llevar como solución amortiguadora HEPES que impida cambios de pH durante la realización de la técnica, e incluso carecer de Ca y Mg para bloquear las uniones entre los blastómeros del embrión y así favorecer la extracción. No obstante, es recomendable que el embrión no esté más de 10 minutos en estos medios ya que pueden comprometer el desarrollo in vitro posterior. (MORENO, 2007).

A continuación, se exponen los pasos a seguir tras la realización del orificio en la zona pelúcida:

En primer lugar, se aproxima la pipeta de aspiración al orificio y se realiza una aspiración suave de uno o dos blastómeros con núcleo único y visible (objetivo Hoffman 40X). La célula puede extraerse mediante aspiración del blastómero o desplazamiento del mismo, sea con líquido o ejerciendo presión con la micropipeta contra la zona pelúcida. La mayoría de los centros, realizan la aspiración con líquido (MORENO and LÓPEZ, 2006, vol1 y 2) pues se controla mejor el proceso sin llegar a dañar la célula extraída ni al embrión biopsiado (CIESLAK-JANZEN et al., 2006).

En este procedimiento de aspiración con líquido se aspira en el interior de la micropipeta la cantidad suficiente de medio que evite la presión negativa al aspirar posteriormente el blastómero. Se acerca la micropipeta a la abertura de la zona pelúcida, se expulsa ligeramente medio para expandir la abertura que es bloqueada con ayuda de la



Figura 13. Biopsia embrionaria. Fuente: BONILLA-MUSOLES, F.; DOLZ, MORENO y RAGA, 2009. REPRODUCCIÓN ASISTIDA: Abordaje en la práctica clínica.. *Médica Panamericana*. Pág.348-350.348-350.



Figura 14. Aspiración de blastómeros. Fuente: BONILLA-MUSOLES, F.; DOLZ, MORENO y RAGA, 2009. REPRODUCCIÓN ASISTIDA: Abordaje en la práctica clínica. *Médica Panamericana*. Pág.348-350.348-350.

micropipeta. Posteriormente, se aspira el blastómero de forma suave, realizando un movimiento de arriba para abajo, de tal manera que éste pueda adaptarse a la luz de la micropipeta y no se rompa. Para ello, se debe presionar el blastómero al tiempo que lo aspiramos poco a poco. (MORENO, 2007).

A continuación, se retira la pipeta de aspiración y se dejan los blastómeros en el medio, cercanos al embrión. Se procede a liberar el embrión de la pipeta holding cuidadosamente con el objetivo de evitar que ésta aspire los blastómeros biopsiados.

Posteriormente, se retiran las micropipetas y se lava la pipeta de aspiración en una microgota de medio de cultivo antes de biopsiar al siguiente embrión.

Una vez terminada la biopsia, se retiran los embriones de la placa de biopsia y se lavan los embriones varias veces en una placa con medio de cultivo para eliminar los restos de medio de biopsia sin Ca²⁺ y Mg²⁺. Los blastómeros permanecerán en la placa de biopsia hasta su evaluación según el tipo de análisis genético que se vaya a realizar: FISH, Arrays o PCR.

Es importante no comprometer la evolución a blastocisto en el caso de la biopsia de blastómeros y no solo esto, sino también observar el efecto de la biopsia embrionaria en la ratio masa celular interna/trofoectodermo y en los parámetros metabólicos del embrión. Ya que en este estadio de 6-8 células la aspiración de 2 células puede afectar a la diferenciación posterior del embrión pudiendo dar lugar a blastocistos con menor proporción de células de la masa celular interna y del trofoectodermo, comprometiendo así a su capacidad de implantación. (TARÍN and HANDYSIDE, 1993; BRAUDE et al., 1998; MOTTLA et al., 1995).

Los resultados de un ciclo de DGP también van a estar influenciados por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Por ello, hay grupos que aconsejan cancelar aquellos ciclos en los que se espera obtener menos de 6 ovocitos, ya que las expectativas de transferencia y embarazo se reducen considerablemente pues no todos los ovocitos se fecundan, ni todos los embriones son aptos para realizar el proceso (VANDERVORST et al., 1998; PLATTEAU, 2006). Incluso, durante el proceso algún embrión puede dañarse accidentalmente, comprometiendo así su desarrollo. (MORENO, 2007).

	Características	Aplicaciones
Biopsia de CP	<ul style="list-style-type: none"> - Se puede realizar biopsia del primer y segundo corpúsculo polar. - Preferible análisis de ambos CP para el estudio de aneuploidias. - Utilidad limitada a anomalías de origen materno. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aneuploidias de origen materno. - Detección de anomalías estructurales de origen materno. - Mutaciones génicas maternas.
Biopsia de blastómeros	<ul style="list-style-type: none"> - Aspiración de 1-2 blastómeros de embriones entre 6-8 células. - No afecta al desarrollo embrionario. - El mosaicismo es el mayor inconveniente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aneuploidias originadas por ambos progenitores y postzigóticas. - Detección de anomalías estructurales de origen materno y paterno. - Mutaciones génicas de ambos progenitores.
Biopsia de blastocisto	<ul style="list-style-type: none"> - Se pueden analizar múltiples células. - No daña la masa celular interna de la cual deriva el feto. - Se reduce el tiempo disponible para el análisis: congelación. - Riesgo de error diagnóstico por mosaicismo en el trofoectodermo, ya que no se analiza la masa celular interna. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aneuploidias originadas por ambos progenitores y postzigóticas. - Detección de anomalías estructurales de origen materno y paterno. - Mutaciones génicas de ambos progenitores.

Figura 15. Comparación de las diferentes biopsias. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1228. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

6. ANÁLISIS GENÉTICO.

6.1. PREPARACIÓN DE LOS BLASTÓMEROS.

6.1.1. Fijación de blastómeros para hibridación in situ fluorescente (FISH).

Después de la realización de la biopsia embrionaria, se procede a fijar el núcleo de cada uno de los blastómeros, de forma que se eliminen los restos de citoplasma y los núcleos consigan mantener su integridad y morfología. Existen diferentes métodos de fijación, tomados de la citogenética clásica, el más utilizado es el de Tarkowski, aunque existen otros protocolos modificados.



Figura 16. Información sobre el procesado de blastómeros. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1223. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

Se utiliza normalmente el método de Tarkowsky con ligeras modificaciones que se detallan a continuación:

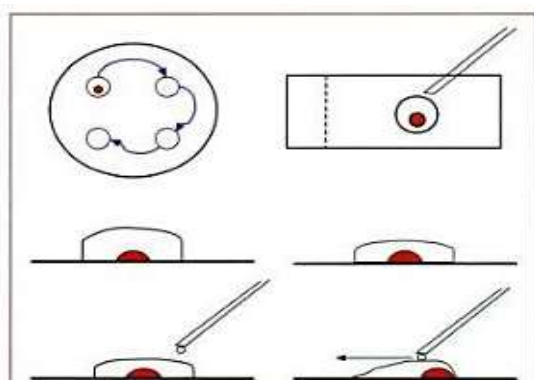


Figura 17. Fijación de blastómeros para FISH. Fuente: MARTINEZ, M.; SÁNCHEZ, M. y HERNÁNDEZ, E.R., 2008. TRATAMIENTOS REPRODUCTIVOS: Diagnóstico genético preimplantacional en Tratado de Reproducción Humana para Enfermería.

Se prepara una placa con 4 gotas de medio hipotónico (KCL 0,075M) suplementado con 0,6% de BSA o medio de cultivo, se hace pasar el blastómero por cada una de las gotas limpiando bien la pipeta de restos de aceite (**Figura 17**). Así, el blastómero aumenta de volumen facilitando su extensión. A continuación, se deposita el blastómero sobre un portaobjetos, es importante evitar la lisis del blastómero, por ello se intenta dejar la mínima cantidad de medio en este. Rápidamente y sin dejar que se seque por completo el medio, se añade una gota de fijador (metanol:acético 3:1) lo más próximo posible a la gota de hipotónico y sin perder de vista al blastómero (**Figura 18**). Luego se repite la misma operación añadiendo una segunda gota de solución de fijación hasta que se eliminen los restos de citoplasma y el núcleo esté extendido. El núcleo fijado se marca con un lápiz de diamante y se lleva al laboratorio de FISH. La fijación se puede realizar bajo microscopio invertido o bajo lupa estereoscópica con objetivo de contraste de fases de 10X.

Otro protocolo comúnmente utilizado consiste en aspirar el blastómero con una pipeta Pasteur estirada a la llama y colocarlo en un pocillo con 0.5 mL medio de cultivo tamponado con albumina al 5% (lupa estereoscópica).

Se aspira de nuevo el blastómero con una pipeta Pasteur estirada a la llama diferente a la anterior y depositarlo sobre un portaobjetos previamente desengrasado, son portaobjetos

especiales que no poseen autofluorescencia. Se retira cuidadosamente el exceso de medio depositado y se valora la expansión del blastómero sobre el portaobjetos.

A continuación, los pasos son similares a los explicados anteriormente, se deja secar el medio y luego dejar caer verticalmente sobre la extensión una primera gota de la solución de fijación y cuando esta se retrae, añadir una segunda gota de fijador (microscopio invertido, contraste de fases 10X). Se continúa añadiendo solución de fijación hasta que se eliminen los restos de citoplasma, el núcleo aparezca extendido y la preparación quede limpia y lista para hibridar. En algunas ocasiones es necesario soplar ligeramente de forma tangencial para eliminar el citoplasma en su totalidad. Finalmente, se deja secar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y se traslada al laboratorio de FISH.

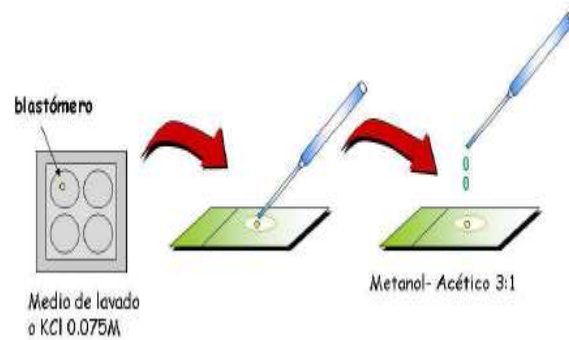


Figura 18. Fijación blastómeros para FISH. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P.El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1225. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

La fijación es un paso clave en todo el proceso previo a la realización de los test genéticos, ya que la calidad de las extensiones va a condicionar el acceso de las sondas de DNA al núcleo y de ello dependerá la eficiencia de hibridación en términos de intensidad y claridad de las señales fluorescentes.

Hay que tener en cuenta que el proceso de fijación de blastómeros es sensible a numerosos factores tales como la experiencia del embriólogo, la temperatura y la humedad ambiental, los cuales pueden incidir en un determinado momento no sólo en una adecuada transferencia de los blastómeros al portaobjetos sino también en la calidad de los núcleos fijados.

La humedad ambiental dentro del área donde se realizará el procedimiento es un aspecto importante a considerar, siendo la humedad ideal aquella que se encuentra entre un 40% y un 50%. (MARTINEZ et al., 2008; RODRIGO et al., 2014).

6.1.2. Entubado de blastómeros para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y CGH.

En el caso de preparar un análisis genico mediante PCR o CGH se realiza el proceso de entubado. Tras la biopsia de los embriones, cada blastómero debe ser lavado exhaustivamente en gotas distintas (**Figura 20**) para cada uno de ellos. Se prepara una placa Petri estéril con 5 gotas (5-10 µl) de tampón de lavado (PBS + 1% PVP). Se colocan un par de gotas extra de mayor tamaño al final para lavar la pipeta entre paso y paso. El blastómero se va pasando de gota en gota con la pipeta estirada a la llama. El lavado de las células debe realizarse de forma que se asegure la eliminación de posibles contaminantes y sin lisar la célula. A continuación, el blastómero se transfiere a un tubo de PCR con la menor cantidad de tampón PBS posible (2-3µl). Para evitar la evaporación del tampón, se adiciona una gota de aceite mineral directamente al tubo. Finalmente, se cierra el tubo y se marca claramente con

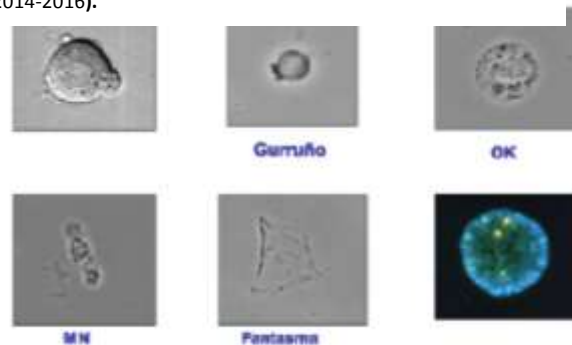


Figura 19. Calidad de los núcleos para una buena fijación. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P.El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1225. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

rotulador indeleble, se centrifuga muy ligeramente, se mantiene en hielo hasta que termine todo el proceso y se transporta al laboratorio de diagnóstico junto con la ficha informativa e identificativa del caso. Es importante llevar un control negativo para cada blastómero con el fin de asegurar que no se ha producido contaminación.

Para el *tubing* cada blastómero se lava en sucesivas gotas de forma individual tal como se ha explicado anteriormente (**Figura 21**) antes de ser introducidas en los tubos perfectamente identificados:

- ✓ **Muestras:** El *tubing* de los blastómeros tanto para el diagnóstico por PCR o CGH se realiza introduciendo cada una de ellas en un tubo de 0,2 mL controlando su liberación en el tubo mediante la visualización con lupa.
- ✓ **Blancos:** tras el *tubing* de la célula, se toma un nuevo tubo y se libera una pequeña cantidad de medio de la última gota de lavado que servirá como blanco.

Para el estudio de enfermedades monogénicas en células embrionarias, la detección del DNA requiere un proceso de lisis celular completo. La lisis celular, se consigue eficientemente mediante el uso de tampones alcalinos previamente añadidos a los tubos de PCR. (MARTINEZ et al., 2008; RODRIGO et al., 2014).

6.2. ANÁLISIS DEL MATERIAL GENÉTICO.

Podemos hablar fundamentalmente de tres abordajes para realizar el análisis genético de los embriones:

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Proceso mediante el cual se consigue amplificar secuencias específicas de DNA hasta más de un millón, en aproximadamente 30 ciclos.
- **Hibridación in situ fluorescente (FISH).** Proceso que consiste en la utilización de sondas de DNA específicas que hibridan con el DNA de la muestra.
- **Hibridación Genómica Comparada (CGH).** Test genético que evalúa la ploidía de los 23 pares de cromosomas comparando el DNA de la muestra a analizar con un DNA control normal. Se utiliza para la selección de embriones libres de enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales, y para el estudio de anomalías cromosómicas numéricas (las que afectan a los cromosomas individuales) y estructurales.

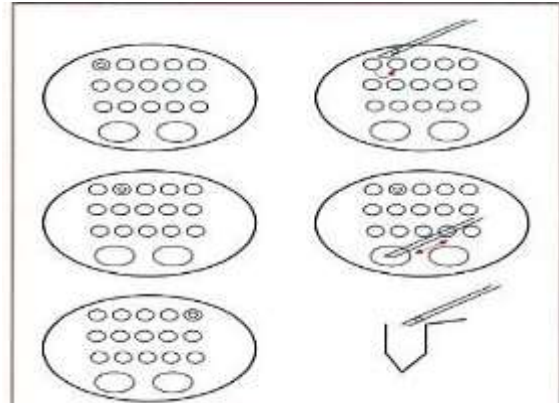


Figura 20. Entubado de blastómeros para PCR. Fuente: MARTINEZ, M.; SÁNCHEZ, M. y HERNÁNDEZ, E.R., 2008. TRATAMIENTOS REPRODUCTIVOS: Diagnóstico genético preimplantacional en Tratado de Reproducción Humana para Enfermería.



Figura 21. Manipulación del blastómero en el *Tubing*. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1226. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

6.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica molecular basada en la amplificación “in vitro” del DNA purificado de células individuales procedentes de la biopsia embrionaria realizada previamente y con la cual se llegarán a obtener millones de copias de unas pocas secuencias cortas del genoma (loci) específicamente seleccionadas, normalmente de una longitud de 100-500 pares de bases. Para aumentar la señal de una sola célula se suele realizar una segunda reacción de PCR utilizando el producto de la PCR de la amplificación inicial, con esto se pueden llegar a detectar mutaciones de DNA o repeticiones polimórficas cortas en tándem (SRT). (BICK and LAU, 2006).

Una vez realizada la PCR, mediante diferentes aproximaciones técnicas se realizan los estudios genéticos utilizando el producto amplificado obtenido por PCR. Por tanto el DGP sigue la misma metodología que se utiliza para el análisis de pruebas genéticas rutinarias pero siendo adaptadas al tipo de muestra, en este caso blastómeros.

La PCR para el DGP principalmente se utiliza para:

– **Estudio de enfermedades monogénicas:** Se emplea tanto para el estudio directo de la mutación (qué embriones han heredado la mutación) como para el estudio indirecto mediante marcadores moleculares asociados a la enfermedad (combinación de haplotipos asociados a la enfermedad).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es un procedimiento para sintetizar in vitro grandes cantidades de una región específica del DNA, en este caso, de la región que contiene el gen mutado causante de la enfermedad. Se requiere la ayuda de una polimerasa, dos oligonucleótidos que actúan como *primers* o cebadores, cuya función es acotar la región a amplificar y ciclos de temperatura que permiten repetidamente separar las 2 cadenas del DNA a temperatura alta y anillar los *primers* a temperatura más baja para empezar una nueva ronda de síntesis. Así pues, por ciclo de reacción se duplica el número de moléculas que sirven de sustrato para el siguiente ciclo y se produce por tanto, una amplificación exponencial del producto. Los ciclos, habitualmente, constan de una fase de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, de 30 a 40 ciclos de amplificación que tienen tres etapas generalmente (los tiempos y temperaturas pueden variarse en función de los *primers* y enzimas utilizados): 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a la temperatura de *annealing* de los *primers* para que se anillen al molde, alrededor de los 60° C y 30 segundos a 72 ° C, y una última fase de elongación durante unos minutos a 72°C.

Los componentes necesarios para añadir al tubo de PCR que se va a colocar dentro del termociclador son los siguientes: Tampón de reacción (Tris-HCl, MgCl₂, KCl, Triton-X100), dNTPs, cebadores, DNA polimerasa termofílica (la DNA polimerasa utilizada no precisa reconocer orígenes de replicación, sino simplemente regiones de cadena simple con un primer anillado), muestra de DNA y aditivos *enhancer* como dimetilsulfóxido y betaína. (BREZINA and KUTTEH, 2014; LY, et al., 2014; ERCOLI et al., 2009; RODRIGO et al., 2014).

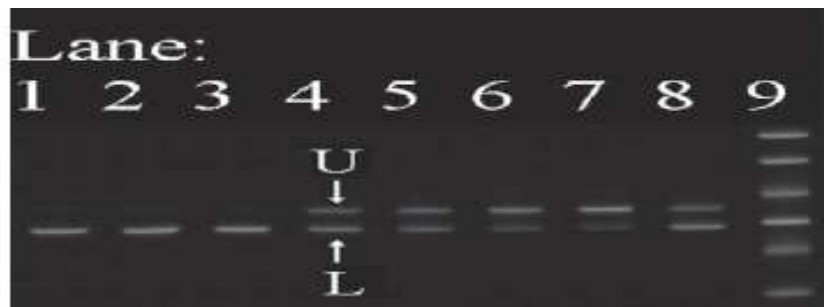


Figura 22. DGP en atrofia muscular espinal (SMA). Enfermedad provocada por una delección homocigota en el gen SMN1 (SMN-T). En el gel se muestra el análisis del exón 7 de los genes SMN-T y SMN-C. La presencia de la banda U indica que el gen SMN-T está presente. La presencia de la banda L indica que el gen SMN-C está presente. Las células (2 y 3); (4 y 5) y (6 y 7) analizadas representan a un mismo embrión. Solo se estudió una única célula en 1 y 8, la posición 9 es el marcador de tamaños moleculares. Como se observa, 2 embriones están afectados por SMA (1 y (2y3)) ya que SMN-T no está presente (ausencia banda U). Fuente: SWANSON, A.; STRAWN, E.; LAU, E. & BICK, D., 2007. *Preimplantation genetic diagnosis: technology and clinical applications. Wisconsin Medical Journal*, 106: 145-152.

– **Tipado HLA**, se identifica mediante PCR embriones histocompatibles (panel de marcadores de la región HLA) y la mutación responsable de la enfermedad.

Los antígenos HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigen*), se encuentran codificados en un grupo de genes localizados en el cromosoma 6 y son los responsables de que los órganos o tejidos trasplantados de un individuo a otro no sean rechazados.

El DGP que tiene como objetivo determinar la herencia de los HLA y se realiza de forma indirecta, esto es mediante el análisis de marcadores polimórficos tipo microsatélite. Una ventaja importante del método indirecto es que se puede utilizar la misma aproximación para distintos casos clínicos siempre que los marcadores escogidos para el análisis resulten ser informativos en los miembros de las familias solicitantes del DGP. Este análisis indirecto de los haplotipos HLA se combinará con el estudio de la enfermedad hereditaria presente en la familia.

Debido a la alta sensibilidad de la técnica de PCR su aplicación en DGP aun existiendo limitaciones como la baja cantidad de material disponible para el análisis (1-2 células) la efectividad de la amplificación se es de aproximadamente un 85% en función de la región a amplificar. Debido al riesgo posible de contaminación con DNA procedente del padre, se aconseja utilizar la microinyección intracitoplasmática (ICSI) como técnica de inseminación ya que no se encuentran adheridos espermatozoides a la zona pelúcida evitando así que sean analizados por error. Otra recomendación importante para evitar la contaminación y reducir el fenómeno de la amplificación preferencial de uno de los dos alelos es utilizar marcadores ligados al gen afectado además de la detección directa del propio gen. (BREZINA and KUTTEH, 2014; LY, et al., 2014; ERCOLI et al., 2009; RODRIGO et al., 2014).

6.2.2. Hibridación in situ fluorescente (FISH).

La FISH se realiza tras la fijación de las células obtenidas en la biopsia a un portaobjetos. Consiste en hibridar estas células fijadas con sondas de DNA específicas de cromosoma y marcadas con fluorescencia. Normalmente, las células individuales se estudian con una combinación de sondas y luego se desmontan y se estudian con una segunda mezcla, lo que permite el diagnóstico de células anormales. Este abordaje se emplea principalmente para identificar aneuploidías y reordenaciones cromosómicas como las translocaciones, así como para la determinación del sexo en el marco de una enfermedad ligada al sexo y para el

estudio de desequilibrios derivados de una segregación anómala de una anomalía estructural. (BICK and LAU, 2006).

Tras la hibridación, se pueden enumerar las copias de un determinado cromosoma presente en el núcleo de una célula. Las sondas utilizadas en núcleos interfásicos pueden ir dirigidas a diferentes tipos de secuencias de DNA:

- Secuencias centroméricas (CEP): secuencias de DNA satélite (150-300 pb), altamente repetitivas (miles de veces) y específicas, localizadas habitualmente en el centrómero de cada cromosoma. Se utilizan generalmente para el diagnóstico de los cromosomas 15, 16, 17, 18, X e Y.
- Secuencias específicas de locus (LSI): secuencias de DNA de copia única (200-400 kb) o con un número reducido de copias, específicas de genes o loci génicos. Se utilizan generalmente para el diagnóstico de los cromosomas 13, 21 y 22.
- Secuencias subteloméricas (TEL): secuencias de DNA de copia única (60-175 kb), específicas y localizadas en los extremos terminales de cada cromosoma. Se utilizan generalmente para la reconfirmación de señales no concluyentes con sondas CEP y LSI.

Básicamente, el procedimiento de FISH consiste en 4 pasos:

A) Desnaturalización. Se desnaturaliza el núcleo ya fijado en el portaobjetos y las sondas de DNA a utilizar. El tiempo y la temperatura de hibridación dependen del tipo de sonda utilizada:

- Sondas CEP: temperatura de hibridación de 42°C y tiempo de hibridación variable entre 30 minutos y 16 horas.

- Sondas LSI y TEL: temperatura de hibridación de 37°C y tiempo de hibridación variable entre 6 y 16 horas.

La desnaturalización se puede realizar por separado (incubando el núcleo en una solución de formamida al 70% atemperada en baño térmico a 73°C, y la mezcla de sondas que contiene formamida en un baño térmico a 73°C) o bien de forma conjunta o co-desnaturalización (colocando la mezcla de sondas directamente sobre el núcleo fijado en el portaobjetos y desnaturalizando de forma simultánea en una placa calefactora).

B) Hibridación. Se hibrida la sonda de DNA con su secuencia complementaria en el núcleo fijado bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, formando así un heteroduplex.

C) Detección. Se realizan una serie de lavados a baja concentración de sales para eliminar el exceso de sonda unida inespecíficamente al núcleo evaluado y seguidamente se detectan las señales con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. Se utiliza también una contratinción para el núcleo que facilita la visualización de toda la cromatina y la identificación de las marcas fluorescentes en el núcleo.

D) Interpretación de los resultados. Mediante la utilización un microscopio de fluorescencia con filtros adecuado se cuenta el número de marcas fluorescentes que aparecen en cada núcleo para cada uno de los cromosomas a analizar del siguiente modo:

-Embrión diploide normal: se observan 2 señales para cada uno de los cromosomas analizados en la célula.

-**Embrión haploide:** se observa 1 señal para cada uno de los cromosomas analizados en la célula.

-**Embrión triploide:** se observan 3 señales para todos y cada uno de los cromosomas analizados.

-**Embrión con monosomía/s:** se observa en la célula analizada una única señal de hibridación para uno o varios (pero no todos) cromosomas analizados.

-**Embrión con trisomía/s:** se observan en la célula analizada tres señales de hibridación para uno o varios (pero no todos) cromosomas analizados.

(BREZINA and KUTTEH, 2014; LY, et al., 2014; ERCOLI et al., 2009; RODRIGO et al., 2014)

FISH para los cromosomas X, Y, 18: una ronda de hibridación

Está indicado cuando se realiza un DGP por enfermedad ligada a los cromosomas sexuales y en parejas con anomalías numéricas en su cariotipo para los cromosomas sexuales. Se realiza una FISH triple con sondas de marcaje directo para la región centromérica de los cromosomas X e Y junto con el cromosoma 18, que se incluye normalmente en el análisis como control de ploidía, para poder distinguir una monosomía para los cromosomas sexuales de un embrión haploide (1n) o una trisomía de un embrión triploide (3n). (**Figura 23**)

A menudo, cuando no se dispone de sondas marcadas con tres fluorocromos diferentes se realizan dos rondas de hibridación (FISH secuencial).

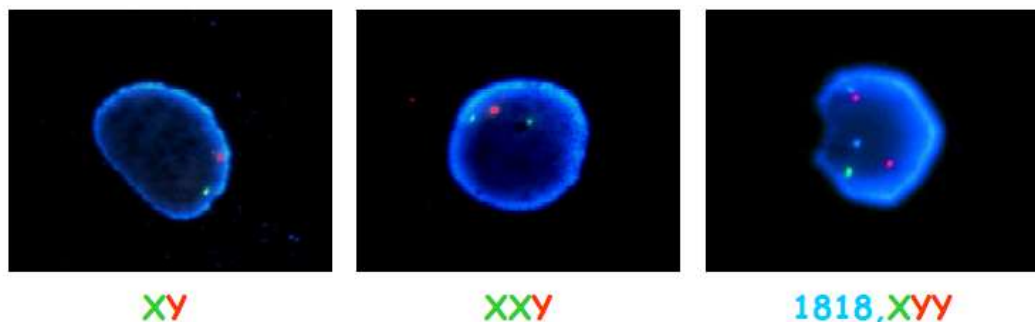


Figura 23. FISH de blastómeros para los cromosomas sexuales. La primera imagen se corresponde con un blastómero normal de sexo masculino, la segunda con una trisomía XXY y la tercera una trisomía XY. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1235. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

Normalmente se prefiere la detección de la enfermedad mediante PCR, sin embargo, en aquellos casos en las que la mutación genética resulta aún poco estudiada o desconocida, o bien, el protocolo no está optimizado, se opta por detectar el sexo embrionario y evitar seleccionar un embrión del sexo que porta la enfermedad.

La aplicación de FISH para aquellas parejas en las que algún miembro es portador de una reorganización cromosómica equilibrada, básicamente de una translocación robertsoniana o recíproca o de una inversión, son candidatos a beneficiarse de la técnica de DGP mediante FISH. Normalmente los individuos portadores presentan problemas de esterilidad o infertilidad asociados a una mala segregación meiótica de los cromosomas implicados en la reorganización. Se aplican sondas fluorescentes de DNA distales a los puntos donde se produce la rotura cromosómica con el objetivo de discriminar los embriones desequilibrados (contienen ganancias y/o pérdidas de cromosomas o fragmentos cromosómicos) de los normales o

equilibrados. Sin embargo, no es posible distinguir mediante FISH embriones normales de portadores de la misma translocación equilibrada que el progenitor, cuando el análisis se realiza sobre núcleos interfásicos (células de embriones en día 3 o blastocistos).

En estos casos, lo primero es realizar un estudio previo de la translocación, seleccionando aquellas sondas capaces de detectar la reorganización cromosómica. Para las translocaciones robertsonianas es suficiente con dos sondas (**Figura 24**), una para cada cromosoma implicado en la translocación, en cambio, para las translocaciones recíprocas se necesita un total de tres sondas (dos sondas para uno de los cromosomas, una para detectar el fragmento “fijo” que se queda con el centrómero, otra sonda para detectar el fragmento “móvil” o translocado y la tercera sonda para detectar el fragmento “fijo” o el fragmento “móvil” del otro cromosoma implicado en la translocación) como se puede observar en la **Figura 25**.

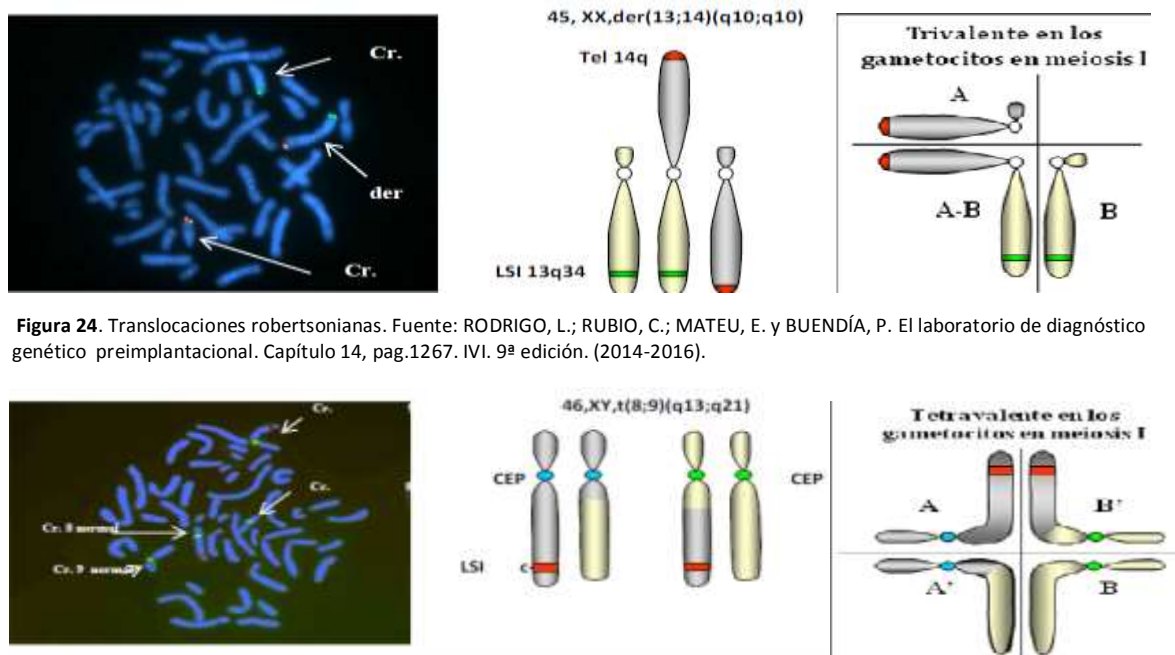


Figura 24. Translocaciones robertsonianas. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1267. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

Figura 25. Translocaciones recíprocas. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1268. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

El estudio previo de translocación se lleva a cabo en linfocitos de sangre periférica cultivados y extendidos en un portaobjetos (mismo procedimiento que para un estudio de cariotipado convencional). En las metafases obtenidas en la extensión se observa si la combinación de sondas elegidas detecta el reordenamiento, mientras que en los linfocitos en interfase, que deben mostrar dos señales para cada una de las sondas utilizadas, se valora la eficiencia de hibridación y el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos debidos a las limitaciones de la técnica. Después de la validación de las combinaciones de sondas a utilizar se realiza la hibridación de los núcleos de los blastómeros biopsiados de los embriones a diagnosticar según los ejemplos de protocolos explicados en el **Anexo 2**.

En cuanto a las inversiones cromosómicas, pueden no ser necesariamente detectadas en un estudio rutinario y saber cuándo realizar una búsqueda dirigida requiere agudeza clínica.

En el caso de las inversiones pericéntricas se utilizan sondas dirigidas a los telómeros del brazo corto y del brazo largo del cromosoma en el que se ha dado la inversión. Como control de ploidía en los blastómeros a analizar podemos utilizar una sonda centromérica para dicho cromosoma. Para las inversiones paracéntricas se podría utilizar la misma estrategia para

descartar los gametos resultantes de una recombinación clásica, sin embargo, no se podría identificar los recombinantes resultantes de segregaciones “no clásicas” (motivo por el cual se debe informar a los pacientes en el consejo genético previo al inicio de un ciclo de DGP).

La FISH de una sola célula presenta limitaciones por el número de sondas que pueden aplicarse simultáneamente, debido a que el riesgo de fracaso de la hibridación y los artefactos de la FISH aumenta con el número de sondas. Actualmente, la FISH no tiene la capacidad de estudiar la aneuploidía de todos los cromosomas, por lo que la mayoría de los programas seleccionan los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, ya que las anomalías de estos cromosomas pueden producir un nacido vivo afectado por alguna enfermedad de mayor prevalencia. (SCRIVEN et al., 2011).

El microscopio de fluorescencia tiene que poseer filtros con cobertura para las distintas longitudes de onda, para poder analizar los resultados. La selección del tipo y número de sondas a emplear requiere un conocimiento amplio del comportamiento de los distintos reordenamientos cromosómicos que producen las enfermedades de mayor prevalencia. (BREZINA and KUTTEH, 2014; LY, et al., 2014; ERCOLI et al., 2009; RODRIGO et al., 2014).

6.2.3. Hibridación Genómica Comparada (CGH).

El array de hibridación genómica comparada (aCGH) es una técnica que ha ido sustituyendo a la técnica FISH para su aplicación en DGP además, es muy utilizada para el *screening* de aneuploidías ya que permite el análisis simultáneo de los 23 pares de cromosomas humanos en una única célula.

Consiste en analizar el DNA con el fin de detectar pequeños desequilibrios genómicos de unas 5 Mb a lo largo de todo el genoma (segmentos ganados o perdidos). Los microarrays del DNA son una ayuda sólida en la que gran cantidad de fragmentos específicos del DNA se ordenan y se utilizan para diagnosticar mutaciones de forma rápida y simultánea. Una ventaja es que el mismo microarray se puede utilizar para diagnosticar en el embrión diversas enfermedades genéticas.

Este análisis se puede realizar en un tiempo inferior a 24 horas, permitiendo la transferencia rápida de los embriones en el mismo ciclo en el que se realiza la biopsia. Se necesita una amplificación genómica completa (WGA) previa a la aplicación de la aCGH en DGP con el objetivo de obtener una mayor cantidad de DNA a analizar a partir de una o muy pocas células, se requieren 200 ng de DNA y una célula solo contiene 5-10 pg. El método de WGA ideal debe ofrecer tanto buena cobertura genómica como una fiel representación del original en cantidad suficiente. Este DNA amplificado generalmente se marca con fluorescencia verde (Cy3) y posteriormente se hibrida sobre la plataforma del array que contiene un DNA control euploide marcado en rojo (Cy5). La plataforma del array está formada por miles de puntos que contienen diferentes secuencias de DNA normal distribuidas a lo largo de todo el genoma. Aunque existen varios tipos de plataformas, las más utilizadas en clínica son los arrays de BACs cuyos puntos están compuestos por fragmentos extraídos de clones de BACs.

A modo de ejemplo, se describe en el siguiente anexo (**Anexo 3**) el protocolo de aCGH utilizando la plataforma de BACs *24sure* (BlueGnome) para estudio de aneuploidías de 24 cromosomas. El proceso consta de las etapas reflejadas en la **Figura 26**.

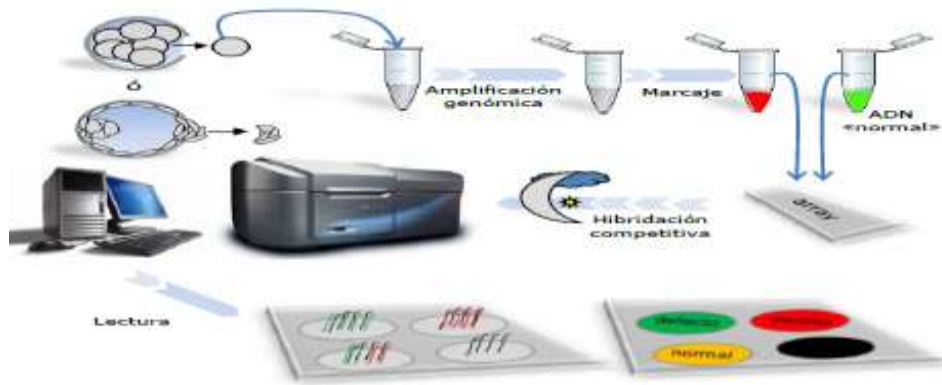


Figura 26. Esquema del protocolo de arrays de CGH para el estudio de aneuploidías de 24 cromosomas sobre blastómeros. Fuente: DGP de aneuploidías mediante arrays de CGH (CGHa) Sistemas genómicos. Biomédica.

Esta técnica permite evaluar ganancias o pérdidas de cromosomas individuales (aneuploidías), pero no se pueden identificar alteraciones que afecten al cómputo total de los cromosomas (triploidía, tetraploidía, etc). A su vez, es capaz de identificar alteraciones cromosómicas segmentales, considerándose con relevancia clínica cuando tienen un tamaño superior a 20Mb.

La lectura del arrayCGH se realiza con un scanner equipado con láser de dos canales, un canal verde (532 nm) para la excitación y lectura de la señal Cy3 (DNA muestra) y un canal rojo (635 nm) para la excitación y lectura de la señal Cy5 (DNA control euploide). Se generan imágenes TIFF por el scanner y se analizan seguidamente con un programa informático de análisis de datos específico para arrays de CGH, que normaliza las intensidades de fluorescencia de los canales Cy3 y Cy5, y genera un gráfico que representa la cantidad de DNA de la muestra respecto del DNA control (eje Y) para cada uno de los 24 cromosomas (eje X) como bien se observa en la **Figura 27**. La “ganancia o pérdida” de material genético en Cy3 se representa por puntos que se desvían hacia la parte superior o inferior del gráfico, respectivamente.

Cuando se desconoce la localización exacta del gen responsable de la enfermedad, no es posible un diagnóstico basado en estudios de ligamiento con marcadores polimórficos entre los alelos de la pareja consultante por no ser posible la identificación de la mutación o la informatividad de dichos marcadores. En estos casos, si el gen causante del trastorno tiene un patrón de herencia ligado al cromosoma X, con carácter recesivo, existe la opción de seleccionar el sexo del embrión con el fin de evitar la transmisión de la enfermedad a la descendencia. (MUNNÉ, 2012).

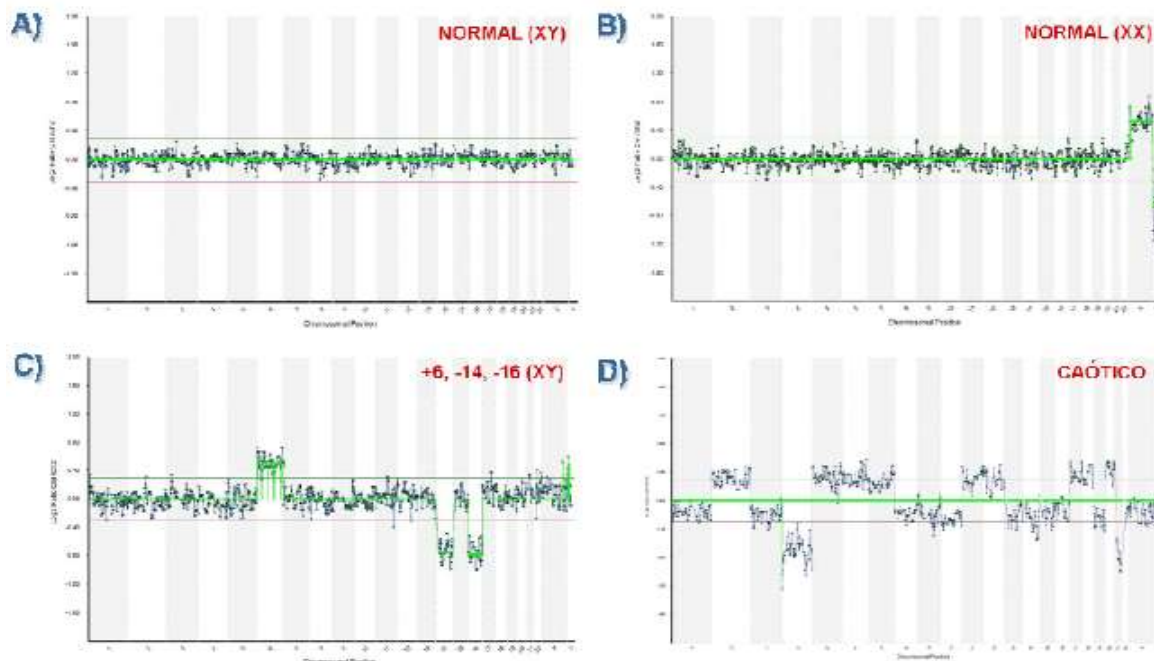


Figura 27. Interpretación de array CGH sobre blastómeros. Las figuras A) y B) representan blastómeros normales; la figura C) representa aneuploidías para los cromosomas 6,14 y 16; la figura D) representa un blastómero anormal caótico, con alteraciones para múltiples cromosomas. Fuente: RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P. El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Capítulo 14, pag.1272. IVI. 9ª edición. (2014-2016).

Cuando se desea diagnosticar reordenamientos estructurales esta técnica tiene un uso un poco más limitado debido a que para poder ser detectados dichos reordenamientos, el tamaño de los fragmentos implicados en las anomalías debe ser mayor a la resolución de los arrays, lo cual no siempre ocurre. Es por ello que, aunque para este tipo de análisis no es necesario realizar un estudio previo, en el caso de las translocaciones recíprocas, si se debe calcular el tamaño de los fragmentos translocados. Para ello se suele utilizar una aplicación del programa de análisis de arrays (BlueFuseMulti. BlueGnome Ltd., Cambridge) que vincula los clones que hibridan con los fragmentos translocados en el array con la base de datos “UCSCGenome Bioinformatics”

Es recomendable para el análisis de translocaciones recíprocas que los fragmentos translocados no sean de un tamaño inferior a 30 Mpb en el caso de que analicemos blastómeros de embriones en día 3 de desarrollo embrionario. En el caso de las translocaciones robertsonianas, es diferente, ya que el fragmento translocado es prácticamente todo el cromosoma y los tamaños de los fragmentos son siempre lo suficientemente grandes para poder ser analizados mediante arrays. No se detectan deleciones/duplicaciones de muy pequeño tamaño (<1 Mb).

Es importante controlar la contaminación con otras células o fragmentos de células en el proceso de *tubing* lavando bien la célula y además vigilar que la célula permanece entera en el medio una vez finalizado el *tubing*.

(BREZINA and KUTTEH, 2014; LY, et al., 2014; ERCOLI et al., 2009; RODRIGO et al., 2014).

6.2.4. Otros abordajes.

Se han desarrollado otros abordajes nuevos conforme se ha ido desarrollado la biología molecular, así entre los más usados que se expondrán, se encuentra la PCR Multiplex en DGP, similar a una PCR convencional pero con sets de diferentes cebadores en los cuales cada set de cebadores amplificará una secuencia, por lo que simultáneamente se detectarán varias secuencias, obteniendo información para cada loci al mismo tiempo. Se diagnostican enfermedades genéticas específicas o diversas enfermedades al mismo tiempo. Normalmente se utilizan para la detección de una enfermedad 2 marcadores *upstream* y 2 *downstream* a 1 Mb de la mutación para detectar eventos de recombinación. Un inconveniente es que se requieren condiciones de reacción muy precisas que permitan la amplificación equilibrada de todos los fragmentos, un diseño de cebadores preciso para evitar la amplificación no específica y productos de diferente tamaño para facilitar el análisis. (FINDLAY, 2000).

Posee las ventajas de un protocolo tan general basado en marcadores que se pueden aplicar a familias afectadas por la misma enfermedad, independientemente de las mutaciones que presente, evitando tener que diseñar un protocolo para cada caso, siempre que la familia sea informativa para el marcador estudiado. Si los padres no tienen alelos en común, sus embriones solo pueden heredar uno de los cuatro posibles genotipos. Si alguno de los blastómeros biopsiados no muestra uno de estas cuatro combinaciones predichas, es muy probable que se deba a que la muestra está contaminada. Permite además la detección precisa de ADO (fenómeno de pérdida alélica).

Una variante, la PCR fluorescente utiliza unos cebadores marcados con fluoróforos, una vez obtenido el producto de PCR se realiza una electroforesis y se pasa por un scanner láser que hace que el producto sea fluorescente, siendo detectado más fácilmente. Se pueden utilizar varios cebadores marcados con diferentes fluoróforos a la vez para determinar diferentes enfermedades aunque solapen los productos de la PCR (PCR Multiplex fluorescente). Determina con exactitud y eficacia medidas cuantitativas, por ejemplo el ratio relativo de un alelo con el otro. Esto soluciona la pérdida alélica que se produce en la PCR convencional. Es rápida, necesita poca muestra (< 1ml) y de bajo coste. (VAN DER AA et al., 2014; TAN et al., 2014; YAN et al., 2014).

Para la amplificación del material genético obtenido de una o pocas células se utiliza WGA (*Whole genome amplification*). Hay diferentes métodos de WGA, tales como *degenerate oligonucleotide primer* PCR (DOP-PCR) y *primer extension pre-amplification* (PRE-PCR) que ha sido aplicada en clínica para DGP del cáncer dominante Síndrome *familiar de poliposis adenomatosa coli (FAP)*, *β -Thalassemia* y *hemofilia*. En esta técnica el genoma entero se amplifica usando PCR, aumentando el número de *template* de 1 a copia a 50-100 copias para siguientes reacciones de PCR. El producto de PEP se usa posteriormente para realizar otras PCR y diagnosticar defectos específicos. Por lo que múltiples diagnósticos pueden realizarse simultáneamente. Un inconveniente es que requiere tiempo 8-12 horas) y la amplificación es aleatoria (solo un 80% del genoma se amplifica correctamente) por lo que puede llevar a un mal diagnóstico. (VAN DER AA et al., 2014; TAN et al., 2014; YAN et al., 2014).

Más recientemente se ha propuesto la MDA (Multiple Displacement Amplification), que utiliza la polimerasa del bacteriófago Φ 29, y ha mostrado que produce DNA de buena calidad comparado con los protocolos anteriormente descritos con WGA clásica. Además el *slippage* de microsatélites previamente identificado usando WGA no ocurre cuando se utiliza MDA, permitiendo entonces el análisis de haplotipos a través del estudio de los marcadores microsatélite. (GIRARDET and CLAUSTRES, 2001).

El continuo avance en las tecnologías de microarrays y secuenciación de DNA están permitiendo desarrollar plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) aplicada al diagnóstico preimplantacional. En este sentido, las nuevas investigaciones en NGS van dirigidas hacia el análisis del DNA mitocondrial, la detección de microdeleciones, la búsqueda de marcadores genéticos relacionados con la viabilidad embrionaria, y el estudio simultáneo de aneuploidías y enfermedades monogénicas sobre la misma muestra de DNA y representa un futuro prometedor para el desarrollo de la medicina reproductiva personalizada. (VAN DER AA et al., 2014; TAN et al., 2014; YAN et al., 2014).

Por ejemplo, los arrays de SNPs permiten desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico que permiten utilizar un panel con varios marcadores para todos los portadores de una misma enfermedad monogénica. La NGS es la técnica más novedosa en la cual la secuenciación del DNA genera gran cantidad de datos de las diferentes secuencias del genoma humano, pudiendo detectar con ayuda de base de datos de enfermedades las mutaciones características de estas. Es muy precisa y puede detectar desequilibrios en segmentos que un array de SNPs no detectaría, evitando malos diagnósticos. (LY et al., 2014).

7. DISCUSIÓN.

El DGP proporciona una opción de reproducción para aquellas parejas que buscan tener descendencia propia pero quieren prevenir el riesgo de transmitir una enfermedad o anomalía genética heredable. (ADIGA et al., 2010; SERMON, 2002; RUBIO et al., 2004; FRAGOULI, 2007).

Aunque el DGP fue inicialmente ofrecido a parejas con posibilidad de tener hijos afectados para alguna enfermedad monogénica o anomalía cromosómica, han ido surgiendo nuevas indicaciones tales como, predisposición a cáncer, desórdenes de aparición tardía y HLA-typing. El DGP se aplicará para todas estas indicaciones teniendo en cuenta que aquellas enfermedades susceptibles a ser heredadas no tengan tratamiento curativo.

El consejo genético (formado por profesionales especializados) se encargará de informar a los pacientes que cumplan las indicaciones para DGP de forma clara, transparente y accesible sobre los riesgos, ventajas y otros aspectos que conllevará la realización del DGP. (LÓPEZ-PEDRAZA et al., 2012).

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 el tercer día de desarrollo mediante diferentes métodos de diagnóstico genético permite la selección de embriones no afectados para su transferencia. El DGP se está convirtiendo en un procedimiento cada vez más frecuente en los tratamientos de FIV en los pacientes con riesgo a transmitir a su descendencia una enfermedad. (RUBIO and RODRIGO, 2005).

Aunque el DGP lleva más de 15 años practicándose aún quedan aspectos que mejorar. Sólo unos pocos embriones pueden ser obtenidos de cada mujer para poder realizar comparaciones y controles experimentales. Además se tienen que tener en cuenta las consideraciones éticas que conlleva la realización de un DGP. Actualmente existen pocas técnicas lo suficientemente sensibles para detectar algunas enfermedades con pocas cantidades de material genético. El diagnóstico tiene que realizarse en cortos periodos de tiempo para permitir la transferencia del embrión en el mismo día, sin embargo, pocas técnicas lo consiguen en tan poco tiempo, recurriendo entonces a la criopreservación del embrión. Las técnicas ideales deben permitir detectar un rango amplio de anomalías y enfermedades simultáneamente. El embrión tiene que permanecer intacto y viable durante

todo el procedimiento de biopsia. (ADIGA et al., 2010; SERMON, 2002; RUBIO et al., 2004; FRAGOULI, 2007).

El DGP combinado con la FIV tiene baja eficiencia ya que el número de embriones disponibles para la biopsia se reduce a menos de un 25% de todos los ovocitos obtenidos. El 70% de los ovocitos serán fecundados, de estos sólo el 70% se desarrollaran a estadio de 6-8 células y sólo el 80% serán adecuados para biopsiar. De los embriones biopsiados el 5% no serán analizados porque durante el procedimiento serán degenerados. El diagnóstico será obtenido para un 90% de estos y únicamente un 50% de los embriones será diagnosticado como afecto. En resumen, de 100 ovocitos, solo 17 serán transferidos como no afectados, y por lo tanto, producirán un embarazo con éxito aproximadamente el 2,5% de los ovocitos recogidos. (FINDLAY, 2000).

Actualmente, se está buscando mejorar la eficiencia del DGP en varios aspectos. Algunos de los problemas de diagnóstico ya mencionados, se debían a la falta de material genético, ya que se extraen de 1-2 blastómeros para el análisis, sin embargo, una posible solución es la replicación del blastómero, provocando su división in vitro varias veces, permitiendo múltiples análisis de células individuales o un único análisis con un mayor número de células a analizar, mejorando la exactitud y fiabilidad del diagnóstico. Un inconveniente de esto es que se produce un atraso de 2-3 días hasta que se repliquen los blastómeros, pudiéndose resolver con la criopreservación de los embriones varios días, pero sólo un 60% de los embriones sobreviven a este proceso de criopreservación. Otra solución utilizada actualmente es desarrollar a estadio de blastocisto el embrión y obtener células del trofoectodermo, sin embargo esto requiere una mejora de las condiciones de cultivo in vitro para maximizar el número de embriones que alcanzan este estadio. (FINDLAY, 2000).

Otra dificultad es el mosaicismo presente en los embriones en etapas tempranas (existencia de 2 líneas celulares con distintos genotipos o cariotipos). En un embrión en etapa temprana de división pueden coexistir blastómeros cromosómicamente normales y anormales. El mosaicismo también puede afectar a los resultados del estudio en los trastornos monogénicos (cuando la célula estudiada es trisómica respecto al cromosoma que contiene el gen de interés en un trastorno monogénico). (BICK and LAU, 2006).

En cuanto al diagnóstico preocupa el porcentaje de embriones diagnosticados, la incidencia de mosaicismo y la multinucleación y lo que ello supone, embriones evolutivos sin diagnóstico y el riesgo de error de la técnica, tanto falsos positivos (embriones anormales no identificados) como falsos negativos (embriones normales identificados como anormales o dudosos) y por lo tanto no transferidos.

Normalmente, se transfieren hasta un máximo de 3 embriones “no afectados”. Si hay exceso de embriones “no afectados” se seleccionarán para la transferencia en fresco aquellos que tengan mayor probabilidad de implantación. La criopreservación de los embriones biopsiados se aconseja en caso de cancelación de la transferencia embrionaria, si es necesario más tiempo para el análisis del material biopsiado o si hay un exceso de embriones sanos que no pueden ser transferidos. (ADIGA et al., 2010; SERMON, 2002; RUBIO et al., 2004; FRAGOULI, 2007).

Afortunadamente, el desarrollo y progreso en genética y biología molecular, incluyendo el mapeo del genoma humano completo, va lidiando con estos problemas y dificultades, surgiendo nuevas técnicas y procedimientos cada vez más eficientes. Un ejemplo es la NGS y los arrays de SNPs o PCR multiplex fluorescente. La introducción de nuevas tecnologías como los arrays o la posibilidad de secuenciar todo el genoma en los laboratorios

de FIV permitirá analizar simultáneamente diferentes mutaciones o detectar con mayor precisión enfermedades hereditarias. Cuantos más marcadores se van conociendo y estudiando en las diferentes enfermedades, mayor es la facilidad para detectar las mutaciones que ayuden a descartar embriones afectados. La era del DGP por secuenciación está llegando y comenzará a beneficiar a las parejas indicadas para un diagnóstico genético preimplantacional con mayor precisión para detectar mutaciones puntuales, aneuploidías u otras alteraciones del material genético. (Yan LY, et al., 2014; HENS et al., 2013).

8. CONCLUSIÓN.

El DGP es una herramienta muy útil para prevenir la transferencia de embriones que porten alguna anomalía ya sea porque proceden de progenitores que tengan la enfermedad (la manifiesten o no) o porque presenten problemas de infertilidad que estén asociados a un aumento en las anomalías de los embriones. El DGP es, por tanto, en lo que se refiere al diagnóstico prenatal, un paso más adelantado en la detección de enfermedades. De este modo, el DGP tiene un valor clínico en la prevención de enfermedades genéticas y en la reducción del riesgo de transmisión de anomalías cromosómicas, también se evita entre otras cosas tener que tomar la decisión de una interrupción del embarazo.

Hasta finales de 2010 se han realizado más de 750 ciclos con indicación de DGP para más de 100 enfermedades distintas. La tasa de transferencia de uno o dos embriones sanos se sitúa en torno al 90% y la tasa de embarazo tras control ecográfico entre el 35-40%. El coste estimado de un procedimiento de DGP es aproximadamente 400 euros mayor que el de un Diagnóstico prenatal.

Limitaciones asociadas a la reproducción asistida (número de ovocitos recuperados, tasas de embarazo), intrínsecas de la técnica de análisis (perdida alélica, fallo de amplificación global, contaminación) y genéticas (número de cromosomas evaluados, casos de "novo", análisis de mutaciones no disponible) acotan de forma evidente la aplicación inmediata del DGP tras recibir una consulta. En este sentido, aunque se realice un DGP siempre se recomienda realizar amniocentesis para tener más garantías de los resultados de los análisis genéticos. Sin embargo, los buenos resultados obtenidos a nivel de tasas de gestación y niños nacidos sanos apoyan que el DGP para enfermedades monogénicas y se puede ofrecer como opción eficiente a parejas con alto riesgo de tener descendencia afectada por estas patologías hereditarias.

Se debe, por tanto, trabajar en encontrar nuevas técnicas de biología molecular que disminuyan el riesgo de error en el diagnóstico, mejorar las condiciones de cultivo de los embriones y los procedimientos previos al análisis genético como la biopsia embrionaria. Gracias al perfeccionamiento de estas técnicas, así como a la aparición de nuevas sondas y el mayor conocimiento del mapa genético, en un futuro próximo se podrá aplicar el DGP a otras muchas enfermedades genéticas que actualmente no pueden optar a él.

(ADIGA et al., 2010; SERMON, 2002; RUBIO et al., 2004; FRAGOULI, 2007).

8. BIBLIOGRAFÍA.

-ADIGA, S.K.; KALTHUR, G.; KUMAR, P.; GIRISHA, K.M, 2010. *Preimplantation diagnosis of genetic diseases. Journal of Postgraduate Medicine*, 56:317-320.

-BICK, D.P. & LAU, E.C., 2006. Diagnóstico genético preimplantación. *Pediatr. Clin. N. Am.*, 53: 559 – 577.

- BONILLA-MUSOLES, F.; DOLZ, MORENO y RAGA, 2009. REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ABORDAJE EN LA PRÁCTICA clínica. Buenos Aires: Madrid; *Médica Panamericana*. ISBN: 978-84-9835-156-9. Pág.348-350.
- BRAUDE, P.R.; BOLTON, V. & MOOR, S., 1998. *Human gene expression first occurs between four- and eight- cell stages of preimplantation development. Nature*, 332:459-62.
- BREZINA,P.R.; KUTTEH, W.H., 2014. *Clinical applications of preimplantation genetic testing. BMJ*, 349:g7611.
- CIESLAK-JANZEN, J.;TUR-KASPA, I.; ILKEVITCH, Y.; BERNAL, A.; MORRIS,R. & VERLINSKY, Y.,2006. *Multiple micromanipulations for preimplantation genetic diagnosis do not affect embryo development to the blastocyst stage. Fertil. Steril*, 85:1826-29.
- COHEN, J.; ELSNER, C.; KORT, H.; MALTER, H.; MASSEY, J.; MAYER, M.P. et al., 1990. *Impairment of the hatching process following FIV in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. Hum. Reprod.*, 5:7-13.
- COULAM, C.B.; JEYENDRAN, R.S.FIDDLER, M.& PERGAMENT, E.D., 2007. *Discordance among blastomeres renders preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy ineffective. J. Assist Reprod. Genet.*, 24:37-41.
- DENG, A. & WANG, W., 2015. *Assesment of aneuploidy formation in human blastocyst resulting from cryopreserved donor eggs. Molecular Cytogenetics*, 8:12.
- DUMOULIN, J.C.M.; BRAS, M.; COONEN, E.; DREESEN, J.; GERAEDTS, J.P.M. & EVERS J.L.H., 1998. *Effect of Ca2+/Mg free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. Hum. Reprod.*, 13:2880-3.
- DRÜSEDAU, M.; DREESEN, J.D.; DERKS-SMEETS, I.; COONEN, E.; VAN GOLDE, R.; VAN ECHTEN-ARENDS, R.; KASTROP, P.M.M.; BLOK, M.J.; GÓMEZ-GARCÍA, E.; GERAEDTS, J.P.; SMEETS, H.J.; DE DIE-SMULDERS, C.E. & PAULUSSEN, A.D., 2013. *PGD for hereditary breast and ovarian cancer: the route to universal tests for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. European Journal of Human Genetics*, 21, 1361–1368.
- ERCOLI, S.; PEDRUEZA, J. y MERCADO, C., 2009. 1er premio - Biológico: DGP: técnica e indicaciones. Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva - II Curso Superior Bidual. *Reproducción*, 24:62-73.
- FINDLAY, I., 2000. *Pre-implantation genetic diagnosis. British Medical Bulletin*, 56 (No 3) 672-690.
- FLORENSA, M., 2011. Diagnóstico genético preimplantacional para enfermedades de aparición tardía. *Rev. Asoc. Est. Biol. Rep.*, Vol. 16, Nº 1, pag 45-46.
- FRAGOULI, E., 2007. *Preimplantation genetic diagnosis: present and future. J. Assist. Reprod. Genet.*, 24:201–207.
- GARCÍA, J.A., 2007. Enfermería en reproducción humana. Librería-Editorial Dykinson, 228 páginas.
- GIRARDET, A.; CLAUSTRES, M., 2001. *Preimplantation genetic diagnosis and monogenic diseases. In "Molecular genetic analysis of rare diseases in 2007: selected examples". Invited review. Research signpost book* .
- GLEICHER, N., KUSHNIR, V.A. & BARAD, D.H., 2014. *Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. Reproductive Biology and Endocrinology*, 12:22.
- GÓMEZ, E., 2002. Mesa Redonda: Análisis Clínicos: Futuro de las Especializaciones Farmacéuticas Genética-Citogenética-Genética Molecular. *XIII Congreso Nacional Farmacéutico*, pag. 1-8.
- HARDY, K.; MARTIN, K.L.; LEESE, H.J.; WINSTON, R.M. & HANDYSIDE, A.H., 1990. *Human Preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. Hum. Reprod.*, 5:708-4.
- HENS, K.; DONDORP, W.; HANDYSIDE, A.H.; HARPER, J.; NEWSON, A.J.; PENNING, G.; REHMANN-SUTTER, C. & DE WERT, G., 2013. *Dynamics and ethics of comprehensive preimplantation genetic testing: a review of the challenges. Human Reproduction Update*, vol.19, Nº 4, 366-375.

- HERSHLAG, A.; PAINE, T.; COOPER, G.W.; SCHOLL, G.M.; RAWLINSON, K. & KVAPIL, G., 1999. *Monocytotic twinning associated with mechanical assisted hatching*. *Fertil. Steril.*, 71:144-6.
- JONES, A.E.; WRIGHT, G.; KÜRT, H.I.; STRAUB, R.J. & NAGY, Z.P., 2006. *Comparison of laser-assisted hatching and acidified Tyrode's hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomized trial*. *Fertil. Steril.*, 85:487-91.
- JORIS, H.; DE BOS, A.; JANSSENS, R.; DEVROEY, P.; LIEBAERS, I. & VAN STEIRTEGHEM, A., 2003. *Comparison of the results of human embryos biopsy and outcome of PGD alter zona drilling using acid Tyrode medium or a laser*. *Hum. Reprod.*, 18:1986-92.
- KANAVAKIS, E. & TRAEGER-SYNODINOS, J., 2002. Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice. *J. Med. Genet.*, 39:6-11.
- LEMER, J. y URBINA, M.T., 2008. FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA. Caracas: *Editorial Médica Panamericana*. ISBN:9789806908161.
- LÓPEZ-PEDRAZA, M.J.; HERNÁNDEZ, M.T.; GUERRA, M. y BLASCO, J.A., 2012. Eficacia, efectdad, seguridad y costes del Diagnóstico Genético Preimplantacional = Systematic Review of the efficacy, effectiveness, safety and cost of Preimplantational Genetic Screening. Madrid: Plan de Calidad para el SNS del MSSSI. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, Agencia Laín Entralgo. Colección: Informes, estudios e investigación. *Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Serie: Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias*. UETS 2011/04). NIPO: 725-12-048-5; 680-12-098-X.
- MA, S.; ROWE, T. & YUEN, B.H., 2006. *Impact of the assisted hatching on the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a prospective, randomized clinical trial and pregnancy follow-up*. *Fertil. Steril.*, 85:895-900.
- MAKRAKIS, E.; ANGELI, I, AGAPITOU, K.; PAPPAS, K.; DAFERERAS, A. & PANTOS, K., 2006. *Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes*. *Fertil. Steril.*, 86:1596-1600.
- MALTER, H.; SCHIMMEL, T.; CALDERÓN, G. & COHEN, J., 2001. *Use of lasers in assisted reproduction*. *Annual Review of Preimplantation Embriology*, 147-156.
- MARTÍNEZ, M.; SÁNCHEZ, M. y HERNÁNDEZ, E.R., 2008. TRATAMIENTOS REPRODUCTIVOS: Diagnóstico genético preimplantacional en Tratado de Reproducción Humana para Enfermería, Sociedad española de Fertilidad por MATORRAS, R.; HERNÁNDEZ, J. y MOLERO, D. Buenos Aires: Madrid. *Médica Panamericana*. ISBN: 978-84-7903-293-7. Pág. 229-237.
- MARTÍNEZ, M., 2010. Diagnóstico Genético de Preimplantación (PGD). Buenos Aires-*Consultorio de Ginecología y Obstetricia*. Sitio Web: <http://www.martinezmarcelo.com.ar/genetica2.html>
- MORENO, J.M. & LÓPEZ, J..J, 2006. Enciclopedia audiovisual de técnicas de reproducción asistida: Eclosión asistida. *Animatic*, vol.1.
- MORENO, J.M. & LÓPEZ, J..J, 2006. Enciclopedia audiovisual de técnicas de reproducción asistida: Biopsia embrionaria y fijación para FISH. *Animatic*, vol.2.
- MORENO, J.M., 2007. Biopsia embrionaria "Aspectos técnicos". *Asebir*, 12: 17-21.
- MOTTLA, G.I.; ADELMAN, M.R.; HALL, J.I.; GINDOFF, P.R.; STILLMAN, R.J. & JOHNSON, K.E., 1995. *Lineage tracing demonstrates that blastomeres of early cleavage-stage human pre-embryos contribute to both trophectoderm and inner cell mass*. *Hum. Reprod.*, 10: 384-91.
- MUNNÉ, S., 2012. *Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy and Translocations Using Array Comparative Genomic Hybridization*. *Current Genomics*, 2012, 13, 463-470.

- NAKAYAMA, T.; FUJIWARA, H.; YAMADA, S.; TASTUMI, K.; HONDA, T. & FUJII, S., 1999. *Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo-micromanipulator for morphologically lowquality embryos in poor-prognosis infertile patients. Fertil. Steril.*, 71:1014-18.
- PARRIEGO, M.; SOLÉ, M. & VIDAL, F. et al., 2003. *One- or two-cell biopsy; does it affect implantation potencial in PGD? Twin-meeting alpha-andrology. Pag.31.*
- PLATTEAU, P.; STAESSEN, C.; MICHIELS, A.; VAN STEIRTEGHEM, A.; LIEBAERS, I. & DEVROEY, P., 2006. *Which patients with recurrent implantation failure after FIV benefit from PGD for aneuploidy screening? Reprod. Biomed. Online*, 12:334-9.
- RODRIGO, L.; RUBIO, C.; MATEU, E. y BUENDÍA, P., 2014. Capítulo 14: El laboratorio de diagnóstico genético preimplantacional. Instituto Universitario IVI Valencia. Máster en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida. 9ª Edición (2014-2016). 1213-1277.
- RUBIO, C.; RODRIGO, L.; PEREZ-CANO, I.; MERCADER, A.; MATEU, E.; BUENDIA, P. et al., 2005. *Fish screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve FIV outcome. Reprod. Biomed. Online*, 11:497-506.
- RUBIO, C.; RODRIGO, L.; MERCADER, A.; MATEU, E.; SIMÓN, C.; REMOHÍ, J. & PELLICER, A., 2004. El diagnóstico genético preimplantacional y sus nuevas indicaciones en reproducción asistida. *Clin. Invest. Gin. Obst.*, 31(9):314-22.
- SCHIEVE, L.A.; MEIKLE, S.F.; PETERSON, H.B.; JENG, G.; BURNETT, N.M. & WILCOX, L.S., 2000. *Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? Fertil. Steril.*, 74:288-94.
- SCRIVEN, P.N.; KIRBY, T.L. & OGILVIE, C.M., 2011. *FISH for Pre-implantation Genetic Diagnosis. Journal of Visualized Experiments*. 48. <http://www.jove.com/details.php?id=2570>, doi: 10.3791/2570.
- SEPÚLVEDA, S. y PORTELLA, J., 2012. Diagnóstico genético preimplantacional: alcances y límites. *Rev. peru. ginecol. obstet.*, 58: 207-21.1
- SERMON, K., 2002. *Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. Human Reproduction Update*, 8:11-20.
- SILVESTRE OLTRA, J. 2010. DGP en Cáncer Familiar. Sesión Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, *Hospital la Fé, Valencia*. Pág. 1-7.
- SOUTULLO, D., 2006. La selección de embriones mediante diagnóstico preimplantacional en la nueva Ley sobre técnicas de reproducción humana asistida. *Instituto Roche*. Sección Legal.
- STEFFANN, J.; MICHOT, C.; BORGHESE, R.; BAPTISTA-FERNANDES, M.; MONNOT, S.; BONNEFONT, J.P. & MUNNICH, A., 2014. *Parental mosaicism is a pitfall in preimplantation genetic diagnosis of dominant disorders. European Journal of Human Genetics*, 22, 711–712.
- SWANSON, A.; STRAWN, E.; LAU, E. & BICK, D., 2007. *Preimplantation genetic diagnosis: technology and clinical applications. Wisconsin Medical Journal*, 106: 145-152.
- TAN, Y.; YIN, X.; ZHANG, S.; JIANG, H.; TAN, K. & Li, J., 2014. *Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. GigaScience*, 3:30.
- TARIN, J.J.; CONAGHAN, J.; WINSTON, R.M.L. & HANDYSIDE, A.H., 1992. Human embryo biopsy on the second day after insemination for preimplantation diagnosis; removal of a quarter of the embryo retards cleavage. *Fertil. Steril.*, 58:970-6.
- TARIN, J.J. & HANDYSIDE, A.H., 1993. *Embryos biopsy strategies for preimplantation diagnosis. Fertil. Steril.*, 59:943-52.
- THORNHILL, A.R. & SNOW, K., 2002. *Molecular Diagnostics in Preimplantation Genetic Diagnosis. Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 4, No. 1, 11-29.

-VAN DER AA, N.; ESTEKI, M.Z.; VERMEESCH, J.R. & VOET, T., 2013. *Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. Genome Medicine*, 5:71.

-VAN DE VELDE, H.; DE VOS, A.; SERMON, K.; STAESSEN, C.; DE RYCKE, M.; VAN ASSCHE, E. et al., 2000. *Embryo preimplantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. Prenat. Diagn.*, 20:1030-7.

-VANDERVORST, M.; LIEBAERS, I.; SERMON, K.; STAESSEN, C.; DE VOS, A.; VAN DE VELDE, H. et al., 1998. *Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus oocyte complexes. Hum. Reprod.*, 13:3169-76.

-YAN, L.Y.; WEI, Y.; HUANG, J.; ZHU, X.H.; SHI, X.D.; XIA, X.; YAN, J.; LU, C.L.; LIAN, Y.; LI, R.; LIU, P. & QIAO, J., 2014. *Advances in preimplantation genetic diagnosis/screening. Sci. China Life Sci.*, Vol.57, No.7, 665-671.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA:

-PROFESOR EN LÍNEA, 2006. Herencia ligada al sexo, España, visto el 14 de Abril de 2015. http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Herencia_ligada_sex0.html

-INVITRA. ONLINE FERTILITY MAGAZINE, 2014. Genetic disorders and PGD, España, visto el 15 de Abril de 2015. <http://www.invitra.com/genetic-disorders-and-pgd/>

-REPROGENETICS SPAIN, 2003. Anomalías cromosómicas estructurales, Barcelona, España, visto el 15 de Abril de 2015. <http://www.reprogenetics.es/index.php/es/2011-08-12-08-07-16/2013-07-08-10-08-25/anom-estructurales-esp>

-CIVICA. ASOCIACIÓN DE INVESTIGADORES Y PROFESIONALES POR LA VIDA, 2012. ¿Hay alternativa a la tecnología de los “bebés medicamento”?, por Nicolás Jouve de la Barreda España, visto el 20 de Abril de 2015. <http://www.investigadoresyprofesionales.org/drupal/content/%C2%BFhay-alternativa-la-tecnolog%C3%AD-de-los-%E2%80%9Cbeb%C3%A9s-medicamento%E2%80%9D>.

-CENTRO DE MEDICINA EMBRIONARIA, 2013. Enfermedades hereditarias monogénicas, Barcelona, España, visto el 20 de Abril de 2015. http://www.pgdcem.com/terminologia/enfermedades_hereditarias_monogenicas.html

-IVI, 2013. Tratamientos de Reproducción Asistida. Técnicas: DGP, España, visto el 20 de Abril de 2015. <https://www.ivi.es/pacientes/tecnicas-reproduccion-asistida/DGP/>

-GRUPO HOSPITALARIO QUIRÓN, 2011. Diagnóstico genético preimplantacional. España, visto el 20 de Abril de 2015. <http://reproduccion-asistida.quiron.es/index.php/es/diagnostico-genetico-preimplantacional-dgp>

-Blog de genética de la UCM. <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/cariotipo/carioP.htm>

-CIALAB, 2014. Diagnóstico prenatal. Alicante, España, visto el 3 de Mayo de 2015. <http://www.cialab.com/diagnosticoPrenatal.php>

ANEXOS:

ANEXO 1: Listado enfermedades monogénicas. ASEBIR. BOADA, M. et al. Documento Sobre Diagnóstico Genético Preimplantacional y Enfermedades Monogénicas. Rev. Asoc. Est. Biol. Rep. Diciembre 2010 Vol. 15 Nº 2.

ANEXO 2: Ejemplo de protocolo para translocaciones. IVI, 2013.

ANEXO 3: Protocolo de aCGH con plataforma BACs 24sure. IVI, 2013.