

## Trabajo Original

### Diagnóstico genético preimplantatorio por hibridación genómica comparada en *array* en biopsia de trofoblasto en portadores de reordenamientos equilibrados

*Preimplantatory genetic diagnosis by array-comparative genomic hybridization in trophoctoderm biopsy in carriers of balanced rearrangements*

*María Eugenia Ducatelli; Fabián Coco; Belén Irigoyen; Sebastián Neuspiller; Fernando Gismondí;*

*Nicolás Neuspiller; Roberto Coco*

*Fecunditas-Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la Facultad de Medicina UBA*

*E-mail: robertococo@fecunditas.com.ar*

#### Introducción

Es ampliamente conocida la asociación entre anomalías cromosómicas constitucionales e infertilidad. Dentro del espectro de las anomalías cromosómicas del humano, los rearrreglos cromosómicos estructurales balanceados representan aproximadamente el 20% de todas ellas (1). Estas son las translocaciones robertsonianas, translocaciones recíprocas y las inversiones peri y paracéntricas. Todas ellas se caracterizan por no expresar fenotipos somáticos particulares ni retardo mental, pero sí la gran mayoría en vida adulta determinan esterilidad y/o infertilidad; su frecuencia es mucho mayor en población de infértiles respecto de la población general de recién nacidos. Los motivos por los cuales causan infertilidad se relacionan con los disturbios de la sinapsis de los cromosomas involucrados en los rearrreglos, que ocasionan diferentes grados de detención en el proceso meiótico, los que originan gónadas disgenéticas, mientras que los rearrreglos que no perturban la sinapsis de los cromosomas homólogos, los multivalentes y bucles meióticos formados, tienen más posibilidades de segregaciones anormales. Las segregaciones anómalas originan embriones anormales que son responsables de abortos espontáneos y de nacidos malformados por anomalías cromosómicas transmitidas por el portador del rearrreglo. Las translocaciones recíprocas son el producto de dos roturas en dos cromosomas no homólogos e intercambio entre los segmentos fragmentados. Si durante la meiosis los cromosomas no uniformes logran aparearse con los uniformes, forman un cuadrivalente. Existen cinco posibilidades de segregación del cuadrivalente: alternada, adyacente 1, adyacente 2, segregación 3:1 y segregación 4:0. Solo la segregación alternada originaría gametos normales aportando los cromosomas uniformes o los dos translocados. Las demás segregaciones originan gametos anormales con diferentes desbalances cromosómicos. El riesgo empírico de formación de gametos anormales en los portadores de rearrreglos cromosómicos coincide o es aún mayor que el teórico

del 80%. Estos datos fueron aportados por los patrones de segregación observados en semen de portadores de translocaciones (2) y por el diagnóstico preimplantatorio en cuerpo polar 1 en mujeres portadoras de translocaciones (3). Las translocaciones robertsonianas, también conocidas como fusiones céntricas, son el producto de la fusión de dos cromosomas acrocéntricos, homólogos o no homólogos, con pérdida de los brazos cortos. Las translocaciones robertsonianas homólogas tienen un riesgo del 100% de originar gametos, nulisómicos o disómicos, mientras que las no homólogas tienen cuatro posibilidades de segregación del trivalente meiótico: alternada, adyacente 1, adyacente 2 y segregación 3:0. Solo la segregación alternada origina gametos normales aportando los acrocéntricos libres o los dos fusionados. Las demás segregaciones originan gametos anormales con diferentes desbalances cromosómicos. El riesgo empírico de formación de gametos anormales en los portadores de fusiones es mucho menor que el 75% teórico. Las inversiones cromosómicas, a diferencia de los rearrreglos anteriores, son producto de dos roturas en el mismo cromosoma con inversión del segmento entre las dos roturas, que puede o no incluir al centrómero. Si el cromosoma invertido no impide la sinapsis, origina durante la meiosis un bucle meiótico. La segregación del par puede ser normal (disyunción normal), anormal (disyunción anormal) u originar cromosomas recombinados con deficiencia-duplicación parcial de segmentos cromosómicos como resultado de un intercambio asimétrico favorecido por el bucle. El riesgo empírico observado en los gametos de los portadores de inversiones en general es más benevolente que el teórico y depende fundamentalmente del cromosoma y tamaño del segmento invertido.

Se debería señalar la diferencia entre los diferentes porcentajes en los riesgos cromosómicos en etapa preimplantacional, embrio-fetal y nacidos. Los riesgos en la formación de gametos anormales y en los embriones preimplantados son mucho mayores a los observados en el segundo trimestre del embarazo o en el recién nacido,

debido a que la mayoría de las anomalías cromosómicas son letales. La letalidad de las aneuploidías completas es del 99%, perdiéndose la mayoría en etapa preimplantatoria. En cambio, las aneuploidías parciales pueden no perderse y dar lugar a nacidos malformados (4). Por este motivo, los portadores de rearrreglos cromosómicos equilibrados o balanceados son los candidatos ideales para el diagnóstico preimplantatorio, sobre todo si requieren de los procedimientos de fecundación in vitro y/o ICSI para concebir (5).

Desde el advenimiento del PGD, sigla que se usa mundialmente para la designación del diagnóstico genético preimplantatorio, existen tres tipos de biopsias: en cuerpos polares, en embriones clivados de día 3 y en trofoblasto del blastocisto en día 5. De acuerdo con los últimos datos del *PGD Consortium* de ESHRE, el 16,3% de los diagnósticos efectuados fueron en cuerpos polares; el 79,8% en blastómeras D3 y el 2,3% en blastocistos D5. De acuerdo con el último registro de 1213 PGD en portadores de fusiones céntricas no homólogas, el 72% de los ciclos lograron tener transferencia con embriones no aneuploides con una tasa de embarazo por aspiración del 21% y por transferencia, del 30%. De 2413 ciclos de PGD en portadores de translocaciones recíprocas, el 58% de los ciclos lograron transferencia con embriones no afectados, con una tasa de embarazo por aspiración del 14% y por transferencia, del 24% (6).

El blastocisto es el máximo grado de desarrollo que puede alcanzar un embrión in vitro y está caracterizado por tres elementos: el macizo celular interno (MCI), la capa celular externa o trofoblasto y el blastocelo. Un blastocisto usualmente tiene más de 100 células. La mayoría de sus células conformarán la placenta, vellosidades coriales y estructuras extraembrionarias. Solo un pequeño porcentaje del MCI diferenciará al embrión una vez finalizada la implantación del preembrión. Por lo tanto, la biopsia de trofoectodermo se la puede considerar equivalente a la punción de vellosidades coriónicas (VC), con sus mismas limitaciones en cuanto a que la constitución hallada no corresponda con la constitución del embrión-feto-nacido. La eficacia diagnóstica se estima superior al 98%.

Cuando se toma la decisión de hacer biopsia en trofoectodermo es preferible hacer transferencia en ciclo diferido, debido a que no todos los blastocistos se consiguen en día 5 y los estudios genéticos demandan su tiempo. En la actualidad, las mejores condiciones de las modernas incubadoras para el desarrollo embrionario in vitro, la mejora en los medios de cultivo, los buenos resultados de la vitrificación y la transferencia diferida, están convirtiendo a la biopsia de blastocisto en la mejor opción para el PGD, por la robustez de los resultados, el menor costo y el trabajo más económico en equipo (7).

Presentamos nuestra experiencia con biopsia de blastocisto y transferencia diferida en 15 ciclos de PGD en 10 portadores de translocaciones recíprocas, 2 translocaciones robertsonianas y 3 inversiones pericéntricas, todas evaluadas con hibridación genómica comparada en *array* (aCGH) con la plataforma de 24 Sure plus de BlueGnome®.

### Pacientes y métodos

Las parejas accedieron al PGD por abortos recurrentes, fallas iterativas en FIV/ICSI, mortinatos malformados y esterilidad primaria de causa femenina y masculina.

Los reordenamientos equilibrados fueron los siguientes:

#### a) *Translocaciones recíprocas*

1. 46,XX,t(7;11)(q11.2;q12)
2. 46,XX, der(14)t(14;22)(q32;q11.1)-22
3. 46,XY,t(13;17)(q14;q23)
4. 46,XX,t(6;10)(q13;q24)
5. 46,XY,t(3;6)(q26;q24)
6. 46,XX,t(9;13)(q34.3;q14.3)
7. 46,XX, t(1;8)(q41-42;q12)
8. 46,XX,t(6;7)(q23;q34)
9. 46,XY,t(3;8)(p21;p11.2)
10. 46,XX,t(9;13)(q21;q21.2)

#### b) *Translocaciones robertsonianas o fusiones céntricas*

1. 45,XY,rob(13;21)(q10;q10)
2. 45,XY,rob(13;14)(q10;q10),9ph

#### c) *Inversiones pericéntricas*

1. 46,XY, inv(5)(p12q22)
2. 46,XX, inv(5)(p14q21)
3. 46,XY, inv(9)(p21q22)

El promedio de edad de las mujeres fue 34,4 años (r: 25-46 años). Previo al PGD, en las mujeres se evaluó el perfil hormonal (FSH, LH, E2 y HAM), se realizó el recuento de folículos antrales e histerosalpingografía. En los varones, se realizó espermograma con espermocultivo completo.

La estimulación ovárica se realizó con gonadotrofinas recombinantes y antagonistas o agonistas de la GnRH. Aspiración ovocitaria transecográfica por vía vaginal 36 h posaplicación hCG.

En todos los casos se realizó ICSI, no por estar indicado en todos, sino por protocolo del PGD.

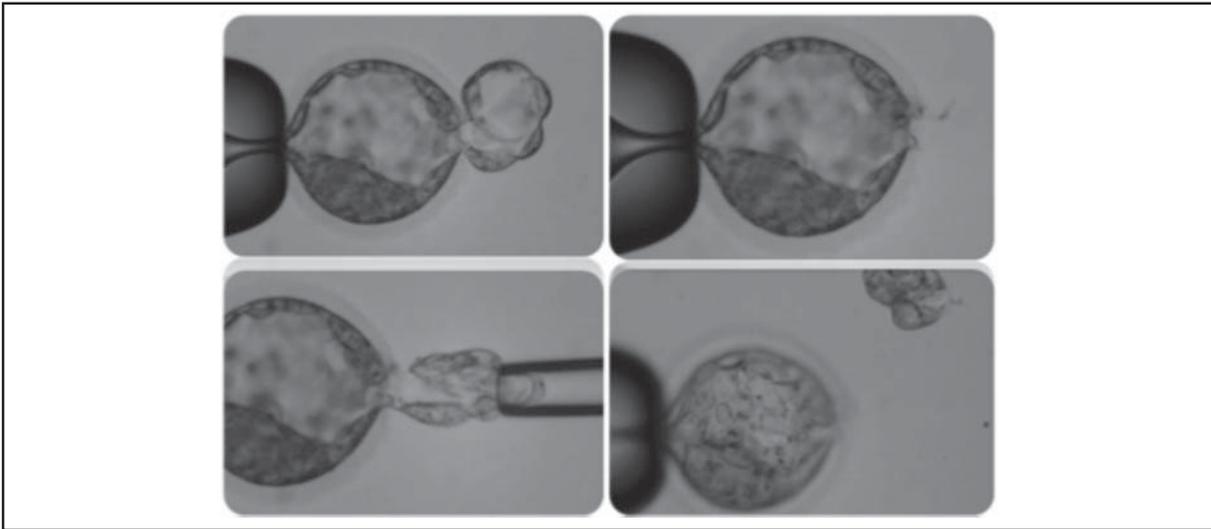
Los ovocitos fecundados normales se cultivaron hasta 5/6 días hasta alcanzar el estado de blastocisto. En día 4 se perforó la zona pelúcida con disparos láser para favorecer la eclosión del blastocisto y facilitar la remoción del trofoblasto protruido. Para efectuar la biopsia, se prepararon placas de biopsia con una hilera de 4 microgotas que

contenían 25 ul de medio de biopsia sin calcio ni magnesio. En la primera microgota se colocó el blastocisto y con ayuda del microscopio micromanipulativo, se lo sostuvo con una micropipeta sujetora del lado opuesto al de las células protruidas, las cuales fueron cortadas con la ayuda de unos disparos láser y aspiradas con una micropipeta de biopsia de 25 um de diámetro (**FIGURAS 1-2**). Realizada la biopsia, todos los blastocistos biopsiados fueron vitrificados en *cryolocks* y las células del trofoblasto removidas de cada blastocisto fueron lavadas en las tres microgotas restantes y colocadas en un tubo para

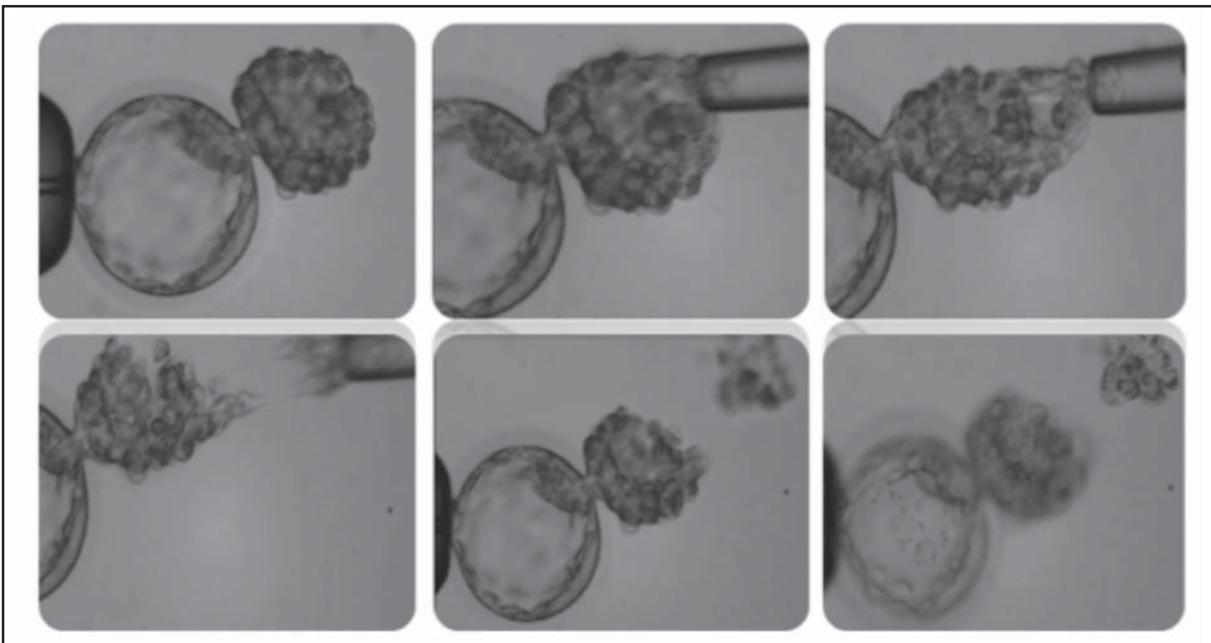
su posterior estudio del cariotipo molecular. Se utilizó la plataforma 24 Sure plus de BlueGnome®. Solamente un blastocisto desvitrificado normal fue transferido en un ciclo diferido al estimulado, preparando el endometrio con estrógenos y progesterona.

### Resultados

El número de ovocitos aspirados varió de 5 a 28 ( $\bar{x}$  : 14,1); el de ovocitos fecundados normales de 4 a 19 ( $\bar{x}$  : 8,9) y el número de blastocistos biopsiados de 1 a 10 ( $\bar{x}$  : 4,1).



**FIGURA 1.** Biopsia de un blastocisto eclosionando el trofoblasto. Nótese que solo se aspira el trofoblasto eclosionado. Video <http://youtu.be/IFjmcR5BnUw>



**FIGURA 2.** Biopsia de un blastocisto eclosionando trofoblasto y parte del macizo celular interno. Nótese que solo se aspira parte del trofoblasto. Video <http://youtu.be/DXjlpGcil5Q>

Todos ellos tuvieron al menos un blastocisto para biopsiar.

En el grupo de pacientes con translocaciones recíprocas, se biopsiaron 33 blastocistos. Veinte (61%) tuvieron cariotipos normales (**FIGURA 1**), 10 con segregaciones anormales del cuadrivalente y 7 con anomalías de cromosomas no involucrados en la translocación

En el grupo de pacientes con translocaciones robertsonianas, se biopsiaron 14 blastocistos. Nueve (64,3%) tuvieron cariotipos normales, uno con segregación anormal del trivalente y cuatro con anomalías de cromosomas no involucrados en la translocación robertsoniana.

En el grupo de pacientes con inversiones pericéntricas, se biopsiaron 15 blastocistos. Nueve (60%) tuvieron cariotipos normales, dos con cromosomas recom-

binados producto de aneusomía de recombinación de las inversiones y cuatro con anomalías de cromosomas no involucrados con los rearrreglos.

En la **TABLA I** figuran los resultados de los cariotipos anormales de los diferentes reordenamientos.

De los 15 ciclos realizados, 12 de ellos fueron transferidos con un blastocisto normal desvitrificado. Cinco (41,6%) lograron el embarazo y uno de ellos abortó espontáneamente a las 8 semanas de gestación. Tres de las parejas aún no fueron transferidas.

### Discusión

Los PGD en los portadores de rearrreglos equilibrados previos al advenimiento de los *arrays* se abordaban por FISH utilizando sondas de los cromosomas

Reordenamientos	Cariotipos embrionarios anormales hallados	Tipo de segregación	Anomalías no involucradas
<b>Translocaciones recíprocas</b>			
46,XY,t(3;8)(p21;p11.2)	46,XY,der(3)t(3;8)(p21;p11.2) 46,XY,der(3)t(3;8)(p21;p11.2) 46;XX,+3,-22	Adyacente 1 Adyacente 1 Seg 3:1	Monosomía 22
46,XX,t(6;10)(q13;q24)	45,X 46,XX,der(6)t(6;10)(q13;q24)	Adyacente 2	Monosomía X
46,XX,t(6;7)(q23;q34)	45,XY,-22 46,XX,-7,+13 46,XX,der(6)t(6;7)(q23;q34)	Seg 3:1 Adyacente 2	Monosomía 22 Trisomía 13
46,XX,t(1;8)(q41-42;q12)	46,XY,der(1)t(1;8)(q41-42;q12) 45,XY,-8 46,XY,der(1)t(1;8)(q41-42;q12)	Adyacente 1 Seg 3:1 Adyacente 1	
46,XY,t(3;6)(q26;q24)	45,XY,-15		Monosomía 15
46,XX,t(9;13)(q21;q21.2)	46,XX,+9,-21 47,XX,+2,-9,+13,+17,-18,+20,-21	Seg 3:1	Monosomía 21 Caótico
<b>Fusiones céntricas</b>			
45,XY,rob(13;21)(q10;q10)	45,XY,-13 47,XY,+3 45,XX,-16 47,XXY	Seg 2:1 (Ady 2)	Trisomía 3 Monosomía 16 Disomía X
45,XY,rob(13;14)(q10;q10),9ph	45,XX,-21		Monosomía 21
<b>Inversiones pericéntricas</b>			
46,XX,inv(5)(p14q21)	46,XX,der(5)inv(5)(p14q21)dup(5q) 46,XX,der(5)inv(5)(p14q21)dup(5q)	Recombinación Recombinación	
46,XY,inv(5)(p12q22)	45,XX,-16 47,XXY 46,XY,+6,-10		Monosomía 16 Disomía X Trisomía 6 + monosomía 10
46,XY,inv(9)(p21q22)	47,XXY		Disomía X

**TABLA I.** Cariotipos embrionarios anormales involucrados y/o no en el reordenamiento equilibrado.

involucrados o por QF-PCR utilizando STR ligados a los cromosomas involucrados en los rearrreglos. Hoy con la posibilidad del cariotipado molecular por aCGH (hibridación genómica comparada) o aSNP (polimorfismos de simples nucleótidos) el FISH ya no es recomendable. Si uno tuviera en cuenta los costos de los cariotipos moleculares, estos deberían realizarse en aquellos embriones que han alcanzado el grado máximo de desarrollo in vitro, sin embargo, de acuerdo con el último registro del *PGD Consortium* de la ESHRE solo el 2,3% de los PGD se realiza en biopsia de trofoblasto, como así también la transferencia en ciclos diferidos no estimulados. Frente a los mejores resultados que se estaban publicando con la transferencia en blastocisto en ciclos frescos y diferidos, en nuestro programa decidimos abandonar la biopsia en D3 por la de blastocisto en D5/6 con transferencia diferida al ciclo estimulado. La menor invasividad de la biopsia, el mayor número de células aspiradas, la robustez de los resultados y la programación de los estudios en días laborables fueron los responsables del cambio. El estudio genético en una sola molécula de ADN es difícil y un verdadero desafío tanto para los pacientes como para el equipo biomédico. Las posteriores publicaciones sobre la revisión sistemática y metaanálisis de 11 ensayos que mostraron mejores resultados obstétricos y perinatales con los embriones criopreservados *versus* no-criopreservados (8-12) nos ha permitido no arrepentirnos de la decisión de tal cambio que, en definitiva, favorece la eficacia de los PGD.

En la presente serie de 15 ciclos, de 63 blastocistos biopsiados, 38 resultaron con cariotipos normales (61%) y 25 con cariotipos anormales (39%). Estos valores son muy inferiores a lo hallado en biopsias en D3 (13-15). Si bien hay una selección hacia la euploidía con el desarrollo de un buen blastocisto, la eficacia en el caso de los portadores de rearrreglos bajó a la mitad respecto de lo observado en D3, lo que reafirma que en los portadores de rearrreglos que requieran FIV/ICSI es conveniente la realización del PGD ya que esos blastocistos aneuploides pueden implantar y terminar en un nacido malformado, sobre todo por aneuploidías parciales. De los 25 cariotipos anormales, 15 presentaron anomalías de cromosomas enteros no involucrados en el reordenamiento. Estas anomalías pueden deberse a un efecto intercromosómico durante la meiosis del portador del rearrreglo, pero también podría deberse a una no disyunción en la pareja simplemente por efecto de la edad materna. Nosotros, en el caso del varón con la translocación robertsoniana 13,21, usando marcadores ligados a los cromosomas aneuploides, demostramos que las aneuploidías correspondían a la pareja, por lo tanto, en ese caso se descartó la existencia de efecto intercromosómico (16).

Consideramos que 5 de 12 transferencias de un único blastocisto euploide con embarazo es un excelente incentivo como para continuar con la biopsia de trofoblasto y transferencia diferida en ciclo diferido. En todos

los casos, al menos se logró biopsiar un blastocisto y en todos se obtuvo al menos uno para transferir. Otro punto no menos importante es el económico, que adquiere relevancia en nuestras economías, sobre todo por el costo de un cariotipo molecular, por lo que es más **lícito pagar el estudio para un embrión potencialmente implantable que para uno que pueda detenerse antes de llegar a blastocisto.**

### Conclusiones

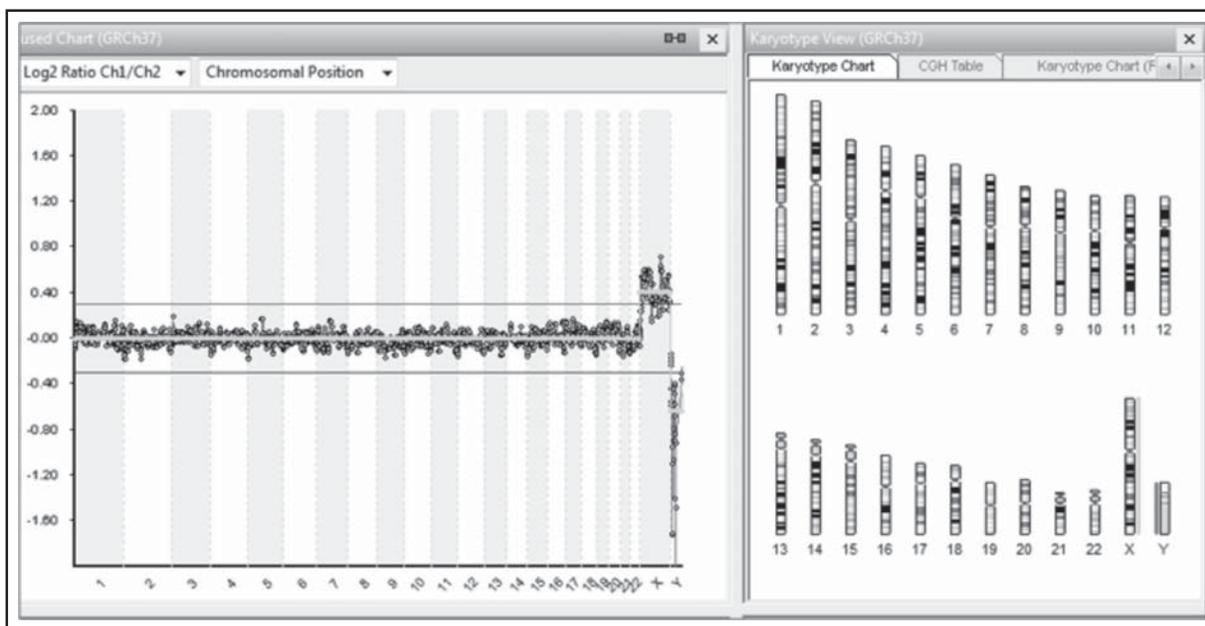
Los cariotipos moleculares que se realizan en pocas células son costosos. Por lo tanto, su realización en embriones potencialmente transferibles toma su relevancia sobre todo en nuestras economías. Pasar de la realización del estudio en una única célula a unas cuantas células significa que en la mayoría de los estudios se obtendrán resultados. De hecho en nuestra serie de 63 muestras con varias células de trofoblasto del blastocisto, en todos se obtuvo resultado, mientras que en una sola blastómera el riesgo de no tener resultados es de entre el 10 y el 15%. Un programa de PGD con transferencia en fresco exige que el equipo de genetistas moleculares trabaje de lunes a lunes *full time*. En un programa de PGD con transferencia diferida es mucho más programable el trabajo de los genetistas y ante cualquier duda con los resultados de los estudios, se pueden repetir o completar con estudios complementarios.

Hoy no existen dudas de que la tasa de embarazo con la transferencia en ciclo no estimulado es mejor en cuanto a tasa de embarazo y resultados obstétricos y perinatales que las transferencias en fresco. Los mejores resultados probablemente se deban a una mejor sincronización embrión-endometrio en un ciclo natural o preparado fisiológicamente y a la ausencia de altas concentraciones hormonales durante el desarrollo embrionario pre y posimplantación, que perjudica la receptividad endometrial (10). Por lo tanto, sostenemos que el cambio de la biopsia de blastómeras en D3 por el de trofoblasto en D5/6 con transferencia diferida de los blastocistos normales desvitrificados puede mejorar la tasa de embarazo y disminuir la tasa de abortos espontáneos y el riesgo de malformados por cromosomopatías en la descendencia de los portadores de rearrreglos equilibrados.

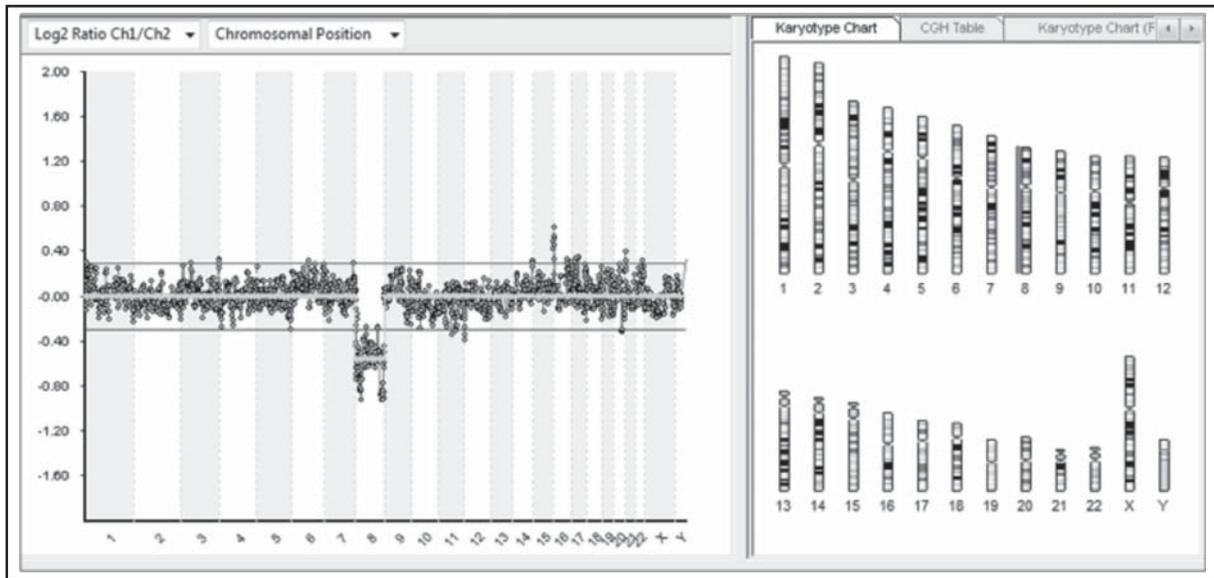
### Referencias

1. Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* 1991;87(1):81-3.
2. Coco R, Coco Ludueña F, Urquiza M, Minzman J, Gallo A, Neuspiller N. Riesgo genético reproductivo en portadores de rearrreglos cromosómicos. *Reproducción.* 2005;20(1):25-36.
3. Durban M, Benet J, Boada M, Fernandez E, Calafell JM, Laila JM, et al. PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translo-

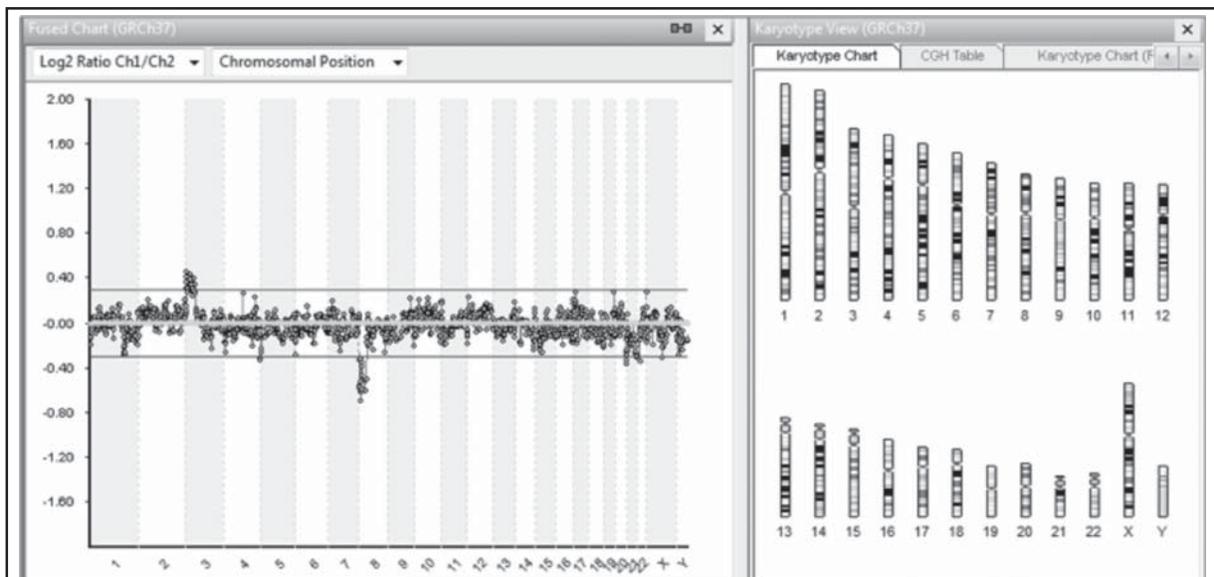
- cations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update*. 2001;7(6):591-602.
4. Scriven PN, Flinter FA, Braude PR, Ogilvie CM, et al. Robertsonian translocations—reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2001;16(11):2267-73.
  5. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Genet*. 2001;2:280-291.
  6. Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, De Rycke M, Moutou C, Pehlivan T, Derks-Smeets IAP, Harton G. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum Reprod*. 2012;27(7):1887-1911.
  7. Coco R, Mondadori A, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F, Neuspiller S, Gismondi FL, Neuspiller N. Preimplantation diagnosis in blastocyst biopsy and deferred cycle transfer. *JBRA Assist Reprod*. 2012;16(5):268-270.
  8. Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, Haan EA, Chan A. Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects. *N Engl J Med*. 2012;366:1803-1813.
  9. Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharva S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012;98(2):368-377.
  10. Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. Controlled ovarian hyperstimulation for In Vitro Fertilization alters endometrial receptivity in Humans: Protocol effects. *Biol Reprod*. 2010;82(4):679-686.
  11. Shapiro B, Daneshmand S, De Leon L, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2012;98(6):1490-1494.
  12. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, Checa MA. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;99(1):156-152.
  13. Harper JC, Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet*. 2011;131(2):175-186.
  14. Yinghui Ye, Yuli Qian, Chenming Xu, Fan Jin. Meiotic segregation analysis of embryos from reciprocal translocations carriers in PGD cycles. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(1):83-90.
  15. Chang EM, Han JE, Kwak IP, Lee WS, Yoon TK, Shim SH. Preimplantation genetic diagnosis for couples with a Robertsonian translocation: practical information for genetic counseling. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(1):67-75.
  16. Ducatelli ME, Mondadori A, Coco F, Neuspiller S, Mincman J, Coco R. PGD in carriers of Reciprocal Translocations by aCGH in trophoctoderm biopsy and deferred cycle transfer. *JBRA Assist Reprod*. 2013;17(2):122-123.



**FIGURA 3.** Cariotipo molecular normal (46,XX).



**FIGURA 4.** Cariotipo anormal: 45,XY,-8. Nótese la ausencia completa del cromosoma 8 (embrión proveniente del caso con  $t(1;8)(q41-q42;q12)$ ), que corresponde a una segregación 3:1).



**FIGURA 5.** Cariotipo anormal: 46,XY,der(3)  $t(3;8)(p21;p11.2)$ . Nótese la duplicación parcial en el cromosoma 3 y la delección parcial en el cromosoma 8 (embrión proveniente del caso con  $t(3;8)(p21;p11.2)$ ), que corresponde a una segregación Adyacente 1).