

IMPACTO DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN EMBRIONES HUMANOS

The impact of preimplantation genetic diagnosis on human embryos

Javier García-Ferreyra

FERTILAB Laboratorio de
Reproducción Asistida, Lima
- Perú
Unidad de Fertilidad del
Hospital Alcívar, Guayaquil
- Ecuador.

E-mail:
jgarciaf@fertilab.pe

RESUMEN

Las anomalías cromosómicas son extremadamente comunes en ovocitos y embriones humanos y están relacionados a una variedad de resultados negativos en ciclos natural y aquellos que usan técnicas de reproducción asistida. Los embriones aneuploides no logran implantar, son abortados o puede producir nacidos con serios problemas médicos (p.e. síndrome de Down). El diagnóstico genético preimplantacional (PGD) es una técnica que permite detectar aneuploidía en embriones y mejorar los resultados clínicos de los tratamientos de reproducción asistida, asegurando que el embrión elegido para transferencia sea cromosómicamente normal.

Palabras clave: Diagnóstico genético preimplantacional, humano, embrión

ABSTRACT

Chromosome abnormalities are extremely common in human oocytes and embryos and are associated with a variety of negative outcomes for both natural cycles and those using assisted reproduction techniques. Aneuploidies embryos may fail to implant in the uterus, miscarry, or lead to children with serious medical problems (e.g., Down syndrome). Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is a technique that allows the detection of aneuploidy in embryos and seeks to improve the clinical outcomes of assisted reproduction treatments, by ensuring that the embryos chosen for the transfer are chromosomally normal.

Keywords: Preimplantation genetic diagnosis, human, embryos

INTRODUCTION

El PGD es una técnica de laboratorio complementaria a la fecundación *in vitro* (FIV) que detecta aneuploidías (alteraciones en el número de cromosomas) en embriones antes de ser implantados al útero de una paciente, evitando así la transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia. Estudios citogenéticos han demostrado un aumento en los errores de segregación de cromosomas durante la ovogénesis de mujeres principalmente a partir de los 37 años (Kang *et al.*, 2016); lo cual incrementa el riesgo de aneuploidías embrionarias, abortos espontáneos y una reducción en las tasas de implantación por alteraciones cromosómicas en el embrión que son incompatibles con la diferenciación celular y desarrollo. En el caso de varones, diversos estudios vienen demostrando una relación entre la edad, fragmentación del ADN espermático, calidad y tasa de aneuploidía en embriones (Borini *et al.*, 2006; García-Ferreya *et al.*, 2012; 2014). El estudio de los cromosomas puede ser en ovocitos (cuerpo polar) o células embrionarias (blastómeras) en día+3 o día+5, que son obtenidas mediante técnicas de micromanipulación de biopsia celular. El material genético es entonces analizado hasta para 12 cromosomas por FISH (hibridación *in situ* fluorescente), o para los 24 cromosomas por aCGH (hibridación genómica comparada por arrays) o NGS (secuenciación de siguiente generación). Por tanto, el diagnóstico genético embrionario, mediante la transferencia de embriones euploides, permite incrementar las tasas de embarazo e implantación en casos de edad materna avanzada, parejas con fallas repetidas de implantación y abortos inexplicados, y parejas con factor masculino severo.

Factores que inducen a la aneuploidía en embriones

La morfología sigue siendo el método de selección embrionaria más comúnmente utilizado en los laboratorios de reproducción humana asistida; sin embargo, la morfología no siempre se relaciona con altas tasas de embarazo e implantación, y es en muchos casos la presencia de anomalías cromosómicas o aneuploidía es el principal factor genético que afecta el éxito de la reproducción humana. La frecuencia de aneuploidía en embriones humanos producidos por FIV oscila entre 56-84% (Fragouli *et al.*, 2014) y su ocurrencia se relaciona tanto a factores maternos como paternos.

La edad materna avanzada es el principal factor de la alta incidencia de aneuploidía embrionaria (Munné *et al.*, 1995; 2002). El proceso de ovogénesis considera dos divisiones de meiosis (I y II), y dos estados de maduración atemporal durante los cuales el ovocito se encuentra en arresto de su desarrollo. El arresto en meiosis I muchas veces durante varias décadas (donde los cromosomas se encuentran alineados en el huso meiótico) es el factor principal del origen de las aneuploidías en futuros embriones. Battaglia *et al.* (1996) mostró un 79% de husos meióticos anormales en mujeres de 40-45 años. Así, el envejecimiento incrementa el riesgo de alteraciones en el ARN mensajero, pool de proteínas, función de mitocondrias y reducción en moléculas de cohesión que participan en la unión de cromátidas hermanas que afectan la segregación de cromosomas durante la división celular (Duncan *et al.*, 2012). Adicionalmente, con el avance de la edad ocurre una acumulación de radicales libres en el ovocito, pobre vascularización del folículo antral durante su maduración, y una reducción de nutrientes críticos durante las divisiones celulares que conllevan a fragmentación de cromosomas y finalmente un aumento de aneuploidía en embriones (Wells *et al.*, 2005; Jaroudi *et al.*, 2009)

Como factores paternos, alteraciones en el centrosoma que conduzca a un anormal ensamblaje del huso y segregación de cromosomas, desórdenes en la espermatogénesis que generen gametos aneuploides, pacientes con oligoastenoteratozoospermia o azoospermia no obstructiva y espermatozoides con defectos severos pueden producir ciclos mitóticos anormales y finalmente embriones caóticos (Magli *et al.*, 2009). Por otro lado, durante el proceso de envejecimiento masculino ocurren una serie de cambios que afectarían la fertilidad en mayor o menor grado; así, hay una disminución en la concentración de esteroides séricos, volumen testicular, motilidad y producción diaria de espermatozoides, alteración de la histomorfología testicular y riesgo de desórdenes cromosómicos (Handelsman and Staraj, 1985). Asimismo, hay un incremento significativo en el número de espermatozoides con ADN dañado a partir de los 50 años que incrementa el riesgo de aneuploidía que lleva a una reducción en las tasas de embarazo e implantación (García-Ferreya *et al.*, 2015).

Biopsia de ovocitos y embriones

La biopsia para diagnóstico genético se realiza por micromanipulación y consiste en la apertura de la zona pelúcida de forma mecánica (ovocitos, embriones en clivaje), con solución ácida de tyrode (embriones en clivaje) o pulsos de láser (ovocitos, embriones en clivaje, blastocistos) y posterior remoción de una o más células para análisis cromosómico. Esta puede ser hecha en el ovocito (uno o dos cuerpos polares), embrión en estadio de clivaje (una blastómera) o en estadio de blastocisto (5-10 células del trofoectodermo) (Figura 1). La biopsia de cuerpo polar solo es realizada en países donde la biopsia de embriones es considerada ilegal (p.e. Italia, Alemania, Austria). La remoción del primer y/o segundo cuerpo polar es realizada 4-8 horas posteriores a la inseminación. A pesar que el análisis de cuerpos polares permite importante información acerca del origen de las aneuploidías, ésta sólo permite el diagnóstico de anomalías genéticas o cromosómicas de origen materno, no detecta las anomalías post-meióticas y tampoco considera que tanto el primer como el segundo cuerpo polar son propensos a errores meióticos (Capalbo *et al.*, 2013).

En la biopsia de embriones en estadio de clivaje, la biopsia en día+3 considera la extracción de una única blastómera; dado que extraer dos o más afecta el desarrollo embrionario y potencial de implantación (Goossens *et al.*, 2008). El principal inconveniente con la biopsia de blastómeras es el riesgo de embriones mosaico (embriones que tienen múltiples células aneuploides) que darían resultados falso-positivo o falso-negativo observado en programas de diagnóstico genético. Usualmente los resultados de genética están disponibles en 1-2 días posterior a la biopsia lo cual permite realizar la transferencia embrionaria en fresco en día+5/día+6.

En biopsias de blastocisto (día+5/+6) la apertura de la zona pelúcida se realiza en día+3 del desarrollo embrionario, luego los embriones continúan cultivo hasta día+5 en que se realiza la biopsia y en la cual son removidas células del trofoblasto que han sobresalido por el agujero realizado (5-10 células). La biopsia en blastocisto provee mayor número de células relacionado a baja tasa de mosaicismo, mayor ADN para analizar, y por ende una mayor sensibilidad y especificidad del diagnóstico. Dado que no todos los embriones desarrollan hasta el estadio a blastocisto ésta técnica analiza menos embriones; además que el análisis genético toma más de 24 horas mayormente es necesario criopreservar embriones y diferir la transferencia.

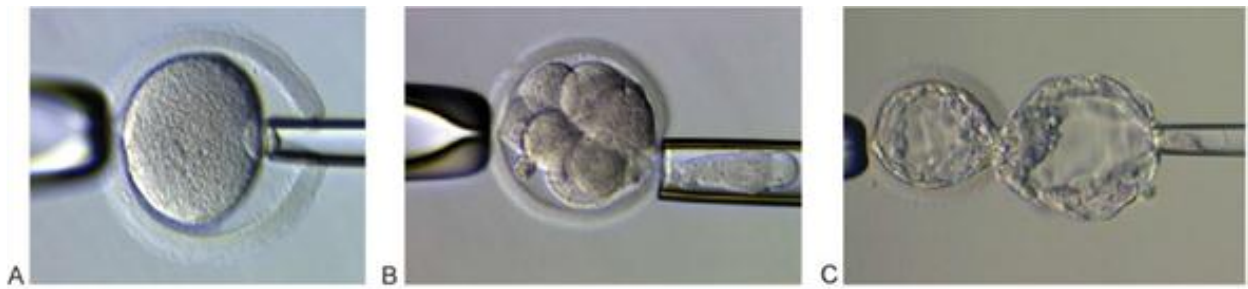


Figura 1. Biopsia en diferentes estadios: (A) Biopsia de cuerpo polar; (B) Biopsia de blastómera; (C) Biopsia de trofoblasto.

Efecto del PGD sobre los resultados clínicos en reproducción asistida

Es claro que la aneuploidía embrionaria en paciente infértiles se incrementa dramáticamente con el aumento de la edad y probablemente por errores de no disyunción durante la meiosis (Figura 2). Así, se observa un aumento en las aneuploidías desde un 73% en mujeres menos de 35 años

hasta un 87% para mujeres de 41 años o más (Fragouli *et al.*, 2014) y mediante la aplicación del diagnóstico genético podemos incrementar las posibilidades lograr un embarazo a término en mujeres de edad avanzada y/o parejas con problemas de fertilidad.

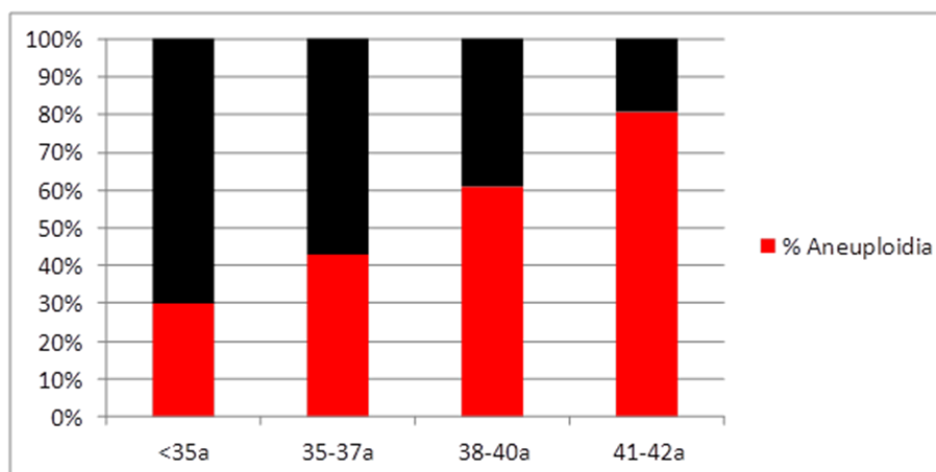


Figura 2. Incremento de las aneuploidías en embriones está directamente relacionado al aumento de la edad materna.

Yang *et al.* (2012) evaluando el efecto del PGD sobre la tasa de embarazo en mujeres de buen pronóstico (<35 años) con transferencia en fresco en día+6, encontraron que el grupo con análisis genético embrionario tuvo significativamente más embarazos clínicos comparados al grupo control (70.9% vs. 45.8%). Por otro lado, Scott *et al.* (2013) compararon 72 pacientes usando análisis por aCGH con 83 controles, mostraron una alta tasa de implantación en pacientes que se transferían embriones genéticamente normales (66.4% vs. 47.9%).

Un estudio multicéntrico que incluyó 913 ciclos de screening genético por aCGH en diferentes clínicas de USA, demostró que luego de la transferencia selectiva de embriones euploides, las tasas de embarazo e implantación son similares en aquellas mujeres reproductivamente jóvenes y aquellas de edad avanzada hasta inclusive los 42 años. Estos resultados demuestran que el incremento de la edad materna sigue siendo la principal causa de aneuploidía embrionaria y que la aplicación del PGD elimina este sobre las tasas de

embarazo e implantación cuando se compara con grupos control de edad similar sin análisis genético embrionario (Harton *et al.*, 2013). Por otro lado, Kang *et al.* (2016) analizaron retrospectivamente las tasas de embarazo, implantación y nacido vivo en 274 ciclos de PGD que fueron separados por edad de la paciente en dos grupos (≤ 37 y > 37 años). Como grupo control fueron analizados los resultados de 863 transferencias de blastocistos en fresco. Los resultados demostraron que el diagnóstico genético no mejora los resultados de mujeres de 37 o menos años; sin embargo, si tiene un efecto positivo sobre las tasas de embarazo, aborto y nacido vivo en mujeres mayores a 37 años.

En relación al efecto paterno, estudios de García-Ferreira *et al.* (2015) mostraron altas tasas de aneuploidía embrionaria y bajas tasas de desarrollo a blastocisto en ciclos con ovocitos donados donde el hombre tenía ≥ 50 años comparado a hombres jóvenes. Asimismo, la aneuploidía en este grupo tendría relación a un alto porcentaje de fragmentación de ADN espermático (Figura 3). Por otro lado, el 5-10% de casos de trisomía 21 son por errores meióticos en la

espermatogenesis (Nicolaidis and Petersen, 1998), existiría un doble de riesgo en varones >50 años de tener un hijo con síndrome de Down (McIntosh *et al.*, 1995), y un mayor número de embriones con trisomía 21 son observados en ciclos de PGD con ovodonación con varones del mismo grupo etario (García-Ferreya, 2016; datos no publicados). Adicionalmente, diversos estudios epidemiológicos han mostrado varias anomalías asociadas a la edad paterna

avanzada como abortos (Nybo Andersen *et al.*, 2004), defectos congénitos al nacimiento (Lian *et al.*, 1986), diversos síndromes relacionados a altos niveles de mutaciones espontáneas como acondroplasia y síndrome de Apert (Crow, 2000), desórdenes neurológicos (Malaspina *et al.*, 2002), y algunos tipos de cáncer (Zhang *et al.*, 1999).

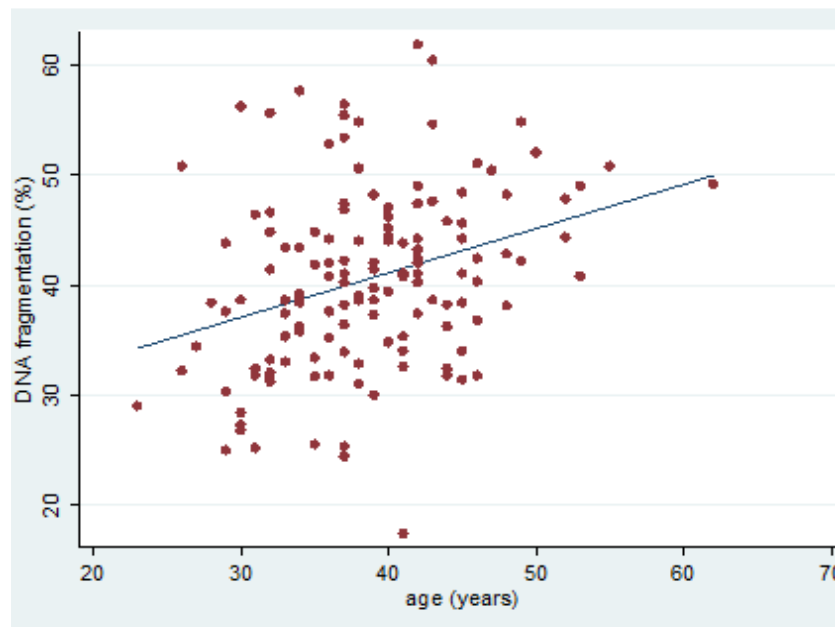


Figura 3. Incremento de la fragmentación del AND espermático con la edad paterna. García-Ferreya *et al.* Sperm DNA fragmentation. *J Fert In Vitro* 2012.

CONCLUSION

El desarrollo del análisis genético embrionario ha revolucionado la reproducción humana asistida, permitiendo incrementar la efectividad de las técnicas de fecundación in vitro mediante la selección de embriones cromosómicamente normales que incrementen las posibilidades de lograr un embarazo y nacido vivo, y así reducir drásticamente los fracasos luego de la transferencia embrionaria.

REFERENCIAS

- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996;11:2217-2222.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876-2881.
- Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Bladi M, Colamaria S, Ubaldi FM, Rienzi L, Fiorentino F. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013;28:509-518.
- Crow JF. The origin, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* 2000;1:40-47.
- Duncan FE, Hornick JE, Lampson MA, Schultz RM, Shea LD, Woodruff TK. Chromosome cohesion decreases in human eggs with advanced maternal age. *Aging cell* 2012;11:1121-1124.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mon Hum Reprod* 2014;20:117-126.
- García-Ferreya J, Romero R, Hilario R, Dueñas-Chacón J. High levels of DNA fragmentation observed in an infertile population attending a fertility center are related to advanced paternal age. *J Fert In Vitro* 2012;2:1-5.
- García-Ferreya J, Villegas L, Romero R, Zavala P, Hilario R, Casafranca G, Dueñas-Chacón J. Sperm DNA fragmentation is significantly increased in those men with morphologically abnormal spermatozoa. *J Fert In Vitro* 2014;2:1-5.
- García-Ferreya J, Luna D, Villegas L, Romero R, Zavala P, Hilario R, Dueñas-Chacón J. High aneuploidy rates observed in embryos derived from donated oocytes are related to male aging and high percentages of sperm DNA fragmentation. *Clin Med Insights Reprod Health*. 2015;9:21-27.
- Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, Van Steirteghem A, Bertrand C, Liebaers I, Devroey P, Sermon K. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one

- or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2008;23:481-492.
- Handelsman DJ, Staraj S. Testicular size: the effect of aging, malnutrition, and illness. *J Androl* 1985;6:144-151.
 - Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, Griffin DK, Wells D. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2013;100:1695-1703.
 - Jaroudi S, Kakourou G, Cawood S, Doshi A, Ranieri DM, Serhal P, Harper JC, SenGupta SB. Expression profiling of DNA repair genes in human oocytes and blastocysts using microarrays. *Hum Reprod* 2009;24:2649-2655.
 - Kang HJ, Melnick AP, Stewart JD, Xu K, Rosenwaks Z. Preimplantation genetic screening: who benefits?. *Fertil Steril* 2016;106:597-602.
 - Lian ZH, Zack MM, Erickson JD. Paternal age and occurrence of birth defects. *Am J Hum Genet* 1986;39:648-660.
 - Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Gordts S, Fredericks V, Crippa A. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online* 2009;18:536-542.
 - Malaspina D, Corcoran C, Fahim C, Berman A, Harkavy-Friedman J, Yale S, Goetz D, Goetz R, Harlap S, Gorman J. Paternal age and sporadic schizophrenia: evidence for de novo mutations. *Am J Med Genet* 2002;114:299-303.
 - McIntosh G, Olshan A, Baird P. Paternal age and the risk of birth defects in offspring. *Epidemiology* 1995;6:282-288.
 - Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-391.
 - Munné S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* 2002;78:234-236.
 - Nybo Andersen AM, Hansen KD, Andersen PK, Davey Smith G. Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study. *Am J Epidemiol* 2004;160:1214-1222.
 - Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo significantly increases in vitro fertilization and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:697-703.
 - Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998;13:313-319.
 - Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Walker DL, Malter H, Delhanty JD, Cohen J. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod* 2005;20:1339-1348.
 - Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, Salem RD. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24.
 - Zhang Y, Kreger BE, Dorgan JF, Cupples LA, Myers RH, Splansky GL, Schatzkin A, Ellison RC. Parental age at child's birth and son's risk of prostate cancer. The Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1999;150:1208-1212.