

Sondas de oligonucleótidos para FISH: primer reporte de su utilización para *screening* de aneuploidías en blastómeras humanas

Laura Kopcow, Claudio Bisioli, Mariana Gomez Peña, Tetsuji Matayoshi, Ignacio De Zuñiga, Marcos Horton

Reproducción 2009; 24:56-61

Introducción

La utilización de la hibridización fluorescente *in situ* (FISH, en su sigla en inglés) para diagnóstico genético preimplantación (DGP) ha permitido la investigación (*screening*) de aneuploidías en embriones humanos preimplantatorios obtenidos mediante fertilización *in vitro* (FIV).

El escaso número de fluorocromos existentes que pueden ser individualizados en un microscopio de epifluorescencia ha limitado la cantidad de cromosomas que pueden ser detectados simultáneamente mediante esta técnica. Para incrementar el número de cromosomas sobre los cuales se puede realizar DGP para *screening* de aneuploidías (DGP-SA) se han utilizado distintas estrategias. El primero en utilizar la técnica de FISH en el diagnóstico preimplantación fue Santiago Munné en 1993 (Munné y col, 1993a), realizando diagnóstico de cromosomas sexuales. En el mismo año este mismo autor publicó la utilización de sondas multicolor para evaluar los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en una misma hibridización (Munné y col, 1993b). En 1999 Luca Gianaroli propuso realizar rondas consecutivas de FISH en una misma blastómera, permitiendo analizar un mayor número de cromosomas (Gianaroli y col, 1999). Esta estrategia insume un tiempo muy prolongado y la repetición de rondas con uso de detergentes de elevada astringencia significa un mayor riesgo de pérdida de ácido desoxirribonucleico (ADN) y de pérdida de señal de fluorescencia (Baart y col, 2004). Hasta el año 2000 existía la posibilidad de evaluar 5 cromosomas simultáneamente gracias

a la combinación de 3 fluorocromos, generando nuevos colores cuando eran observados en filtros de doble o triple bandeado. Sin embargo, estas sondas implicaban un mayor riesgo de error debido a que algunas señales compartían fluorocromos. Posteriormente Bahce y col publicaron en el 2000 un protocolo para FISH utilizando sondas monocolor, introduciendo un *set* comercial de sondas listas para su utilización con cinco fluorocromos distintos (Bahce y col, 2000). Este *set* de sondas comerciales, aunque de costo económico muy elevado, ha sido aplicado ampliamente por la mayoría de los laboratorios que realizan DGP. El máximo número de cromosomas testeados con estas sondas ha sido quince (Baart y col, 2007). Es improbable que con estas sondas comerciales se evalúen los 23 pares de cromosomas debido a que cada desnaturalización e hibridización insume 4 horas y al problema de la astringencia mencionado anteriormente.

Se han desarrollado también nuevas metodologías que permitirían evaluar los 23 pares de cromosomas, como la hibridización genómica comparativa (Wells y Delhanty, 2000; Voullaire y col, 2000), el cariotipo espectral (Marquez y col, 1998), la conversión nuclear (Verlinsky y Evsikov, 1999), los microarreglos (Munné y col, 2008) y la reacción fluorescente y cuantitativa en cadena de la polimerasa (Sato y col, 2003). Se considera que estas nuevas tecnologías son aún experimentales y su uso no está extendido.

Recientemente se han utilizado sondas de FISH que emplean oligonucleótidos marcados para cinco colores correspondientes a distintos cromosomas de núcleos en interfase, lo que ha permitido la lectura de 18 señales en linfocitos en

Correspondencia: Marcos Horton
E-mail: mhorton@fibertel.com.ar

menos de 24 horas (Aurich-Costa y col, 2008).

El presente trabajo es el primer reporte mundial de utilización de dichas sondas fluorescentes de oligonucleótidos que trabajan con baja astringencia, que permiten realizar el procedimiento de desnaturalización e hibridización en 20 minutos y que, en un término menor a las 24 horas, permitirían la lectura de señales para todos los cromosomas humanos.

Materiales y métodos

Se estudiaron cinco pre-embriones de una pareja que consultó por falla reiterada de FIV y factor masculino severo en 2008. Para la hiperestimulación ovárica controlada la paciente recibió FISH recombinante (Puregon, Organon, EE.UU. y Menopur, Ferring, EE.UU.). En el día 10 del hiperestímulo la paciente recibió 10.000 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG), (Pregnyl, Organon, EE.UU.). El día 12 del hiperestímulo se realizó la aspiración folicular obteniéndose 8 ovocitos de los cuales 7 resultaron ser maduros. Mediante inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) se obtuvieron cinco pre-embriones que evolucionaron hasta día 3.

En ese momento se les practicó una perforación de zona pelúcida con ácido de Tyrode (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE.UU.) en medio libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (G-PGD, Vitrolife, Kungsbacka, Suecia) para luego realizar la biopsia embrionaria extrayéndose una sola blastómera de cada embrión. Las células obtenidas de este modo fueron fijadas en un portaobjetos limpio mediante el método de Carnoy modificado (Cohen y col, 2007).

Posteriormente se realizó la deshidratación de los núcleos en soluciones consecutivas de etanol al 70, 85 y 100%. Se añadieron 3µl de sonda Multivision PB (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.) para evaluar los cromosomas 13 (fluorescencia roja), 16 (acqua), 18(azul), 21(verde) y 22 (amarilla) y se realizó la correspondiente desnaturalización (5 minutos) e hibridización (4 horas) en termociclador Thermalbrite (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.), según lo descrito previamente (Gianaroli y col, 1997). Luego se procedió a la lectura en microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i (Nikon Corporation, Tokio, Japón) y se obtuvieron imágenes digitalizadas. Posteriormente

se realizó el lavado de las sondas y una segunda ronda de la desnaturalización (5 minutos) e hibridización (4 horas) con sondas centroméricas (CEP) para los cromosomas X e Y (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.), según lo descrito previamente. Se procedió a la lectura en microscopio de fluorescencia Nikon y se obtuvieron imágenes digitalizadas. Por último, se realizó el lavado de las sondas y la deshidratación en etanol al 70, 85 y 100%, y se aplicó la tercera ronda con sondas con oligonucleótidos (OligoFISH, One Cell Systems, Cambridge, MA, EE.UU.) para los cromosomas X, Y, 15 y 17, mediante los siguientes pasos:

1. Desnaturalización en baño de solución de formamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al 70% + solución 2X de SSC a 72°C durante 2 minutos.
2. Deshidratación en etanol al 70, 80, 90 y 100%, durante 2 minutos cada uno.
3. Hibridización con 10µl de sonda de fluorescencia de oligonucleótidos para los cromosomas 15, 17, X e Y (OligoFISH, One Cell Systems, Cambridge, MA, EE.UU.), a 37°C durante 5 minutos en termociclador *Thermalbrite* (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.).
4. Lavado en solución 0,2X de SSC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) + Solución al 0,1% de SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a 50°C durante 2 minutos.
5. Agregado de 7µl de antifade II (protector de fluorescencia), (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.).
6. Lectura en microscopio de fluorescencia y obtención de imágenes digitalizadas.

La interpretación de los resultados de FISH de blastómeras únicas fue realizada por 3 observadores, de acuerdo con lineamientos publicados previamente (Baart y col, 2004).

Resultados

Se obtuvieron señales cromosómicas claras en las tres rondas de FISH. Con las sondas de oligonucleótidos pudo realizarse la lectura de 4 cromosomas luego de 18 minutos de procesamiento. La lectura de las señales del cromosoma X e Y coincidieron en el resultado entre las dos técnicas. En la siguiente tabla se muestra el resultado de la lectura.

Cromosomas	Número de señales										
	Sondas de Vysis							Sondas de oligonucleótidos			
Blastómeras	13	16	18	21	22	X	Y	15	17	X	Y
1	3	3	3	3	3	1	1	3	3	1	1
2	2	2	3	2	2	1	1	3	2	1	1
3	2	2	2	2	2	2	0	2	3	2	0
4	3	2	2	3	2	2	0	2	3	2	0
5	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0

Figura 1: Fotos de 1 a 8 digitalizadas de la lectura de fluorescencia de la blastómera correspondiente al embrión número 3.

Foto 1. Lectura de señales correspondientes a los cromosomas 13 en rojo (2 señales) y 21 en verde (2 señales) con sonda Multivision PB (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.).

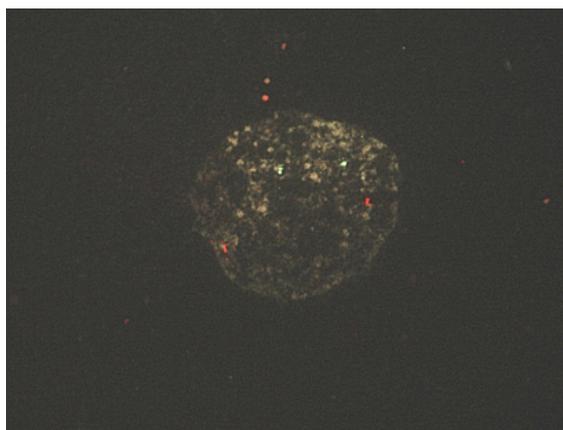


Foto 2. Lectura de señales correspondientes al cromosoma 22 en amarillo (2 señales) con sonda Multivision PB (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.).

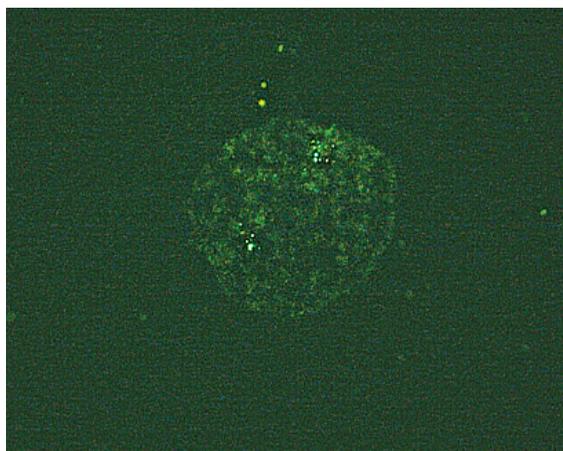


Foto 3. Lectura de señales correspondientes a los cromosomas 16 en aqua (2 señales) y 18 en azul (2 señales) con sonda Multivision PB (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.) con filtro aqua.

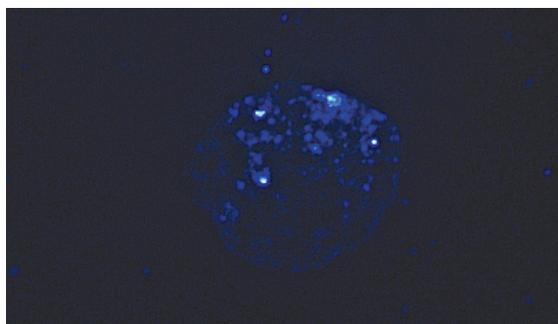


Foto 4. Lectura de señales correspondientes al cromosoma 18 en azul (2 señales) con sonda Multivision PB (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.) con filtro azul.

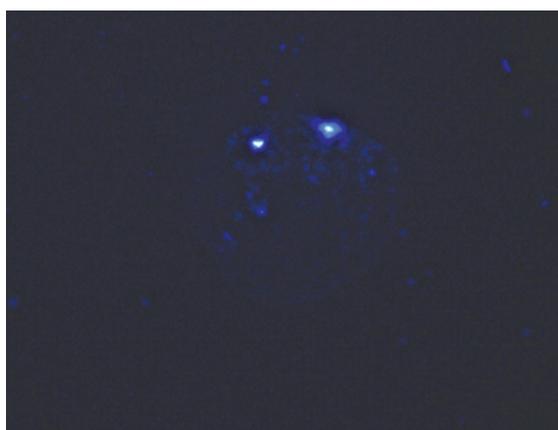


Foto 5. Lectura de señales correspondientes a los cromosomas X en verde (2 señales) e Y en naranja (ninguna señal) con sonda CEP X/CEP Y (Vysis, Abbott, Illinois, EE.UU.).

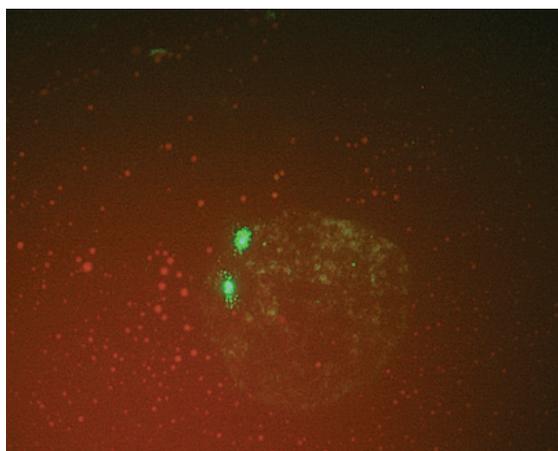


Foto 6. Lectura de señales correspondientes a los cromosomas X en rojo (2 señales) e Y en verde (ninguna señal) con sonda de fluorescencia de oligonucleótidos (One Cell Systems, Cambridge, MA, EE.UU.).

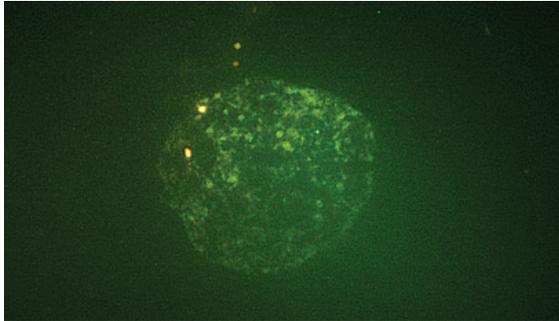


Foto 7. Lectura de señales correspondientes al cromosoma 15 en amarillo (2 señales) con sonda de fluorescencia de oligonucleótidos (One Cell Systems, Cambridge, MA, EE.UU.).

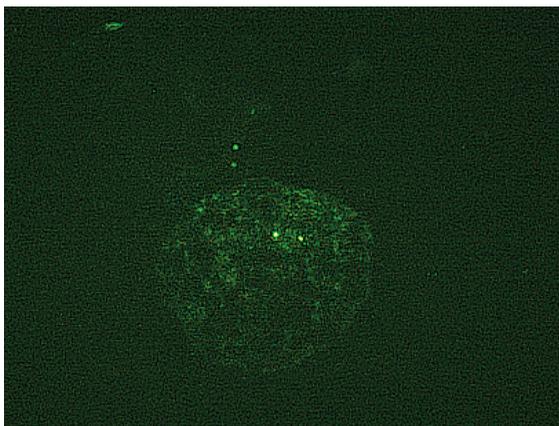
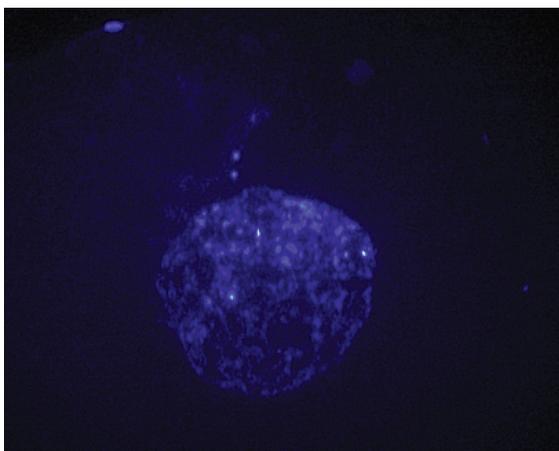


Foto 8. Lectura de señales correspondientes al cromosoma 17 en azul (3 señales) con sonda de fluorescencia de oligonucleótidos (One Cell Systems, Cambridge, MA, EE.UU.).



Discusión

Este es el primer reporte en nuestro país de DGP-SA con lectura para nueve cromosomas (los sexuales fueron leídos dos veces) y es la primera vez que se reporta en el mundo la utilización de sondas de oligonucleótidos en blastómeras humanas. La utilización de sondas de fluorescencia de oligonucleótidos requiere una baja astringencia y disminuye el tiempo de hibridación de 4 horas a 18 minutos, lo cual permitiría, mediante seis rondas sucesivas, realizar la lectura de todos los cromosomas humanos e informar el resultado dentro de las 24 horas de biopsiadas las blastómeras.

El primer caso de diagnóstico cromosómico de embriones en estadio preimplantación fue reportado por Alan Handyside y col en 1990 y consistió en un diagnóstico de cromosomas sexuales por amplificación de ADN para una enfermedad ligada al cromosoma X. Desde entonces se han desarrollado distintos avances con el fin de mejorar los resultados del método. El principal de los objetivos en los avances de PGD-AS es estudiar la mayor cantidad de cromosomas posible. En una serie nuestra (no publicada) de 144 embriones en las cuales realizamos *screening* para los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y, 23 de los embriones (15,97%) presentaron anomalías cromosómicas que sólo involucraban a los cromosomas 16 y/o 22. Estas anomalías no serían detectadas si solo se estudiaran los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, como ocurre en los protocolos que utilizan la sonda *Multivision GT* (Vysis, Abbott, EE.UU.). De la misma manera, al incrementar la cantidad de cromosomas estudiados en el presente trabajo, el embrión número 3 pudo ser diagnosticado como anormal cuando, en caso de no utilizar el *screening* del cromosoma 17, el embrión hubiera sido diagnosticado como normal. Por ello es importante, de ser posible, estudiar los 23 pares de cromosomas.

Además de los avances con los distintos tipos de sondas previamente descritos, otra estrategia propuesta fue la de biopsiar dos blastómeras para ampliar el número de cromosomas evaluados en menor tiempo o para confirmar los resultados y evitar un falso diagnóstico ante un mosaicismo.

Sin embargo, se ha demostrado que biopsiar dos blastómeras afecta el desarrollo embrionario. Esto no sucede cuando se biopsia una sola blastómera y el procedimiento es realizado por un operador experimentado (Cohen y col, 2007). Asimismo, el protocolo de fijación nuclear utilizado (en lugar de un tratamiento con pepsina, como proponen otros métodos de menor eficacia) permitió la remoción completa del citoplasma y mantener intacta la morfología nuclear con señales específicas y bien localizadas.

En los últimos años se han propuesto nuevas tecnologías para DGP-SA como las técnicas de microarreglos y la hibridación genómica comparativa. Si bien estas metodologías son capaces de evaluar los 24 cromosomas, demoran un tiempo tan prolongado que requieren la criopreservación o la vitrificación de los embriones estudiados. Por otra parte, son muy costosas económicamente y no son capaces de diagnosticar las poliploidías (Shinawi y Cheung, 2008).

En 2008 Joan Aurich-Costa y col presentaron el uso de sondas de fluorescencia con oligonucleótidos en linfocitos, realizando el *screening* para los 24 cromosomas en 6 rondas. Debido a que las sondas se unen a oligonucleótidos, el proceso de hibridación se realiza en 5 minutos, a diferencia de las sondas convencionales con las cuales lleva 4 horas. Por otra parte, el lavado se realiza durante 2 minutos a 50°C y con detergentes menos astringentes en comparación con los 5 minutos requeridos del lavado a 71°C con las sondas convencionales. Esto resulta en un menor daño del núcleo fijado. En el presente trabajo se pudo comparar los resultados de las sondas con oligonucleótidos y los resultados de las sondas convencionales en dos cromosomas (X e Y) y a la vez se pudo ampliar el número de cromosomas testeados.

Referencias

1. Aurich-Costa J, Zamechek L, Selvaggio C, Bradley S. Oligonucleotide (ODN) fluorescence in situ hybridization (Oligo-FISH) allows enumeration of 18 chromosomes in 4 successive hybridizations performed in a single day. *Fertil Steril* 2008;90:S23-S24.
2. Baart E, Van Opstal D, Los F, Fauser, Martini E. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Human Reprod* 2004;19:685-693.
3. Baart E, van den Berg, E. Martini E, Eussen H, Fauser B, Van Opstal D. FISH analysis of 15 chromosomes in human day 4 and 5 preimplantation embryos: the added value of extended aneuploidy detection. *Prenat Diagn* 2007;27:55-63.
4. Bahçe M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M, Munné S. Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave hybridization, cell recycling and monocolour labelling of probes. *Mol Hum Reprod* 2000;6:849-854.
5. Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 2007;87:496-503.
6. Gianaroli, et al. (1997). PGD increases the implantation rate in human IVF by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 68:1128-1131.
7. Gianaroli L, Magli MC, Munné S, Fortini D, Ferraretti AP. Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:170-175.
8. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K y cols. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-770.
9. Levy B, Treff N, Nahum O, Su J, Tao X, Scott R. The accuracy and consistency of whole genome preimplantation genetic diagnosis (PGD): a comparison of two independent methods – microarray PGD (mPGD) and comparative genomic hybridization (CGH). *Fertil Steril* 2008;90:S305.
10. Márquez C, Cohen J, Munné S. Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet* 1998;81:254-258.
11. Munné S, Weier HU, Stein J, Grifo J, Cohen J. A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:82-90(a).
12. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993;8:2185-2191(b).
13. Sato T, Ikuta K, Sherlock J, Adinolfi M, Suzumori K. Comparison between fluorescence in situ hybridization (FISH) and quantitative-fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the detection of aneuploidies in single blastomeres. *Prenat Diagn* 2003;23:678-684.
14. Scott R, Miller K, Olivares R, Su J, Fratterelli J, Treff N. Microarray based 24 chromosome preimplantation genetic diagnosis (mPGD) is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective blinded non-selection trial. *Fertil Steril* 2008; 90:S22-23.

15. Shinawi M, Cheung S. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today* 2008;13:760-770.
16. Verlinsky Y, Evsikov S. A simplified and efficient method for obtaining metaphase chromosomes from individual human blastomeres. *Fertil Steril* 1999;72:1127-1133.
17. Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;106:210-217.
18. Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1055-1062.
19. Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a Healthy Infant after Preimplantation Confirmation of Euploidy by Comparative Genomic Hybridization. *New Engl J Med* 2001;345:1537-1541.



HALITUS
INSTITUTO MÉDICO
"En el inicio de la vida y después..."
Dir. Méd. Dr. R. Sergio Pasqualini

“En el inicio de la vida y después...”

» **DEPARTAMENTOS MÓDICOS**

GINECOLOGÍA | OBSTETRICIA | ESTERILIDAD Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA | LABORATORIO ESPECIALIZADO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA
DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PREIMPLANTACIÓN - DGP- | HEMATOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN | PATOLOGÍA MAMARIA
PATOLOGÍA CERVICAL | GINECOLOGÍA INFANTO JUVENIL Y PROCREACIÓN RESPONSABLE | UROGINECOLOGÍA | ENDOSCOPIA GINECOLÓGICA
DISFUNCIONES SEXUALES FEMENINAS | DISFUNCIONES SEXUALES MASCULINAS | ANDROLOGÍA | UROLOGÍA | GENÉTICA | NUTRICIÓN
EMBOLIZACIÓN Y TERAPÉUTICA ENDOVASCULAR | PSICOLOGÍA | ECOGRAFÍA, ECODOPPLER Y ECOGRAFÍA 4D
CLIMATERIO, MENOPAUSIA Y OSTEOPOROSIS | DERMATOLOGÍA Y ESTÉTICA

| WWW.HALITUS.COM | 5273-2000 CONTACT CENTER | MARCELO T. DE ALVEAR 2084 - CP1122 - Bs AS - ARGENTINA |