

## 1<sup>er</sup> premio - Biológico: DGP: técnica e indicaciones

Sergio Ercoli, Jorge Pedrueza, Camilo Mercado

Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva - II Curso Superior BIANUAL  
Reproducción 2009; 24:62-73

### Resumen

El DGP (diagnóstico genético preimplantatorio), conocido también con las siglas del inglés PGD (*preimplantation genetic diagnosis*), es una herramienta más dentro del arsenal diagnóstico y terapéutico con que cuenta hoy la medicina asistencial. El diagnóstico genético efectuado con esta técnica puede involucrar diferentes alteraciones, tanto a nivel cromosómico como genético.

El procedimiento se efectúa en los cigotos clivados obtenidos mediante las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad antes de la transferencia de los mismos al útero materno.

Constituye una alternativa válida dentro de la metodología del diagnóstico prenatal tendiente a identificar anomalías genéticas antes de la implantación del embrión. Pueden ser estudiadas alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales, anomalías estructurales, enfermedades con herencia ligada al cromosoma X y enfermedades monogénicas.

La aplicación de esta técnica también es especialmente importante en el área de la medicina reproductiva debido a que es frecuente la asociación entre esterilidad y factores genéticos. Así, sus principales indicaciones serían la edad materna avanzada, las parejas con aborto a repetición o con fallo recurrente de implantación y el factor masculino severo.

Para efectuar el DGP se requiere previamente de la realización técnica de los procedimientos de fertilización asistida, ya sea FIV (fertilización *in vitro*) o ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*).

Luego de la obtención de los embriones a través de dichas técnicas, se procede a la extracción del material que será objeto del estudio citogenético (cuerpos polares o una a dos blastómeras) en forma mecánica, química o física.

**Correspondencia:** Sergio Ercoli  
E-mail: [sergiogarciaercoli@yahoo.com.ar](mailto:sergiogarciaercoli@yahoo.com.ar)

El material a analizar podrá ser la biopsia del cuerpo polar (CP), la biopsia en estado de cigoto hasta mórula avanzada o la biopsia en estado de blastocisto.

El análisis genético de las muestras celulares obtenidas puede realizarse utilizando como técnicas: PCR, FISH o CGH.

El DGP es una técnica que, aunque en desarrollo, tiene sus limitaciones. Este hecho se debe fundamentalmente al alto grado de mosaicismo que presentan los embriones en estadio de división, pero también existen limitantes en lo que es el conocimiento de la técnica que tienen que ver tanto con cuestiones inherentes a la técnica en sí misma como con los estudios publicados hasta el momento.

No obstante, el DGP constituye hoy por hoy uno de los avances más atractivos y con mayor proyección tanto dentro del campo del diagnóstico prenatal como del de la reproducción asistida.

### Introducción

En términos generales, se podría afirmar que uno de los objetivos fundamentales de una pareja interesada en tener un hijo es que el mismo nazca sano; entendiendo con este término, un niño libre de cualquier tipo de enfermedad, trastorno o malformación. Hasta no hace mucho tiempo la posibilidad de predecir si un individuo por nacer estaba libre de algún determinado padecimiento, se hallaba en los métodos invasivos del diagnóstico prenatal como la amniocentesis genética o la punción-biopsia de vellosidades coriales. Estos procedimientos consisten básicamente en extraer un pequeño volumen de líquido amniótico que rodea al feto o bien una diminuta porción de tejido trofoblástico para luego analizar los componentes celulares que se hallan en estas muestras. Es decir, que con estos métodos auxiliares del diagnóstico es posible efectuar el análisis citogenético

de las células fetales que por descamación están presentes en el fluido amniótico o bien de las células que componen la futura placenta, pues éstas, al derivar de un mismo origen común, tienen la misma carga genética y cromosómica que el embrión o el feto en desarrollo. Uno de los objetivos de este análisis es poder anticipar a los interesados si el ser que se está gestando presenta alguna anomalía, pero no otorga ninguna posibilidad de elección sobre el futuro de la eventual persona por nacer, pues esta cuestión se limitaría entonces a decidir si interrumpir o no un embarazo ya establecido, y esta opción puede resultar técnicamente difícil o impracticable (la amniocentesis diagnóstica se realiza en etapas avanzadas de la gesta), sin considerar las implicancias ético-morales ni el hecho de que en nuestro país el aborto constituye un delito penado por la ley o es socialmente incorrecto.

Con la llegada de la fecundación *in vitro* como técnica de alta complejidad en reproducción asistida en humanos se abrió un nuevo camino para la predicción de ciertas características sobre el futuro organismo. La técnica conocida con el nombre de DGP (*diagnóstico genético preimplantatorio*) o PGD (*preimplantation genetic diagnosis*) constituye una alternativa dentro de la metodología del diagnóstico prenatal tendiente a identificar anomalías genéticas (génicas o cromosómicas) antes de la implantación del embrión. El procedimiento se efectúa en los cigotos clivados obtenidos mediante la técnica micromanipulativa de reproducción asistida ICSI, antes de la transferencia de los mismos al útero materno. Así, en 1990, Handyside *et al.*<sup>1</sup> publican dos embarazos obtenidos luego de transferir embriones en los cuales se había extraído una blastómera de los mismos en el estadio de seis a ocho células con el fin de identificar dos tipos de aberraciones cromosómicas y solamente transferir los embriones sanos.

De esta forma se logró identificar potenciales patologías mucho antes de que se manifiesten en el individuo, permitiendo seleccionar a los embriones libres de las enfermedades estudiadas y, junto con esto, evitar la angustia de sus progenitores sobre el padecimiento de algún mal en el nuevo ser o la consideración y el hecho de la interrupción del embarazo como única estrategia para imposibilitar la transmisión a la descendencia de dicha anomalía.

El impacto que ha tenido esta técnica sobre la medicina reproductiva resultó ser de gran magnitud y actualmente es un procedimiento rutinario en los centros de reproducción asistida de los países desarrollados.<sup>2</sup> De hecho, la aplicación de esta técnica también es especialmente importante en este área de la medicina debido a que es frecuente la asociación entre esterilidad y factores genéticos.

Las anomalías cromosómicas son una de las causas más importantes de infertilidad y es por esto que esta técnica se aplica de forma mayoritaria en una población de pacientes que tienen un riesgo incrementado de crear embriones aneuploides tales como mujeres con edad materna avanzada (EMA), parejas con aborto recurrente (AR) y parejas con fallo recurrente de implantación (FRI) en los programas de fertilización *in vitro* (FIV), pudiendo analizar mediante el *screening* genético preimplantatorio (SGP) las aneuploidías más frecuentes<sup>3</sup> y seleccionar los embriones con mayor potencial implantatorio.

Dado que, al menos por ahora, no es posible el análisis de todo el complemento cromosómico, lo que se realiza en la actualidad es el estudio sobre las aneuploidías más frecuentes, las cuales fueron encontradas en el 72 % de los abortos espontáneos.<sup>5</sup> Éstas serían alteraciones a nivel de los cromosomas X-Y-13-16-18-21 y 22. En este caso la técnica del DGP o PGD pasa a llamarse diagnóstico genético preimplantatorio de *screening* de aneuploidías (DGP-AS) o simplemente *screening* genético preimplantatorio (SGP), cuya sigla en inglés es PGS (*preimplantation genetic screening*). Mientras tanto, el término DGP o PGD se limita (y de hecho está siendo utilizado con éxito a ese fin) al método de diagnóstico prenatal utilizado para la investigación de enfermedades monogénicas y para selección de sexo en enfermedades ligadas al mismo, pero su éxito en el *screening* de aneuploidías (SGP) debe ser todavía probado.

Resulta interesante tener presente que estas técnicas biomédicas no aseguran el nacimiento de un ser sano, sino que sus resultados se utilizan, de alguna manera, para minimizar la posibilidad de ocurrencia de un evento adverso para el cual la pareja en cuestión tiene riesgo real. Esto se debe a que, como se aclaró anteriormente, el método lo que hace es estudiar la anomalía en riesgo y no todo el complemento cromosómico y/o genético del pre-embrión.<sup>4</sup>

## Desarrollo

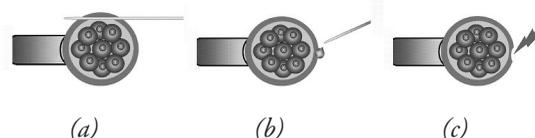
A continuación pasaremos revista de las cuestiones técnicas que tienen que ver con el procedimiento; seguidamente haremos mención de las principales indicaciones a las que da lugar el mismo.

## Aspectos técnicos

Si bien se describe en teoría la posibilidad de recuperar embriones originados en el seno materno con lavados uterinos, en la práctica lo aconsejable es obtenerlos mediante los procedimientos de fertilización *in vitro*. Hay quienes concretamente, y en términos prácticos, recomiendan utilizar el procedimiento ICSI (*intracytoplasmatic sperm injection*) con el objeto de minimizar los riesgos de contaminación con células ajenas. De esta manera, el operador se asegura inyectar un solo espermatozoide en cada uno de los ovocitos desprovistos de células de la granulosa y lavados. Veremos más adelante que tanto la FIV convencional (fertilización *in vitro*) como el ICSI pueden ser aceptados, dependiendo de la metodología de análisis a efectuarse para hacer el diagnóstico genético.

Previo a la realización de la técnica propiamente dicha, debiera ser supervisada toda la rutina aplicada en los procedimientos de FIV, incluyendo los medios y las condiciones de cultivo.<sup>6</sup> El método por el cual se tomará la muestra para el análisis preimplantatorio dependerá tanto de la infraestructura como de la experiencia con que cuente el centro de FIV que llevará adelante el procedimiento. Así, tenemos que la técnica o biopsia se puede aplicar tanto sobre el cuerpo polar del ovocito como sobre el pre-embrión propiamente dicho, ya sea a nivel del estadio de cigoto hasta mórula avanzada o en el estadio de blastocisto. La apertura de la zona pelúcida o de la membrana de fertilización se puede realizar de varias maneras, a saber: en forma mecánica (tratando de cortarla con la ayuda de una pipeta), química (utilizando una sustancia ácida para disolver una parte de ella, generalmente ácido Tyrodes) o física (en la cual se direccionan disparos de rayo láser hacia la región que se desea lesionar modulados a través del sistema óptico del microscopio).<sup>4</sup> Dichos procedimientos se encuentran ilustrados en la Figura 1.

**Figura 1.** Esquema de la apertura de la membrana de fertilización en forma mecánica (a), química (b) y física (c), (modificado sin autorización del Manual de la Red-Lara, 2006).<sup>4</sup>



## Tipos de biopsia embrionaria

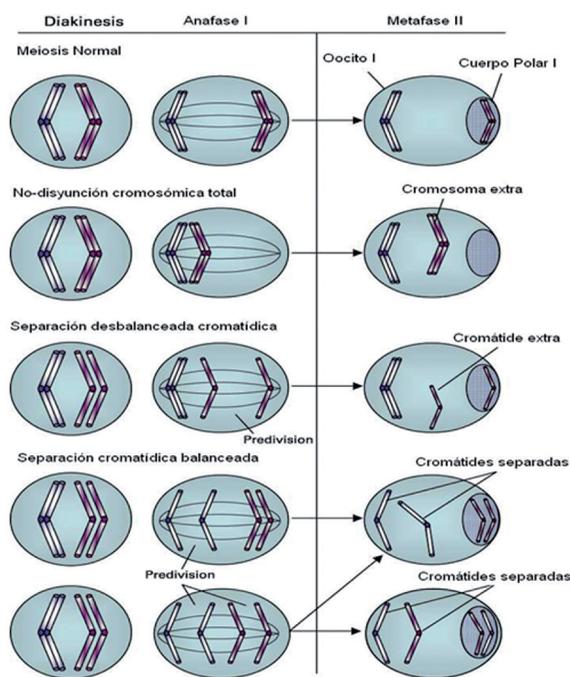
Existen varios tipos de biopsia embrionaria:

### 1. Biopsia del cuerpo polar (CP)

Es una técnica que cada vez resulta de menor implementación práctica dado que los resultados de la misma son relevantes solamente cuando es la mujer quien presenta riesgos de anomalías cromosómicas o genéticas. La base de la biopsia del CP se fundamenta en que la mayoría de las aneuploidías humanas se producen en la primera división meiótica del ovocito, así el análisis del primer cuerpo polar (1CP) permitiría la identificación de la mayoría de los desequilibrios cromosómicos de origen materno (Figura 2). Por otro lado, es sabido que el ovocito posee cierta capacidad de reparar estos errores como así también de cometer nuevos errores durante la reactivación de la meiosis; esto sería en el transcurso de la fecundación, la formación y la expulsión del segundo cuerpo polar (2CP). Es por este motivo que también se analiza el 2CP. Así, en un programa de FIV el 1CP puede ser removido del ovocito en el mismo día de la punción entre las 36 y 42 horas post inyección de la hormona gonadotrófica coriónica humana (hCG).<sup>7</sup> El 2CP puede ser removido del cigoto entre las 18 y 22 horas postinseminación; de hecho, tanto el primero como el segundo CP pueden ser removidos simultáneamente para su estudio, pero debe tenerse en cuenta que el 1CP degenera el día 1 post-inseminación.<sup>8-10</sup> Con meros fines organizativos, la remoción secuencial de los CP se puede realizar el día 0 (CP1) y el día 1 (CP2). Este sistema es recomendable para realizar el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el estudio de enfermedades monogénicas de origen materno,<sup>10</sup> el cual se detallará más adelante.

La apertura de la zona pelúcida se puede realizar bajo la forma mecánica o física. No sería aconsejable hacerlo en forma química, pues se sabe que el ácido Tyrodes altera las fibras del huso meiótico.<sup>2</sup> Los CP se retiran del ovocito-cigoto con la ayuda del micromanipulador anexo al microscopio invertido bajo un aumento de 400 veces.

**Figura 2.** Representación esquemática de la meiosis normal del ovocito y de la ocurrencia de tres tipos de segregaciones anormales halladas en la metafase II: i.e. la no-disyunción cromosómica total, la separación cromatídica desbalanceada y balanceada. Los errores potenciales de la segunda división meiótica no están representados en la figura (modificado sin autorización de Pellestor y col., 2005).<sup>11</sup>



## 2. Biopsia en estado de cigoto hasta mórula avanzada

Si bien este procedimiento se podría realizar en cualquier momento del desarrollo embrionario, el estadio de 6 a 8 células (día 3 post-inseminación) es el más utilizado por los laboratorios.<sup>2</sup> El fundamento de esta situación se halla en el hecho de que un porcentaje reducido de los cigotos llega hasta este estadio (menos del 40 %) y también porque brinda el suficiente tiempo para realizar la transferencia de los embriones seleccionados luego de los resultados.<sup>4-12</sup>

Previo a la biopsia, los pre-embriónes pueden ser colocados en un medio adecuado para debilitar las uniones celulares (generalmente se utiliza un medio libre de calcio y magnesio) a temperatura ambiente. Tanto la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Red Lara)<sup>4</sup> como la Sociedad Europea de Reproducción Humana (ESHRE)<sup>2</sup> plantean ciertas indicaciones que resultan de gran importancia para disminuir la posibilidad de confusiones en los resultados. Por ejemplo, algunas de estas pautas serían la perfecta rotulación de las placas de cultivo donde se encuentran los pre-embriónes (de ser posible, uno por placa) como así también de los recipientes donde se deposita la muestra a analizar. De este modo, los resultados del estudio son específicos para ese pre-embrión perfectamente identificable. También recomiendan remover todas las células del cúmulus oophurus y los espermazoides que hallan quedado rodeando al pre-embrión, puesto que ambos pueden contaminar la muestra tanto si se utiliza el análisis por hibridación *in-situ* fluorescente (FISH), por hibridación genómica comparativa (HGC) o por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). También se sugiere tener a disposición los medios secuenciales hasta el quinto día post-inseminación.

Con respecto a la metodología de análisis a realizarse para el diagnóstico genético (FISH o PCR), debemos tener en cuenta que el tipo de inseminación es de vital importancia. Así se tiene que si el análisis es por PCR, se recomienda utilizar la técnica de inyección espermática intracitoplásmica (ICSI) para reducir la posibilidad de contaminación paterna de espermatozoides adheridos a la membrana de fertilización y también de núcleos espermáticos no-descondensados cercanos a las blastómeras. Si el análisis será por FISH, tanto el ICSI como la inseminación convencional son aceptados.

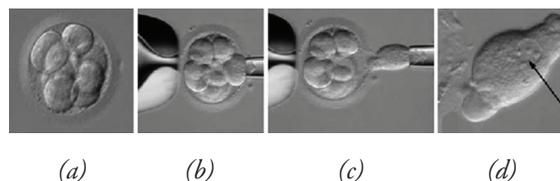
El número de blastómeras a analizar, tanto un mínimo como un máximo, es un tema bastante controversial en la literatura. Podríamos decir que en la actualidad no hay consenso sobre la cantidad de blastómeras que se pueden remover sin alterar la viabilidad del embrión. La decisión de remover una o dos células está determinada por diversos factores, incluyendo el número de células que posee dicho pre-embrión y la precisión y fiabilidad del *test* de diagnóstico que se

vaya a utilizar.<sup>2</sup> En un trabajo de reciente publicación se trató de probar si existen diferencias en extraer una o dos blastómeras de embriones de día 3 (compuestos por 6 a 8 células), realizando el DGP-SGP por FISH y PCR, tanto midiendo la eficacia del método diagnóstico como el eventual perjuicio en el desarrollo embrionario y los recién nacidos. Fueron incluidos 592 ciclos efectuados con la técnica ICSI. Lo interesante de este trabajo es que se encontraron diferencias significativas en el desarrollo embrionario (la extracción de dos blastómeras alteraría el potencial del desarrollo embrionario) y en la eficiencia del método diagnóstico por PCR (la extracción de dos blastómeras ofrece una mayor eficiencia en dicho método), pero, sin embargo, no se hallaron diferencias tanto en la eficiencia del DGP-SGP por FISH como en el número de recién nacidos.<sup>13</sup>

El hecho del especial interés en analizar dos blastómeras se basa en el evento conocido como mosaicismo embrionario, el cual consiste en una situación de frecuente aparición en la que el contenido cromosómico no es igual en todas las células que conforman al pre-embrión.<sup>12-16</sup> La meta perseguida subyacente a esta idea sería poder minimizar el riesgo de haber obtenido una célula anormal y detectar cuando se está frente a un mosaicismo embrionario.<sup>14</sup>

El orificio por donde se van a extraer las blastómeras se puede efectuar por medio de cualquiera de las tres opciones que han sido mencionadas *ut supra*,<sup>2-4</sup> pero se ha visto que la utilización del láser como método físico para lesionar la membrana de fertilización genera menos blastómeras lesionadas y, en consecuencia, pudiera ser considerado más inocuo para la sobrevivencia del pre-embrión; por otro lado, el método resulta ser en la práctica de mayor facilidad de uso que el ácido Tyrodes<sup>15</sup> pues en un solo paso permite la aspiración de la blastómera. Asimismo, si hubiera que realizar una nueva biopsia al embrión debido a la pérdida de la blastómera o ante la eventualidad de no haber hallado núcleo en la misma, se recomienda utilizar el mismo orificio por donde se extrajo la primera muestra.<sup>2</sup>

**Figura 3.** Biopsia de un pre-embrión en día 3 post-inseminación: a) pre-embrión de 8 células, b) pre-embrión con una aguja sujetadora (izquierda) y con una aguja para perforar la membrana de fertilización (derecha), c) extracción de la blastómera, y blastómera biospiada con un único núcleo (flecha), (modificado sin autorización de Ogilvie y col, 2005).<sup>21</sup>



### 3. Biopsia en estado de blastocisto

Si se opta por este estadio del desarrollo embrionario para efectuar la extracción celular, la misma se realiza en el día 5 a 6 de cultivo post-inseminación. En este momento el embrión puede tener hasta 300 células, presenta la cavidad blastocélica o blastocele, el trofoectodermo y la masa celular interna.<sup>2</sup> En este caso se obtiene una pequeña proporción del trofoectodermo para el análisis citogenético. Debido a la demora que conlleva dicho diagnóstico, lo que se hace es crioconservar los embriones hasta el momento de ser transferidos, hecho que se efectúa una vez descartada la patología en cuestión, seleccionando el/los embriones libres de dicha anomalía.

### Análisis de las células obtenidas

El análisis genético de las muestras celulares obtenidas puede realizarse utilizando como técnicas: PCR, FISH o CGH.

La PCR se utiliza para el diagnóstico de enfermedades monogénicas<sup>19-21</sup> (por citar un ejemplo, en el estudio de mutaciones múltiples en el gen de la fibrosis quística).<sup>17</sup>

Las técnicas de FISH y HGC se introdujeron para la identificación de los cromosomas sexuales en la determinación del sexo embrionario,<sup>18</sup> así como para el estudio de anomalías estructurales.<sup>21</sup>

#### 1. PCR

Es una técnica muy sensible, pero requiere condiciones de trabajo estrictas para evitar la contaminación con ADN exógeno, haciéndose necesario utilizar el ICSI como método de inse-

minación de los ovocitos. Básicamente, consiste en realizar la amplificación de una secuencia determinada de ADN (*primers*). En los inicios de esta técnica se presentaron ciertos inconvenientes, como por ejemplo la amplificación de errores propios de la técnica. Esta cuestión se solucionó con la utilización de *primers* específicos, lográndose un aumento en la sensibilidad del método.<sup>19</sup> Otro inconveniente que surgió generando diagnósticos erróneos fue lo que se conoce como la no-amplificación de un alelo en una única célula (ADO, del inglés *allele drop-out*), hecho que se puede detectar en individuos heterocigotos. Ésta es una situación diferente a otra que también puede presentarse en este tipo de análisis, y que se conoce como amplificación alélica preferencial, en la cual uno de los alelos es amplificado por demás con respecto al otro.<sup>20</sup>

Con la aparición de un método más sensible de PCR por fluorescencia tanto el ADO como la amplificación alélica preferencial han podido ser detectados, pero continúa existiendo el problema de la contaminación con ADN foráneo. Existe otro método de PCR llamado PCR-multiplex que trabaja amplificando dos o más secuencias de ADN. Esta alternativa presenta las mismas ventajas que el método por fluorescencia, pero también permite marginar el ADN contaminante.<sup>22</sup>

## 2. FISH

Constituye el método más frecuentemente utilizado para el análisis del complemento cromosómico de las blastómeras.

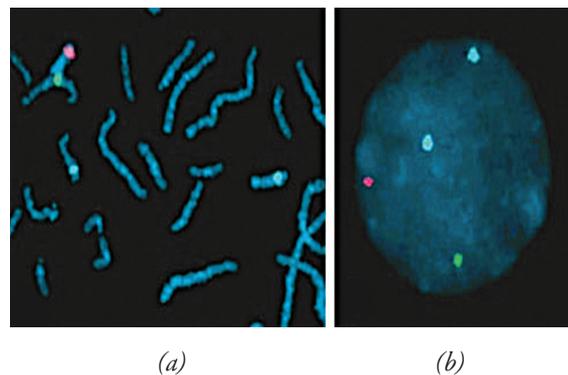
Una vez fijado el núcleo de la célula sobre un porta, mediante el método de Tarkowski,<sup>23</sup> se pueden usar sondas de ADN marcadas con fluorocromos específicos que permitirán poner de manifiesto los diferentes cromosomas analizados.

El número y tipo de sonda de FISH a utilizar dependerá de la indicación. Así, existen solamente dos (X e Y) cuando el objetivo es la selección de sexo, sondas específicas para el caso de las translocaciones y dos o tres sondas de hibridación para 5 a 10 cromosomas distintos analizados con una eficacia aceptable para el caso del PGS.

Como se dijera anteriormente, el número de blastómeras sometidas al análisis genético por cada pre-embrión varía, según los distintos grupos, de una a dos. En las series más largas se ha

descrito, para el análisis de una sola blastómera por FISH, un nivel de error del 6%. Éste sería atribuible al mosaicismo, fenómeno biológico que hace que el PGS en estadio de 8 células no sea totalmente fiable. Un estudio realizado sobre 5 FIV en pacientes menores de 38 años observa que el porcentaje de embriones mosaicos en día 3 es del 57% y encuentra que la constitución cromosómica de estos embriones está sujeta a cambios durante el desarrollo a estadio de blastocisto.<sup>12</sup>

**Figura 4.** Determinación del sexo embrionario a través de FISH con la utilización de marcadores específicos para el centrómero del cromosoma X (verde), Y (rojo), y 18 (azul): a) hibridación de cromosomas en metafase marcados con diamidinophenylindole (DAPI); b) interfase del núcleo marcados con DAPI. Se observa un cariotipo masculino (modificado sin autorización de Ogilvie y col, 2005).<sup>21</sup>



## 3. CGH

Esta técnica es similar al FISH, ya que es otra manera de identificar alteraciones cromosómicas. En este proceso, después de la amplificación del ADN de una única célula, se pueden identificar todos los cromosomas.<sup>24</sup> El ADN se marca con un fluorocromo, por ejemplo, el rojo, y se mezcla con otro ADN de una muestra control preamplificado y marcado con otro fluorocromo, el verde, con el cual se compara. La mezcla se aplica a una metafase extendida en un porta-objetos y se cuantifican los rangos de color.

La ventaja de la CGH sobre el FISH es que con esta técnica se puede analizar todo el complemento cromosómico. Del producto sobrante de la amplificación genómica total que no es utilizado

para la CGH, se pueden analizar mutaciones de genes específicos mediante PCR multiplex, con lo cual se estudiaría conjuntamente la aneuploidía y una determinada enfermedad con riesgo de ser transmitida a la descendencia a partir de una única célula biopsiada.<sup>21</sup>

La CGH tiene como desventaja que no permite detectar poliploidías ni translocaciones balanceadas.<sup>19</sup> Otra desventaja sería que los protocolos publicados hasta la fecha son poco prácticos y laboriosos, lo cual hace que en forma práctica sean escasamente aplicables en la clínica reproductiva<sup>21</sup>

Este proceso requiere de 72 horas, por lo que se realiza principalmente en el CP para el análisis materno, debido a que se cuenta con cinco días hasta la transferencia embrionaria. La CGH aplicada en las blastómeras obtenidas en día 3 requiere, por tanto, la congelación del embrión y la transferencia en un ciclo posterior. Se sabe que el rango de supervivencia de estos embriones biopsiados es extremadamente bajo (54%).<sup>19-37</sup>

### Indicaciones

Además de aplicarse en parejas con riesgo de concebir un hijo con una enfermedad genética, el DGP abrió la puerta a una serie de indicaciones genéticas que nunca se contemplaron en el diagnóstico prenatal, algunas de ellas cuestionadas desde el punto de vista ético e incluso motivo de cambio en las legislaciones de diversos países.

La técnica puede aplicarse a enfermedades de aparición tardía como el Alzheimer, como también a pacientes con genes predisponentes al cáncer: BRCA-1, BRCA-2, Li-Fraumeni, neurofibromatosis 1 y 2.

Una nueva indicación en debate es la selección de embriones según su antígeno leucocitario humano (HLA), de modo tal que los niños nacidos de estos ciclos de DGP pueden ser donantes de células madres para un hermano enfermo. El primer caso fue descrito por Verlinsky en el año 2001<sup>25</sup> y se realizó en una familia con un niño afectado de anemia de Fanconi donde se seleccionaron embriones no afectados y con HLA compatibles. También se indica en incompatibilidad sanguínea y malformaciones congénitas.<sup>2-4</sup>

En toda pareja en la que se considera la posibilidad de aplicar el DGP se debe brindar información minuciosa sobre los siguientes puntos:<sup>2-27</sup>

1. Los riesgos asociados con los procesos de IVF.
2. La opción de elegir no proceder con la IVF y el DGP.
3. Los riesgos asociados con la biopsia embrionaria y el cultivo extendido.
4. Para los portadores de desórdenes autosómicos y ligados al cromosoma X, los patrones relevantes de herencia y el impacto del desorden en la calidad de vida de un hijo afectado.
5. Para los portadores de translocaciones cromosómicas balanceadas u otras anomalías cromosómicas estructurales, una revisión de los posibles patrones de separación durante la meiosis y el mayor riesgo de concebir hijos que tengan una composición cromosómica no balanceada.
6. Las limitaciones técnicas del DGP, incluyendo el riesgo de diagnóstico erróneo y la necesidad de subsiguientes pruebas de diagnóstico prenatal por medio de la biopsia de las vellosidades coriónicas o la amniocentesis para confirmar los resultados obtenidos con el DGP.
7. Las opciones relacionadas con las pruebas de diagnóstico prenatal y sus riesgos asociados.
8. La posibilidad de que ningún embrión pueda ser transferido si todos están afectados y de que los embriones no afectados que portan el desorden recesivo o el ligado al cromosoma X puedan ser transferidos.
9. La disposición de los embriones en los que las pruebas no dieron resultados concluyentes aún.
10. La disposición de los embriones no transferidos: descarte, criopreservación, investigación o donación.

### Edad materna avanzada

Son muchas las causas que explican la disminución de la fertilidad en las mujeres con una edad reproductiva avanzada. Intervienen una serie de factores como la baja receptividad endometrial, pero sobre todo la alta incidencia de aneuploidías ovocitarias debido a los defectos en el proceso de reducción meiótica.<sup>26</sup> Estas alteraciones cromosómicas conducen a una baja tasa de implantación, una alta incidencia de abortos tempranos y un mayor riesgo de niños nacidos con patología cromosómica, tanto en embarazos concebidos naturalmente como en aquellos de alta complejidad.<sup>28</sup>

Entre el 15-20% de los ovocitos humanos presentan anomalías cromosómicas debidas a las fallas durante la meiosis, en especial la no disyunción de un cromosoma y la separación prematura de las cromátidas. En este sentido, el efecto de la edad materna avanzada (mayores de 35 años) en la incidencia de aneuploidías está claramente evidenciado en los estudios realizados en el ovocito, CP1 y CP2, llegando a ser de hasta un 52%.<sup>29</sup>

La selección de embriones a través del DGP en este grupo de pacientes permite mejorar las tasas de gestación, si bien el principal objetivo del tratamiento es conseguir que sean gestaciones evolutivas con nacimientos de niños sanos.<sup>30</sup> No obstante, los estudios prospectivos randomizados con que contamos hasta el momento actual no son concluyentes a ese respecto.<sup>31-32</sup>

### **Aborto recurrente**

Se define al aborto de repetición o recurrente como la pérdida de dos o más embarazos espontáneos consecutivos. Los factores responsables pueden ser muy diversos, aunque en muchos casos, estos abortos son de origen desconocido.<sup>33</sup>

No obstante, la mayoría de los abortos espontáneos se deben a la presencia de alteraciones cromosómicas en el embrión. De hecho, más del 50% de los abortos producidos en el 1º trimestre de gestación son consecuencia, especialmente, de alguna alteración en los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y.<sup>34</sup>

La mayoría de las concepciones que son abortadas espontáneamente son aneuploides. Ciertamente, el SGP de embriones de mujeres con AR ha demostrado una alta prevalencia de aneuploidía, independientemente de la edad de la mujer.<sup>35</sup>

La finalidad del DGP en este grupo de pacientes consiste en seleccionar embriones normales para los cromosomas analizados y, con ello, aumentar las posibilidades de conseguir una gestación a término.<sup>30-36</sup> Sin embargo, todavía se producen abortos, quizás debido a alteraciones en cromosomas no estudiados. Esto implica la necesidad de estudiar, en un futuro inmediato, un mayor número de cromosomas.<sup>37</sup>

### **Falla reiterada de implantación**

Corresponde a pacientes que acumulan 3 o más ciclos de FIV con transferencia de embriones de

buena calidad y sin éxito. Las causas pueden ser múltiples y no están muy bien definidas, pero lo cierto es que algunas de ellas están relacionadas con el propio embrión, ya que se ha demostrado que estas pacientes muestran en elevado número de embriones con anomalías cromosómicas. En un estudio realizado con 205 embriones el 72,2% de los mismos eran anormales, siendo las aneuploidías, con un 50,2%, las alteraciones más comunes.<sup>38</sup> En el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), apostando por el DGP como estrategia para mejorar el pronóstico en este grupo de pacientes, la tasa de embarazos ascendió al 32,2% y la tasa de implantación al 23,5%. Estos resultados son similares a otros autores.<sup>39-40</sup>

### **Factor masculino severo**

El factor masculino grave sí constituye un grupo especial en el que el ICSI puede representar una vía de transmisión de anomalías.<sup>41</sup>

Pareciera haber una mayor incidencia de alteraciones numéricas, sobre todo de cromosomas sexuales y estructurales, tanto *de novo* como transmitidas por el padre. En los estudios cromosómicos de espermatozoides mediante FISH en este grupo de pacientes que presentan un cariotipo normal se observa un significativo aumento de aneuploidías por fallo en la disyunción de sus gametos, especialmente en los cromosomas sexuales y en el cromosoma 21.<sup>42</sup>

Existe un alto porcentaje de mosaicismo en los casos extremos como las azoospermias secretoras, en comparación con los casos de infertilidad más leves,<sup>43</sup> que es causa de fallas de implantación y de abortos. El uso del DGP ayuda a seleccionar embriones con viabilidad potencial,<sup>44</sup> aunque sus resultados aún no son categóricos y algunos autores están en desacuerdo.<sup>45</sup>

### **Alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales**

Desde el punto de vista de la patología clínica los defectos asociados a alteraciones de los cromosomas sexuales suelen ser menos graves que los de los cromosomas autosómicos. Además, la alta frecuencia de mosaicismo en estos pacientes, minimiza los efectos que tienen sobre el desarrollo del individuo.

Las alteraciones en los cromosomas sexuales se observan con mayor frecuencia en pacientes que

acuden a los centros de reproducción ya que, en menor o mayor grado, tienen problemas de infertilidad, excepto en el síndrome XYY, y riesgo de transmisión a la descendencia. Diferentes estudios confirman que los espermatozoides de los pacientes con síndrome de Klinefelter presentan mayor incidencia de alteraciones en los cromosomas sexuales.<sup>46</sup>

### Anomalías estructurales

En la mayoría de los casos se producen espontáneamente en algún momento de la gametogénesis por un fallo en la meiosis del espermatozoide o del óvulo, aunque los padres presenten cariotipos normales. Pese a existir otras anomalías más complejas, las detectadas con mayor frecuencia en los progenitores son las translocaciones equilibradas recíprocas (1,3%), las robertsonianas (0,6%) y las inversiones (0,2%).

Los individuos portadores de reorganizaciones cromosómicas equilibradas presentan un elevado riesgo de tener abortos (30%) o descendencia con malformaciones. En los casos de parejas portadoras de translocaciones robertsonianas el estudio de FISH permite diferenciar los embriones equilibrados o normales de los embriones desequilibrados para alguno de los cromosomas implicados.<sup>47</sup>

### Enfermedades con herencia ligada al cromosoma X

Hoy en día, los avances en biología y genética molecular permiten identificar en muchas ocasiones el gen exacto del cromosoma en el que se produce la enfermedad, con la posibilidad de determinar la mutación mediante PCR.

Cuando no es posible identificar con exactitud el gen o la mutación dentro del gen, se puede seleccionar el sexo del embrión mediante FISH y evitar la transmisión de la enfermedad a la descendencia. Algunas de las principales enfermedades abordadas son:

- Síndrome del X frágil
- Distrofia miotónica de Duchenne
- Distrofia miotónica de Becker
- Adrenoleucodistrofia
- Mutación en el receptor de andrógenos
- Hemofilia
- Síndrome de Hunter

### Enfermedades monogénicas

Son las que presentan mutaciones de un único gen con riesgo aumentado de ser heredados por la descendencia. Existen alrededor de 6.000 enfermedades monogénicas descritas y comprende los tres tipos de herencia mendeliana. Es sobre estas enfermedades donde se usa con mayor éxito el DGP,<sup>2-4-27</sup> siendo las principales las siguientes:

#### *Autosómicas dominantes:*

- Distrofia miotónica de Steinert
- Enfermedad de Huntington
- Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth
- Poliquistosis renal AD
- Síndrome de marfanemia hemolítica de Perth

#### *Autosómicas recesivas:*

- Fibrosis quística
- Atrofia muscular espinal
- Talasemia
- Anemia de células falciformes
- Inmunodeficiencia combinada grave incompatibilidad Rh

### Limitaciones del DGP

Existen varias razones que pueden explicar este hecho. El diagnóstico preimplantacional es una técnica que, aunque en desarrollo, tiene sus limitaciones.

Hay que tener en cuenta el alto grado de mosaicismo que presentan los embriones en estadio de división.<sup>14-48</sup>

Además, los estudios publicados están referidos a una muestra muy pequeña donde el grupo control en la mayoría de estos estudios está formado por mujeres jóvenes y fértiles que utilizan el DGP para selección de sexo, mientras que los grupos de estudio son pacientes de alto riesgo de aneuploidía y utilizan el PGS para incrementar su tasa de embarazo.

La mayoría de las pacientes que se someten a un PGS reciben embriones en estadio de blastocisto y muchos estudios no hacen referencia a la calidad o estadio de los embriones del grupo control.

Por último, los estudios utilizan diferentes tecnologías tales como el análisis de distinto número de cromosomas por FISH y las biopsias difieren en cuanto a días, número de células biopsiadas y

técnicas para efectuar las mismas, tal como hemos podido comprobar con los datos publicados por el ESHRE PGD Consortium.<sup>2</sup> La técnica de biopsia elegida por los distintos grupos está cambiando y en estos momentos es el láser la técnica mayoritariamente aplicada.

### Conclusiones

Si bien la técnica del DGP se origina en los laboratorios de reproducción asistida, puesto que el *screening* de aneuploidías puede ser considerado el mejor método de selección embrionaria, la mayoría de las indicaciones del procedimiento surgen del riesgo genético aumentado, ya sean parejas fértiles o infértiles. Así, el DGP se constituye en una alternativa válida dentro del diagnóstico prenatal con el fin de evitar el nacimiento de niños con alteraciones genéticas que podrían ponerse de manifiesto en la etapa post-natal temprana o tardíamente durante la vida adulta.

Pero debemos considerar asimismo que no es menos importante estimar el riesgo genético reproductivo, ya que el éxito de un tratamiento de fertilización asistida dependerá, en última instancia, de la obtención de embriones libres de afección genética para poder ser transferidos. Esto se basa en el conocimiento de la alta tasa de aneuploidías en ovocitos y espermatozoides, por lo que se estima que aproximadamente el 50% de los embriones preimplantados tienen anomalías cromosómicas, a pesar de derivar de parejas jóvenes con cariotipos normales.

En los últimos años la reproducción asistida avanzó a pasos agigantados sobre distintas técnicas que contribuyen a solucionar los numerosos y frecuentes problemas de la infertilidad. Ya no se limitan a conseguir un embarazo, sino que persiguen asegurar el nacimiento de niños sanos. En este sentido, el diagnóstico genético preimplantacional constituye uno de los avances más atractivos y con mayor proyección dentro de la reproducción asistida, si bien todavía está en evolución.

El conocimiento del genoma humano permitirá, en un futuro próximo, localizar la causa genética de la mayoría de las enfermedades y, en consecuencia, realizar un estudio más exhaustivo sobre el embrión que se ha de transferir.

### Referencias

1. Handyside, A.H., Kontogianni, E., Hardy, K. & Winston, R.M. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344; 768-770.
2. Thornhill, A.R., deDie-Smulders, C.E., Geraedts, J.P., Harper, J.C., Harton, G.L., Lavery, S.A., Moutou, C., Robinson, M.D., Schmutzler, A.G., Scriven, P.N., Sermon, K.D & Wilton, L. 2005. ESHRE PGD Consortium "Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)". *Human Reproduction* 20 (1); 35-48.
3. Munné, S., Magli, C., Bahce, M., Fung, J., Legator, M., Morrison, L., Cohert, J. & Gianaroli, L. 1998. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13,14,15,16,18,21,22. *Prenatal Diagnosis* 18; 1459-1466.
4. Coco, R. 2006. Manual de Procedimientos, Laboratorio de Reproducción Asistida "Diagnóstico Genético Preimplantatorio". *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida*; Cap 6; pp 112-126.
5. Simpson, J.L. & Bombard, A.T. 1987. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion: Frequency, pathology and genetic counselling. In Edmonds K and Bennett MJ (eds) *Spontaneous Abortion*. London, Blackwell, 51 pp.
6. Gianaroli, L., Plachot, M., van Kooij, R., Al-Hasani, S., Dawson, K., DeVos, A. Magli, M.C., Mandelbaum, J., Selva, J. & van Inzen, W. 2000. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Human Reproduction* 15; 2241-2246.
7. Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J. & Strom, C.M. 1990. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human Reproduction* 5; 826-829.
8. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Evsikov, S., Wolf, G., White, M., Lifchez, A., Kaplan, B., Moise, J., Valle, J., Ginsberg, N., Strom, C. & Kuliev, A. 2001. Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Molecular and Cellular Endocrinology* 183; 47-49.
9. Kuliev, A., Cieslak, J. & Verlinsky, Y. 2005. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenetic and genome research* 111 (3-4); 193-198.
10. Kuliev, A. & Verlinsky, Y. 2004. Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction* 10 (5); 401-407.
11. Pellestor, F., Anahory, T. & Hamamah, S. 2005. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Human Reproduction* 11; 15-32.
12. Baart, E.B., van Opstal, D., Los, F.J., Fauser, B.C.J.M. & Martini, E. 2004. Fluorescent *in situ* hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Human Reproduction* 19; 685-693.

13. Goznes, V., De Rycke, M., De Vos, A., Staessen, C., Michiels, A., Verpoest, W., Van Steirteghem, A., Bertrand, C., Liebaers, I., Devroey, P & Sermón, K. 2008. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome alter the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction* 23(3); 481-492.
14. Baart, E.B., Martini, E., van den Berg, I., Macklon, N.S., Galjaard, R-J.H., Fauser, B.C.J.M. & Van Opstal, D. 2006. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryo from young women undergoing IVF. *Human Reproduction* 21; 223-233.
15. Joris, H., De Vos, A., Janssens, R., Devroey, P., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. 2003. Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD alter zona drilling using acid Tyrode médium or a laser. *Human Reproduction* 18 (9); 1896-1902.
16. Los, F.J., Van Opstal, D. & van den Berg, C. 2004. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Human Reproduction* 10; 79-94.
17. Sánchez-García, J.F., Benet, J., Gutiérrez-Mateo, C., Séculi, J.L., Monrós, E. & Navarro, J. 2005. Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Molecular Human Reproduction* 11(6); 463-468.
18. Griffin, D.K., Handyside, A.H., Penketh, R.J.A., Winston, R.M.L. & Delhanty, J.D.A. 1991. Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Human Reproduction* 6; 101-105.
19. Sermón, K. 2002. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Human Reproduction Update* 8; 11-20.
20. Thornhill, A.R. & Snow, K. 2002. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *Journal of Molecular Diagnostics* 4,11-29.
21. Ogilvie, C.M., Fraude, R.P. & Scriven, P.N. 2005. Preimplantation Genetic Diagnosis- an overview. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53(3); 255-260.
22. Piyamongkol, W., Harper, J.C., Sherlock, J.K., Doshi, A., Serhal, P.F., Delhanty, J.D.A. & Wells, D. 2001. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenatal diagnosis* 21 (3); 223-232.
23. Tarkowski, A.K. 1966. An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5; 394-400.
24. Wells D. & Delhanty, J.D.A. 2000. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction* 6; 1.055-1.062.
25. Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Schoolcraft, W., Strom, C. & Kuliev A. 2001. Preimplantation Diagnosis for Fanconi Anemia Combined with HLA matching. *JAMA* 285; 3130-3133.
26. Delhanty, J.D. 2005. Mechanims of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenetics Genome Research* 111(3); 237-244.
27. Practice Comité, American Society for Reproductive Medicine. 2007. Preimplantation genetic testing. *Fertility and Sterility* 88 (6); 1497-1503.
28. Platteau, P., Staessen, C., Michiels, A., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. & Devroey, P. 2005. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Fertility and Sterility* 83; 393-397.
29. Planchot, M. 2003. Genetic analysis of the oocyte-a review. *Placenta* 24; S66-S69.
30. Munne, S., Fischer, J., Warner, A., Chen, S., Zouves, C. & Cohen, J. 2006. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertility and Sterility* 85(2); 326-332.
31. Werlin, L., Rodi, I., DeCherney, A., Marello, E., Hill, D. & Munne, S. 2003. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnosis tool in assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility* 80; 467-468.
32. Werlin, L., Rodi, I., DeCherney, A., Marello, E., Hill, D. & Munne, S. 2004. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) as a beneficial tool in women with recurrent pregnancy loss (RPL) and avanced maternal age (AMA) (abstract N° P-299). In: Programs and abstract of the Annual Conference of the American Society of Reproductive Medicine, Philadelphia, PA 2004; S241.
33. Rai, R. & Reagan, L. 2006. Recurrent miscarriage. *Lancet* 368(9535); 601-611.
34. Rubio, C., Pehlivan, T., Rodrigo, L. Simon, C., Remohí, J. & Pellicer, A. 2005. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *American Journal of Reproduction Immunology* 53(4); 159-165.
35. Kahraman, S., Benkhalifa, M., Donmez, E., Biricik, A., Sertyel, S., Findikli, N. & Berkil, H. 2004. The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenatal Diagnosis* 24; 307-311.
36. Rubio, C., Simon, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohi & Pellicer, A. 2003. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction* 18; 182-188.
37. Wilton, L. 2005. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome análisis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Human Reproduction Update* 11; 33-34.
38. Pehlivan, T., Rubio, C., Rodrigo, L., Romero, J., Remohi, J., Simon, C. & Pellicer, A. 2003. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reproductive Biomedicine Online* 6 (2); 232-237.
39. Findikli, N., Kahraman, S., Saglam, Y., Beyazyurek, C., Sertyel, S., Karlikaya, G., Karagozogu, H. & Aygun, B. 2006. Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage. *Reproductive Biomedicine Online* 13 (1); 38-46.

40. Platteau, P., Staessen, C., Michiels, A., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. & Devroey, P. 2006. Which patients with recurrent implantation failure alter IVF Benedit from PGD for aneuploidy screening?. *Reproductive Biomedicine Online* 12 (3): 334-339.
41. Schieve, L.A., Rasmussen, S.A. & Back, G.M. 2004. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? *Obstetrics and Gynecology* 103(6); 1154-1163.
42. Pang, M.G., Kim, Y.J., Lee, S.H. & Chang-Keun, K. 2005. The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Human Reproduction* 20(6);1688-1694.
43. Rodrigo, L., Rubio, C., Mateu, E., Simon, C., Remohi, J., Pellicer, A. & Gil-Salom, M. 2004. Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescent in situ hybridization. *Human Reproduction* 19(1); 118-123.
44. Somprasit, C., Aguinaga, M., Cisneros, P.L., Torsky, S., Carson, S.A., Büster, J.E., Amato, P., McAdoo, A.L., Simpson, J.L. & Bischoff, F.Z. 2004. Paternal gonadal mosaicism detected in a couple with recurrent abortions undergoing PGD: FISH analysis of sperm nuclei proves valuable. *Reproductives Biomedicine Online* 9(2); 225-230.
45. Donoso, P., Platteau, P., Papanikolaou, E.G., Staessen, Van Steirteghem, A & Devroey P. 2006. Does PGD for aneuploidy screening change the selection of embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men? *Human Reproduction* 21(9); 2390-2395.
46. Staessen, C., Tournaye, H., Van Assche, E., Michiels, A., Van Landuyr, L., Devroey, P., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. 2003. PGD in 47, XXY Klinefelter's syndrome patients. *Human Reproduction Update* 9(4); 319-330.
47. Otani, T., Roche, M., Mizuike, M., Colls, P., Escudero, T. & Munne, S. 2006. Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and unsuccessful pregnancies. *Reproductives Biomedicine Online* 13(6); 869-874.
48. Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. 2004. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Human Reproduction* 19(12); 2849-58.



### Instituto de Ginecología y Fertilidad

M.T. de Alvear 2259 7° Piso  
(C1122AAI) Buenos Aires  
República Argentina  
Tel: 5777-2500 (líneas rotativas)  
Fax: 5777-2555  
Email: ifer@ifer.com.ar

Visítenos en la web:  
[www.ifer.com.ar](http://www.ifer.com.ar)

