

## 3<sup>ra</sup> reunión científica SAMeR 27/05/2012

Laura Kopcow

Médico asociado del PREGNA Medicina Reproductiva  
Reproducción 2012;27:160-168

El jueves 17 de mayo de 2012 se realizó la 3<sup>a</sup> reunión científica de SAMeR. Dicha reunión se llevó a cabo en la Fundación Cassará, Avenida de Mayo 1190. El tema abordado fue “**Genética y reproducción**”.

### Fundamentos de distintas técnicas utilizadas en *screening* de aneuploidías en diagnóstico genético preimplantación

Laura Kopcow

Pregna Medicina Reproductiva.

El objetivo de este resumen es explicar los fundamentos de las distintas técnicas aplicables en *screening* de aneuploidías en embriones preimplantatorios, evaluar sus ventajas y desventajas, y realizar una comparación entre ellas.

Las tres técnicas que se describen son: hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), *arrays* de hibridación genética comparativa (aCGH) y *arrays* de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs *arrays*).

#### FISH

La primera técnica utilizada para *screening* de aneuploidías en embriones preimplantatorios fue la hibridación *in situ* por fluorescencia. Esta técnica fue aplicada durante más de 10 años.<sup>1</sup>

Técnica: Una vez obtenida la biopsia, se realiza la *fijación* del material genético. Esta es la única técnica, de las tres descriptas, que requiere este

paso. Luego de que la muestra es fijada sobre un portaobjetos, se le agregan sondas de ADN marcadas con fluorescencia, que se unen, luego de la desnaturalización (separación de las dos cadenas de ADN), con un sector específico de cada cromosoma (hibridación). Posteriormente se realizan lavados con detergentes y se observa al microscopio de fluorescencia una señal por cada cromosoma marcado, en un color determinado. En las sondas de FISH se utilizan hasta 5 fluorocromos, pudiéndose evaluar hasta 5 cromosomas en cada lectura al microscopio. Habitualmente en la primera ronda de FISH se leen los cromosomas 13 (fluorocromo rojo), 16 (fluorocromo Acqua), 18 (fluorocromo azul), 21 (fluorocromo verde) y 22 (fluorocromo amarillo). En la lectura microscópica se observa una señal color-específica por cada cromosoma evaluado. Luego de la primera lectura se realiza un lavado y una segunda vuelta de FISH y utilizándose habitualmente sondas para los cromosomas X (fluorocromo verde), Y (fluorocromo anaranjado) y 15 (fluorocromo Acqua). Se puede agregar además sonda para el cromosoma 17 u otro según el caso. Para las translocaciones se realiza una tercera vuelta utilizando sondas teloméricas y centroméricas para los cromosomas involucrados en la translocación.

Pasos del FISH:

1. Fijación.
2. Agregado de sondas fluorescentes.
3. Desnaturalización.
4. Hibridación.
5. Lectura.
6. Lavado.
7. Rondas sucesivas.

Si bien existen distintas variantes de aplicación en cada uno de sus pasos, la particularidad de esta

---

**Correspondencia:** Laura Kopcow  
E-mail: lkopcow@pregna.com.ar

técnica es que es sumamente artesanal.<sup>2</sup> Para tener buenos resultados requiere entrenamiento y experiencia. Uno de los principales problemas del FISH es que al fijar el núcleo, lleva una estructura tridimensional a una imagen bidimensional, con la posibilidad de superponer o partir señales. Hay distintas técnicas de fijación que muestran menor tasa de errores (método con Carnoy).<sup>3,4</sup> Se deben utilizar sondas para al menos 8 cromosomas. Para una correcta lectura se necesitan al menos dos personas. En caso de que existan dudas en la interpretación, se requiere utilizar sondas que identifiquen otros sectores del cromosoma.<sup>5,6</sup> Es sumamente importante la experiencia de quien realiza la lectura ya que la interpretación es subjetiva.

Por otro lado, esta técnica evalúa un número limitado de cromosomas. Existen 5 fluorocromos y no se aconseja realizar más de 3 vueltas de FISH, debido a que incrementaría el riesgo de pérdida de material genético.

Con respecto al límite del número de cromosomas que se pueden evaluar por FISH, si se realiza la lectura de 10 cromosomas, se detecta el 86% de las anomalías diagnosticadas por aCGH en blastocistos de buena calidad.<sup>7,8</sup>

## aCGH

La primera aplicación de CGH para *screening* de aneuploidías fue con mCGH (CGH de metafase).<sup>9,10</sup> En esta técnica se utiliza un portaobjetos con un número normal de cromosomas fijados en metafase. Se realiza una amplificación de la muestra a evaluar y de una muestra control (con cantidad normal de cromosomas) (46, XY). La muestra a testear se marca con fluorescencia verde y la muestra control con fluorescencia roja; y se hibridizan con los cromosomas fijados en metafase. Si existe igual cantidad de un cromosoma determinado entre las dos muestras, se unirán por igual con los cromosomas en metafase. En cada cromosoma la mezcla de fluorescencias verde y roja mostrará un color amarillo. En el cromosoma que presente una trisomía en la muestra a testear habrá mayor hibridización de fluorescencia verde. Si en la muestra a testear hay un cromosoma de menos, predominará la fluorescencia roja, evidenciando la presencia de una monosomía. Esta información es interpretada por un *software* que

lleva el resultado a un gráfico.

Si bien esta técnica permite evaluar los 23 pares de cromosomas, su principal problema es que el resultado demora 72 hs, siendo necesario vitrificar los embriones biopsiados.<sup>11,12</sup>

Los fundamentos del aCGH son similares a los de mCGH. En lugar de hibridizar las muestras con cromosomas en metafase, las muestras amplificadas son hibridizadas con un número determinado de fragmentos de ADN específicos de cada cromosoma que se encuentra en un *chip*. Los aCGH actualmente utilizados tienen al menos la misma resolución que un cariotipo por bandeado. En cada punto del *chip* se encuentran los fragmentos de ADN descriptos, y habrá marcas amarillas en caso de cantidad normal de cromosomas, marcas rojas ante una monosomía y marcas verdes ante una trisomía. Como la hibridización es llevada a cabo con fragmentos de ADN, se pueden detectar excesos o defectos de sectores de cada cromosoma (siendo esto importante en el caso de translocaciones). El *chip* es leído por un láser y la información es analizada por un *software*.

Resumiendo, los pasos de aCGH son:

1. Amplificación.
2. Marcación con fluorescencia.
3. Hibridización con el *array*.
4. Lectura.
5. Análisis informático.

El beneficio de esta técnica es que la obtención del resultado demora 12 horas. De llevarse a cabo en el mismo centro o en la misma ciudad donde se realiza la biopsia, no es necesario vitrificar los embriones biopsiados.

Ventajas:	Desventajas:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite evaluar 24 cromosomas en 12 hs.</li> <li>• No requiere fijación.</li> <li>• No requiere vitrificación.</li> <li>• Interpretación simple.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto costo.</li> <li>• Bajo protocolos de investigación.</li> <li>• Técnica laboriosa.</li> <li>• Requiere entrenamiento.</li> </ul>

## ¿Qué es un SNP?

La información genética de una persona se encuentra distribuida en 23 pares de cromosomas, que a su vez se encuentran integrados por 3.200.000.000 pares de bases.

El 99,9% de la codificación de estos pares de

bases es idéntico entre los distintos seres humanos. Un individuo determinado difiere en el 0,1% de su codificación genética del resto de la población.

Existen dos combinaciones posibles de las bases de ADN: Adenina-Tiamina y Citosina-Guanina. Un SNP es un cambio de una base en una secuencia de bases del genoma, que ocurre en una proporción significativa (>1%) de una población. Es la forma más simple y el origen más común de polimorfismo genético en el genoma humano. La variación de una base en una secuencia puede tener efecto en el fenotipo, determinar la respuesta a un medicamento o el comportamiento ante distintas enfermedades. Sin embargo, un porcentaje importante de los polimorfismos de un nucleótido no se encuentra asociado con expresión en el fenotipo ni funciones celulares específicas.

Están descritos 10 millones de SNPs en el genoma humano. Ocurren cada 300-1.000 pares de bases.

### SNPs arrays

El primer paso para la aplicación de SNPs arrays consiste en identificar ciertos polimorfismos presentes en los dos integrantes de la pareja. De los SNPs presentes se determinan taqs (asociación de determinados SNPs que tienden a heredarse en forma conjunta). Los taqs permitirán identificar en el embrión la cantidad de cromosomas provenientes del padre y de la madre.

En un *microchip* se identificarán los taqs presentes en el embrión. En cada punto de este dispositivo se encuentran secuencias de bases complementarias del ADN del embrión y será marcado con un fluorocromo u otro según cual SNP (Ade-

nina-Tiamina o Citosina-Guanina) presenta el embrión.

La distribución de la fluorescencia es leída por un láser, y mediante un *software* se obtiene el resultado que informa si existe un equilibrio entre los cromosomas provenientes del óvulo o del espermatozoide. De haber cromosomas en exceso o de menos se puede determinar su origen.<sup>13</sup>

Entonces, los pasos de la técnica de SNP-array son:

1. Selección de SNPs.
2. Diseño de Taq primers – PCR.
3. Amplificación del ADN.
4. Captura de productos con fluorescencia en el *microarray*.
5. Lectura de señales con *scanner*.
6. Análisis informático.

En la Tabla 1 se describen las diferencias entre las tres técnicas descriptas.

Existe un aspecto a tener en cuenta cuando se utiliza alguna de estas técnicas. Si bien se ha propuesto transferir los embriones en un ciclo no estimulado para evitar el endometrio hiperestrogénico, hay trabajos que muestran que la vitrificación de embriones biopsiados disminuye la tasa de implantación en forma significativa.<sup>14</sup>

En conclusión, probablemente el aCGH competirá con los SNP array como método de *screening* de aneuploidías. Sin embargo, hasta el momento no existen trabajos prospectivos randomizados que demuestren un incremento de la tasa de nacidos vivos por ciclo iniciado al utilizar algunas de estas técnicas.

**Tabla 1.**

Técnica	FISH	aCGH	SNPs array
Lectura	Subjetiva	Sistema informatizado	Sistema informatizado
Fijación	Sí	No	No
Identifica poliploidías	Sí	No	Solo haploidías o triploidías
Requiere amplificación de ADN	No	Sí	Sí
Pares de cromosomas que identifica	5-12	23	23
Requiere evaluación previa de DNA de la mujer y del varón	No	No	Sí
Translocaciones	Requiere uso de sondas específicas	Técnica habitual	Técnica habitual
Diferencia translocación balanceada de normal	No	No	Sí

## Referencias

- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1995;10:1923-1927.
- Munné S, Wells D, Cohen J. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril* 2010;94(2):408-430.
- Velilla E, Escudero T, Munné S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2002;4(3):210-217.
- 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.
- Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Pellicer A, Remohí J, Rubio C. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010;25(7):1812-1817.
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril* 2007;88:53-61.
- Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod* 2008;23:2596-2608.
- Rius M, Daina G, Obradors A, Ramos L, Velilla E, Fernández S, Martínez-Passarell O, Benet J, Navarro J. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;95:413-416.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munné S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;78:543-549.
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001;345:1537-1541.
- Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, Baltaci V, Kotze D, Unsal E. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil Steril* 2007;87(5):1033-1040.
- Voullaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, Williamson R, Wilton L. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2007;87(5):1053-1058.
- Treff NR, Su J, Mavrianos J, Bergh PA, Miller KA, Scott RT. Accurate 23 chromosome aneuploidy screening in human blastomeres using single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays. *Fertil Steril* 2007;86:S217.
- Van Landuyt L, Verpoest W, Verheyen G, De Vos A, Van de Velde H, Liebaers I, Devroey P, Van den Abbeel EVan. Closed blastocyst vitrification of biopsied embryos: evaluation of 100 consecutive warming cycles. *Hum Reprod* 2011;26(2):316-322.

## Asesoramiento genético en pacientes con oodonación

Florencia Petracchi.

Sección Genética del CEMIC

La necesidad de una mayor interacción entre las especialidades de medicina reproductiva y genética ha sido establecida por diferentes sociedades de medicina reproductiva en el mundo.<sup>1,2</sup> Tanto en áreas claves como diagnóstico genético preimplantación y aborto recurrente, como también en esterilidad primaria, falla de implantación en FIV y factor masculino.<sup>1,2</sup>

Los riesgos de defectos congénitos en fertilización *in vitro* han sido un tema de intenso debate y de publicaciones, incluso en revistas y diarios de difusión masiva.<sup>3-7</sup> Los resultados del trabajo con mayor número de casos y menores sesgos fueron publicados recientemente en el NEJM y las conclusiones a grandes rasgos fueron que: 1) la mayoría de los recién nacidos en fertilización asistida son sanos; 2) el riesgo de defectos congénitos aumenta en embarazos espontáneos en pacientes con infertilidad; y 3) específicamente el riesgo de defectos congénitos no aumenta con la fertilización *in vitro* y sí aumenta con el ICSI, pero no pueden excluirse factores confundidores.<sup>4</sup>

Cariotipo en sangre periférica

Con respecto a en qué parejas en estudio y tratamiento por esterilidad es necesario un cariotipo en sangre periférica:

A) Existe consenso y es indicación precisa en: 1) amenorrea, alteraciones del ciclo menstrual; 2) azoospermia-oligospermia; 3) aborto recurrente; y 4) antecedentes personales y/o familiares de recién nacidos malformados, abortos o pérdidas fetales tardías.<sup>2</sup>

B) En algunos países lo solicitan en toda paciente que va a realizar fertilización asistida y en otros países no. La recomendación depende del costo del estudio en cada país y la frecuencia relativamente baja de encontrar una alteración en el cariotipo.<sup>2</sup>

C) Existen trabajos que demuestran un número considerable de anomalías en el cariotipo parental de pacientes con fallas recurrentes de FIV.<sup>11,12</sup>

La *donación de gametas*, su aplicación y los debates que generan se deben principalmente a un tema cultural, más que médico.<sup>8</sup>

La espermodonación en FIV no está permitida en 9 países: Austria, Noruega, Arabia Saudita, Túnez y Turquía. No está permitida de acuerdo a guías de trabajo en Egipto, Irán, Japón, y Marruecos.<sup>8</sup>

La ovodonación no está permitida en 14 países: Austria, Bangladesh, Egipto, El Salvador, Alemania, Japón, Jordania, Marruecos, Noruega, Portugal, Arabia Saudita, Suiza, Túnez, y Turquía.<sup>8</sup>

Estos son los estudios recomendados por la *American Society of Reproductive Medicine*<sup>9</sup> en pacientes que van a donar gametas:

1) *Screening* genético determinado por la genealogía.

2) *Screening* para fibrosis quística.

3) *Screening tests* recomendados basados en la etnia del donante.

4) El donante y los familiares de primer grado no deben tener una enfermedad mayor multifactorial o mendeliana o cualquier enfermedad significativa con un componente genético importante.

5) Realizar cariotipo de rutina es opcional.

6) Cada centro debe considerar la posibilidad de realizar *screening* para Fra X.

7) Los heterocigotas para enfermedades mendelianas *no deben* ser excluidos *salvo* que el o la receptor/a sea/n portador/a de la misma enfermedad.

8) No deben tener anomalías cromosómicas.

LA OMS se cuestiona si la solicitud de estos estudios en pacientes donantes no representa una forma de eugenesia, ya que no se lo solicita de rutina en parejas que buscan embarazo espontáneo.<sup>2</sup>

Los aspectos psicológicos, éticos y emocionales no han sido suficientemente explorados.<sup>10</sup>

En CEMIC realizamos un trabajo acerca de qué estudios prenatales para detección de anomalías cromosómicas realizaban las pacientes con ovodonación.

Ha sido reportado que las pacientes con fertilización asistida realizan un número menor de estudios invasivos prenatales que las pacientes con embarazos espontáneos. Sin embargo, no hay trabajos que evalúen estas elecciones en pacientes con ovodonación. Analizamos nuestra población de 20,142 embarazadas entre 2004-2011, identificamos a las pacientes con ovodonación y registramos qué estudios habían realizado, si *screening* o estudios prenatales invasivos como VC o amniocentesis. Como grupo control seleccionamos a las mujeres de 30 años, ya que presentan un riesgo similar a las pacientes que reciben óvulos donados. Se analizaron 102 pacientes con ovodonación y 1,135 mujeres de 30 años. Las pacientes con ovodonación realizaron *screening* en un 64.7% y estudios invasivos en un 35.3%. Las mujeres de 30 años realizaron *screening* en un 90% y en un 10% estudios invasivos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. La conclusión fue que a pesar de tener bajo riesgo de anomalías cromosómicas y haber realizado fertilización asistida, las pacientes con ovodonación llevan a cabo un porcentaje elevado de estudios prenatales invasivos.

## Referencias

1. The need for interaction between assisted reproductive technology and genetics: recommendations of the European Societies of Human Genetics and Human Reproduction and Embryology. *Human Reproduction* 2006;21(8):1971-1973.
2. Soini S, et al. The interface between assisted reproductive technology and genetics: technical, social, ethical and legal issues. *European Journal of Human Genetics* 2006;14:588-645.
3. La fertilización asistida, más riesgosa. *Diario La Nación de Argentina*, 6/5/2012.
4. Davis M, et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2012;366:1803-1813.
5. Perinatal risks associated with reproductive technology. ACOG Committee opinion, number 324. 2005 reaffirmed in 2007. *Obstet and Gynecol* 2005;106:1143-1146.
6. RCOG Scientific advisory committee opinion paper 8 Feb 2007.
7. ASRM. Genetic considerations related to ICSI. *Fert Ster* 2008;90 (Suppl.):182-184.
8. Chapter 6. Donation of gametes. *Fert and Ster* 2004;81(5).

9. Guidelines for gamete and embryo donation. A practice committee report. *Fert and Ster* 2008;90 (Suppl. 3).
10. Hammarberg K. Gamete donors' and recipients' evaluation of donor counselling: A prospective longitudinal cohort study. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2008;48:601-611.
11. Raziél, et al. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;78(3):515-519.
12. Stern, et al. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod* 1999;14(8):2097-2101.

## Aborto recurrente de causa genética. ARRAY

María Laura Igarzabal

### Definición de aborto recurrente:

ACOG 2001: pérdida de 2 o más embarazos consecutivos (5%).

RCOG 2011: es la pérdida de 3 o más embarazos (1%).

Hoy se sabe que la frecuencia de parejas abortadoras es mucho mayor de lo que sería por azar solamente. Existe un subgrupo que tiene una causa predisponente para la pérdida y un grupo de ellas va a tener una anomalía genética.

Desde el punto de vista genético no es necesario que los abortos sean consecutivos.

### Causas genéticas:

- 1) Anomalías cromosómicas del material de aborto: numéricas o estructurales (50-60%).
- 2) Microdeleciones/ duplicaciones.
- 3) Anomalías cromosómicas parentales (estructurales balanceadas, numéricas).
- 4) Anomalías génicas.

- 1) La mayoría de las anomalías cromosómicas se dividen en 3 grandes grupos:
  - Trisomías: 50%.
  - Monosomías X: 20%.
  - Poliploidías: 15% (triploidías 69 cromosomas; tetraploidías 92 cromosomas).

Debemos saber que los CGH ARRAY no

detectan poliploidías, y los SNP ARRAY no detectan tetraploidías. Dentro de las anomalías cromosómicas se incluye el *mosaico confinado a la placenta*. El CGH ARRAY lo detecta, pero tiene que tener un 15% de células anormales, mientras que el SNP ARRAY detecta un 10%.

La elección de la técnica a utilizar tiene que ver con los factores de riesgo.

### Factores de riesgo para anomalías cromosómicas

- Edad materna (asociado a trisomías).
- Edad gestacional (cuanto más temprano hay más riesgo de trisomías).
- Semana 5-7: 90%.
- Semana 8-11: 50%.
- Semana 16-19: 30%.
- Malformaciones.
- Número de abortos: a partir del 4º o 5º aborto aumenta el porcentaje de abortos euploides.
- Cariotipo parental.
- Cariotipo en abortos previos (relacionado con el riesgo de recurrencias).

#### 2) Microdeleciones.

No se detectan por cariotipo, sólo por biología molecular (FISH, MLTA, ARRAY).

#### 3) Anomalías cromosómicas parentales estructurales o numéricas (en 2-5% de parejas abortadoras).

Rearreglos cromosómicos balanceados.

Trisomías autosómicas.

Anomalías de cromosomas sexuales.

#### 4) Anomalías génicas: es lo más complicado. En el genoma humano hay 25.000 genes. De la mitad se desconoce la función y se sabe poco acerca de los genes que intervienen en la reproducción y la formación de la placenta. Existen 2 grupos.

- a) Mutación en genes que producen enfermedades y que como manifestación de la enfermedad pueden producir abortos.
- b) Mutaciones en genes relacionados con la reproducción: hemoglobinopatías, deficiencias enzimáticas, enfermedades por depósito, trombofilias, enfermedades dominantes ligadas al X. Estas patologías se pueden manifestar como muerte intrauterina, abortos tardíos.

### Técnicas utilizadas para el diagnóstico en material de aborto:

- 1) Para el estudio de anomalías cromosómicas numéricas, mosaicismos y anomalías estructurales desbalanceadas: *CARIOTIPO Y TÉCNICAS MOLECULARES*.
- 2) Microdeleciones/ duplicaciones: *TÉCNICAS MOLECULARES*.
- 3) Mola completa: *SNP ARRAY*.
- 4) Anomalías monogénicas: *TÉCNICAS MOLECULARES*.

Técnicas utilizadas para el diagnóstico en los padres:

- 1) Para diagnóstico de anomalías cromosómicas numéricas y anomalías estructurales balanceadas: *CARIOTIPO* (gold standard).
- 2) Para microdeleciones/ duplicaciones y anomalías monogénicas: *TÉCNICAS MOLECULARES*.

Recomendaciones

- ACOG 2001: Cariotipo parental.
- RCOG 2011: Cariotipo de material de aborto a partir del 3<sup>er</sup> aborto.

Cariotipo parental si en el material de aborto hay anomalías estructurales desbalanceadas.

- No se indica de rutina el estudio de anomalías génicas, microdeleciones, duplicaciones, mosaicismo confinado a la placenta. Es importante individualizar de acuerdo a la historia clínica, antecedentes familiares, y la anatomía patológica de placenta, feto o embrión.
- No es recomendación universal el estudio de trombofilia.

Muestras por punción: vellosidades coriónicas, biopsia de placenta, líquido amniótico.

Para cariotipo: utilizar técnica de cultivo.

Para técnicas moleculares y estudiar el ADN: usar el cultivo o el examen directo.

#### ARRAY

Detecta porción de ADN mayor a 1KB (1000 bp) que está presente en un número de copias anormal en comparación con genoma de referencia normal. Tiene una resolución 100 veces mayor que el cariotipo.

Detecta deleciones y duplicaciones del tamaño de 50.000 pares de bases. Es menor que 5.000.000 de pares de bases del cariotipo. A estas deleciones

se las llama *Copy Number Variants* (CNV). Son de 3 tipos:

- 1) Benignas: las que se ven en porcentajes iguales en afectados y en sanos.
- 2) Patogénicas: se ven en personas enfermas.
- 3) De significado incierto: que todavía no han sido descritas.

CGH ARRAY: detecta copias en más o en menos.

SNP ARRAY: detecta copias en más o en menos y, además, detecta zonas de homocigidad.

En una persona normal existen 1 a 5 zonas de homocigidad. En la disomía uniparental (los 2 cromosomas heredados del mismo padre) hay más de 10, y en consanguinidad mucho más. Como el SNP ARRAY tiene de cada SNP 2 alelos (1 de madre y 1 del padre), en la mayoría de los casos esos alelos son diferentes, por lo tanto, es muy poco probable que un SNP sea igual homocigota de la madre y el padre. La presencia de SNP iguales homocigotas nos hace sospechar que existe: disomía uniparental, consanguinidad (esto es un problema en ARRAY porque muchas veces no lo sabían), molas completas.

La mola se sospecha cuando en el material de aborto hay muchas zonas homocigotas.

SNP ARRAY expresa el N° de copias y homocigidad de los alelos.

### Ventajas del ARRAY vs cariotipo convencional

- Mayor resolución.
- No necesita cultivo.
- Menor tiempo.
- Automatizado.
- Diagnostica todas anomalías cromosómicas no mosaico desbalanceadas que diagnostica el cariotipo por bandeó G.

### Utilidad en la práctica clínica

#### Diagnóstico prenatal

- Anomalías ecográficas con cariotipo normal.
- Interpretar hallazgos del cariotipo por bandeó G que desconocemos qué quieren decir.
- Muerte intrauterina y aborto porque no necesita cultivo y fracasa el cultivo.

- En muestra en parafina en los que se puede extraer ADN que ya fueron incluidos en parafina.

### **ARRAY. Utilidad en la práctica clínica**

Uso SNP ARRAY:

- Diagnóstico de disomía uniparental.
- Consanguinidad.
- Molas completas 46XX.
- Contaminación de células maternas (hay alelos diferentes, más de 2 que provienen de personas distintas).

El ARRAY se usa en forma directa. El cultivo se utiliza en casos en que el ADN es insuficiente o de mala calidad, cuando se necesita otro estudio, cuando el líquido amniótico es menor a 16 semanas o en fetos macerados.

La Dra mostró un metaanálisis (Hillman 2011) en donde se ve el beneficio del uso de ARRAY vs cariotipo convencional.

El ARRAY detecta mayor cantidad de anomalías cromosómicas, mientras que el cariotipo no evidenció anomalías cromosómicas cuando el ARRAY fue normal.

En situaciones como malformaciones ecográficas y edad materna avanzada el ARRAY tiene beneficios de encontrar anomalías extras de 3.6%, con un 1% de copias de significado incierto. Si la indicación del diagnóstico prenatal es por malformaciones ecográficas, el beneficio es del 5%.

Con respecto al uso del ARRAY en material de aborto, hay pocos estudios entre 2004 y 2010 y son heterogéneos. En esos estudios la tasa de anomalías extra varía entre 4 y 30%, aunque las revisiones mencionan una variación entre el 1 y 13%.

### **Limitaciones de ARRAY en aborto**

No detecta

- Triploidías, tetraploidías, translocaciones balanceadas, mosaicismo, mutaciones puntuales.
- Estructura de las anomalías.
- No diferencia trisomía libre de translocación.

### **Dilemas en el uso de ARRAY en diagnóstico prenatal**

- CNV de significado incierto.

- Hallazgos de amplio espectro: anomalías fenotipo, expresividad variable, penetración incompleta.
- Paternidad.
- CNV no relacionados con la indicación del estudio, por ejemplo, detectar copias de enfermedades de comienzo tardío y predisposición a neoplasias.

### **Recomendaciones para el uso de ARRAY (ACOG, American College Medical Genetics)**

- Anomalías ecográficas con cariotipo normal.
- Muerte intrauterina con malformaciones sin cariotipo.

La Sociedad Humana de Genética (SIGU) indica el uso de ARRAY solo en situaciones prenatales determinadas.

### **Potenciales usos de ARRAY**

- 1) Genoma *Wide Studies*. SNP ARRAY: identificación de polimorfismos que sean factores de riesgo para aborto, lo que requiere familias numerosas con afectados y no afectados.
- 2) Facilitar el descubrimiento de genes candidatos.
- 3) Muestras en parafina. La recomendación es utilizarlas en protocolos de investigación.
- 4) Baylor en EE.UU. tiene un ARRAY que combina CGH y SNP ARRAY. Evalúa 1.714 genes, todo el genoma mitocondrial y 120.000 sondas de SNP. No detecta: bajo nivel de mosaicismo, translocaciones balanceadas, inversiones, mutaciones puntuales y aclara lo que no va a informar.

El asesoramiento del ARRAY es complejo, por lo que hay que estar preparado para interpretar resultados. Es conveniente tener políticas previas sobre CGH de significado incierto, resultados no esperados y situaciones complejas:

- CNV: enfermedades de comienzo tardío.
- CNV: mayor riesgo de neoplasia.
- Descubrir portadores de enfermedades recesivas.
- Descubrir padre afectado leve.
- Consanguinidad, paternidad.



## Conclusiones

En aborto recurrente más de la mitad de los abortos es de causa desconocida o debido a anomalías esporádicas. En la mayoría de los casos el aborto es un evento inevitable que no requiere tratamiento.

### ARRAY

- No diagnostica todas las anomalías cromosómicas.
- CNV de significado incierto.
- CNV: otras patologías no relacionadas con el motivo del estudio.

- No diagnostica todas las patologías genéticas.
- Un resultado negativo no significa que no existe un origen genético.

Existen pocos estudios de ARRAY y aborto, por lo que se recomienda su uso:

- Si fracasa el cultivo.
- Si por ecografía existe alta sospecha de patología genética.
- En investigación de genes críticos en reproducción.
- Su aplicación serviría para disminuir el aborto de causa desconocida y evitar tratamientos empíricos o innecesarios.