

# Diagnóstico preimplantatorio por PCR fluorescente en un varón portador de t(13;14)(q10;q10)

Judith Mincman, Sofía Medrano, Alicia Gallo, Valeria Longobucco, Fernando Gismondi, Nicolás Neuspiller, Roberto Coco

Fecunditas Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.  
Reproducción 2008;23:159-164

## Resumen

Se comunica el comportamiento de la segregación del trivalente meiótico en un portador de t(13;14)(q10;q10) que accedió a un PGD por su criptozoospermia. La mujer de 39 años respondió con 10 óvulos a la estimulación ovárica, los cuales originaron seis embriones biopsiables al tercer día para determinación de aneuploidías, no por FISH, sino por PCR fluorescente previo a la amplificación del genoma con MDA. Se usaron dos marcadores de los cromosomas 13, 21, 18 y X, y uno del 14, 16, 22 e Y. Tres embriones resultaron con trisomía 13 (uno por segregación adyacente paterna, otro por no disyunción materna en meiosis I y el otro por no disyunción materna en meiosis II), uno con una monosomía 14 por segregación adyacente paterna, otro con una monosomía 18 por no disyunción materna, y otro con una haploidía por activación partenogénica. Todos los embriones resultaron anormales. Si el estudio no se hubiese realizado por PCR fluorescente, muy probablemente se hubiese adjudicado el resultado a las implicaciones de la translocación paterna sobre la segregación meiótica de los cromosomas, pero solo dos se debieron a la misma. En el presente caso se infiere que la edad de la pareja favoreció la producción de las restantes aneuploidías. El hecho de que la pareja no haya podido ser transferida con embriones concuerda con lo previamente documentado de que las mujeres con pocos ovocitos embriogénicos tienen el riesgo de no ser transferidas.

**Correspondencia:** Roberto Coco  
Fecunditas, Larrea 790, 1030. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.  
E-mail: robertococo@fecunditas.com.ar

**Palabras claves:** PGD, translocación robertsoniana, factor masculino, QF-PCR, ICSI, segregación del trivalente meiótico, no-disyunción materna.

## Preimplantation genetics diagnosis by QF-PCR in a male carrier of 13;14 Robertsonian translocation

### Summary

We communicate the chromosome segregation of the meiotic trivalent in a male carrier of a Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10) who acceded to a PGD procedure because his criptozoospermia. The 39 years old wife responded to ovarian stimulation with 10 oocytes, which originated six embryos composed of more than 5 cells, which were analysed by QF-PCR with the purpose of determining the aneuploidies for chromosomes 13, 14, 16, 18, 21, 22, X and Y. Three embryos presented with trisomy 13: one due to paternal adjacent malsegregation of the meiotic trivalent, and two of maternal origin, one due to nondisjunction during meiosis I and the other during meiosis II. One embryo had a monosomy 14 due to paternal adjacent malsegregation, one had a monosomy 18 of maternal origin and one was haploid for all studied chromosomes probably by partenogenic activation of the oocyte. All the embryos were abnormal. If the study had not been made by fluorescent PCR, they would have very probably been interpreted as the result of the implications of the segregation of the paternal meiotic trivalent. The maternal age could have predisposed to the other chromosomic aneuploidies.

*The fact that the couple could not be transferred with normal embryos is consistent with previously documented reports where the women that produce less than six embryos have little possibility for embryo transfer.*

**Key words:** PGD, robertsonian translocation, male factor, QF-PCR, ICSI, abnormal segregation of the meiotic trivalent, maternal non-disjunction.

### Introducción

Las translocaciones robertsonianas son uno de los reordenamientos cromosómicos estructurales más comunes en humanos, con una incidencia de 1.23 portadores por cada 1.000 nacidos (Nielsen y Wohlert, 1991) y que aproximadamente en 50% de los casos aparecen *de novo* (Shaffer y col, 1992).

La que se observa con más frecuencia en la población general es la translocación t(13;14) con una incidencia de 0.97 portadores por cada 1.000 nacidos (Nielsen y Wohlert, 1991). Esta frecuencia puede llegar a incrementarse hasta 9 veces en poblaciones de individuos infértiles (De Braekeleer y Dao, 1991).

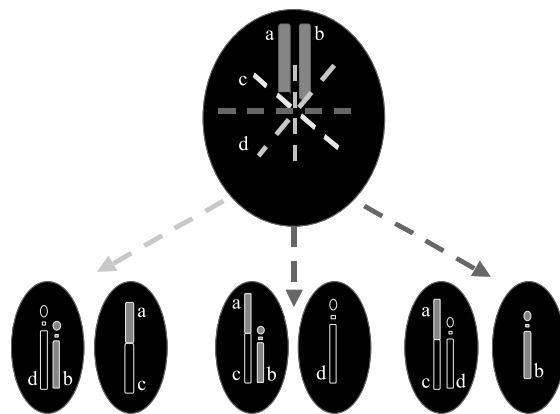
Se considera que la infertilidad en estos individuos está directamente relacionada con las implicaciones del reordenamiento cromosómico durante el proceso meiótico, tales como la segregación anormal del trivalente, la falla en el apareamiento de los cromosomas involucrados en la translocación (asinapsis) y el posible efecto sobre la disyunción de otros cromosomas (efecto intercromosómico, Lejeune, 1963).

Desde el punto de vista teórico los portadores de translocaciones t(13;14) tienen 66% de riesgo para originar gametos con segregaciones anormales, los cuales originan cigotos anormales. Durante el desarrollo posterior, la mayoría de estos cigotos anormales se pierden en el periodo preimplantatorio y en menor proporción en el periodo embrionario. Cuando el portador es un varón, el riesgo de 66% de aneuploidía en la fecundación disminuye a 1% en el segundo trimestre del embarazo. En cambio, cuando la portadora es la mujer el riesgo disminuye a 5%.

El estudio del semen con FISH en portadores de translocaciones robertsonianas evidencia que la mayoría de los varones con translocación 13;14 tienen mucho menos riesgo que el teórico para originar espermatozoides aneuploides. Asimismo, no todos evidencian efecto intercromosómico para los cromosomas sexuales o los cromosomas 18 y 21 (Coco y col, 2005).

### Objetivo

Comunicar los resultados de la segregación del trivalente 13; 14 en un portador de t(13;14) que accedió a un PGD por su infertilidad.



### Pacientes y métodos

Se trata de un varón con criptozoospermia portador de una t(13;14), quien accede a un tratamiento de reproducción asistida ICSI por su infertilidad y al mismo tiempo al PGD para el estudio de las aneuploidías cromosómicas 13, 14, 18, 21, X e Y.

La mujer de 39 años de edad respondió a la estimulación ovárica con diez ovocitos, los cuales originaron seis pre-embriones biopsiables al tercer día para el estudio de las aneuploidías de los cromosomas mencionados, no por FISH, sino por PCR fluorescente usando marcadores polimórficos de dichos cromosomas. Se usaron dos marcadores del #13, #21, #18 y #X; y uno del #14, #16, #22 e #Y.

El ADN de cada una de las células biopsiadas se amplificó totalmente con el mini *kit* REPLI-g® (Qiagen). Con el ADN amplificado se realizaron tres multiplex. Una conte-

niendo uno de los STRs para los cromosomas 13, 18, 21, X, Y; otra con los otros STRs de los mismos cromosomas; y la tercera con los STRs de los cromosomas 14, 16 y 22.

Los amplicones fueron analizados utilizando el ABI PRISM 310 *genetic analyzer*<sup>®</sup> (Applied Biosystems).

## Resultados

De los 6 pre-embriones biopsiados, 3 tuvieron trisomía 13, uno una monosomía 14, uno una monosoma 18 y uno fue haploide para todos los cromosomas estudiados.

En la Tabla 1 figuran los resultados de cada uno de los marcadores estudiados.

**Tabla 1.** Resultados de los STRs en los embriones y progenitores.

STRs	MADRE		PADRE		EMBRIONES														
					# 1		# 2		# 3		# 4		# 5		# 6				
D13S17	194	178	182	190	194	182	190	178	190	194	182	194		178	194	182	194	194	182
D13S631	195	207	195	211	207	195	211	207	211	207	211	195		195	207	211	207	207	211
D18S386	357	377	353	345	357	345			345	357	353	377			357	353		357	353
D18S1145	124	124	122	124	124	124	?		124	124	122	124			124	122		124	122
D21S1411	192	200	200	200	192	200		200	200	192	200	192			192	200		192	200
D21S268	130	140	134	134	140	134		130	134	130	134	130			140	134		130	134
D14S45	98	100	98	98	100	98		98	98?	100		100			100	98		98	98?
D16S3082	146	158	164	164	158	164		158	164	158	164	146			158	164		146	164
D22S83	125	131	116	131	125	116		125	131	125	131	131			131	131	?	125	131
DXS1055	109	111	115		109	115		111	115	111		111			111	115		109	115
DX15	148	154	150		148	150		154	150	148		148			148	150		154	150
Y93				118								118							

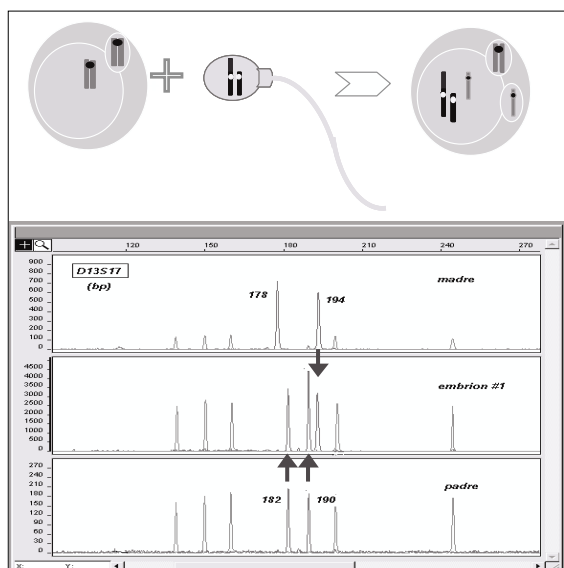
STRs expresados en pares de bases. Los recuadros engrosados corresponden a las anomalías halladas.

# embrión	Resultados
1	Trisomía 13 por seg. adyacente trivalente paterno
2	Monosomía 18 por nulisomía materna
3	Monosomía 14 por seg. Adyacente trivalente paterno
4	Haploide por activación del ovocito
5	Trisomía 13 por no disyunción materna en MI
6	Trisomía 13 por no disyunción materna en MII

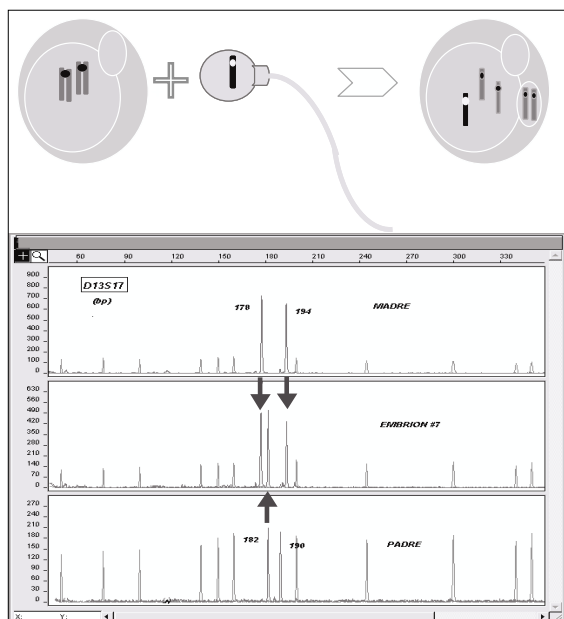
**Tabla 2.** Resumen de los resultados de los estudios cromosómicos en los embriones.

De los tres con trisomía 13, el embrión #1 evidenció dos alelos paternos del 13 y uno de los alelos de la madre (Figura 1, segregación adyacente paterna); el embrión #5 evidenció

**Figura 1.** Trisomía 13 translocada por segregación adyacente del trivalente paterno (fecundación de un óvulo normal con un espermatozoide anormal con disomía 13).

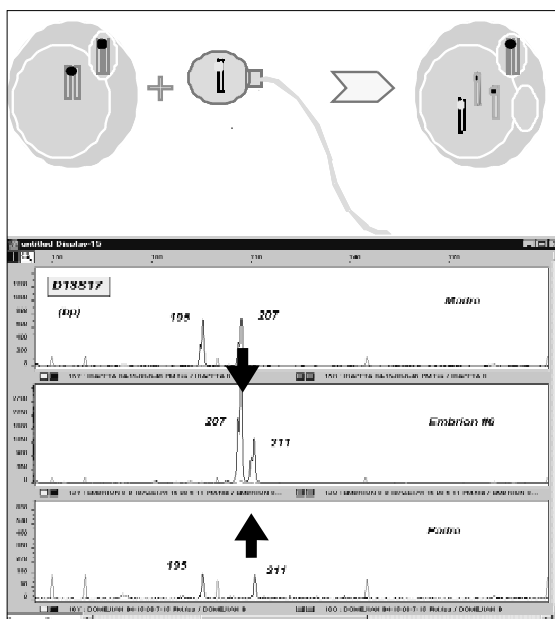


**Figura 2.** Trisomía 13 por no disyunción materna en meiosis I (fecundación de un ovocito anormal con no disyunción del par 13 por un espermatozoide normal).



dos alelos maternos y uno paterno (Figura 2, no disyunción materna en meiosis I) y el embrión #6 un alelo materno en proporción al doble y uno paterno (Figura 3, no disyunción materna en meiosis II).

**Figura 3.** Trisomía 13 por no disyunción materna en meiosis II (fecundación de un ovocito normal con un espermatozoide normal pero con la subsiguiente no disyunción del 13 durante la segunda división del ovocito).



La monosomía 14 (embrión #3) evidenció un solo alelo de la madre (segregación adyacente paterna).

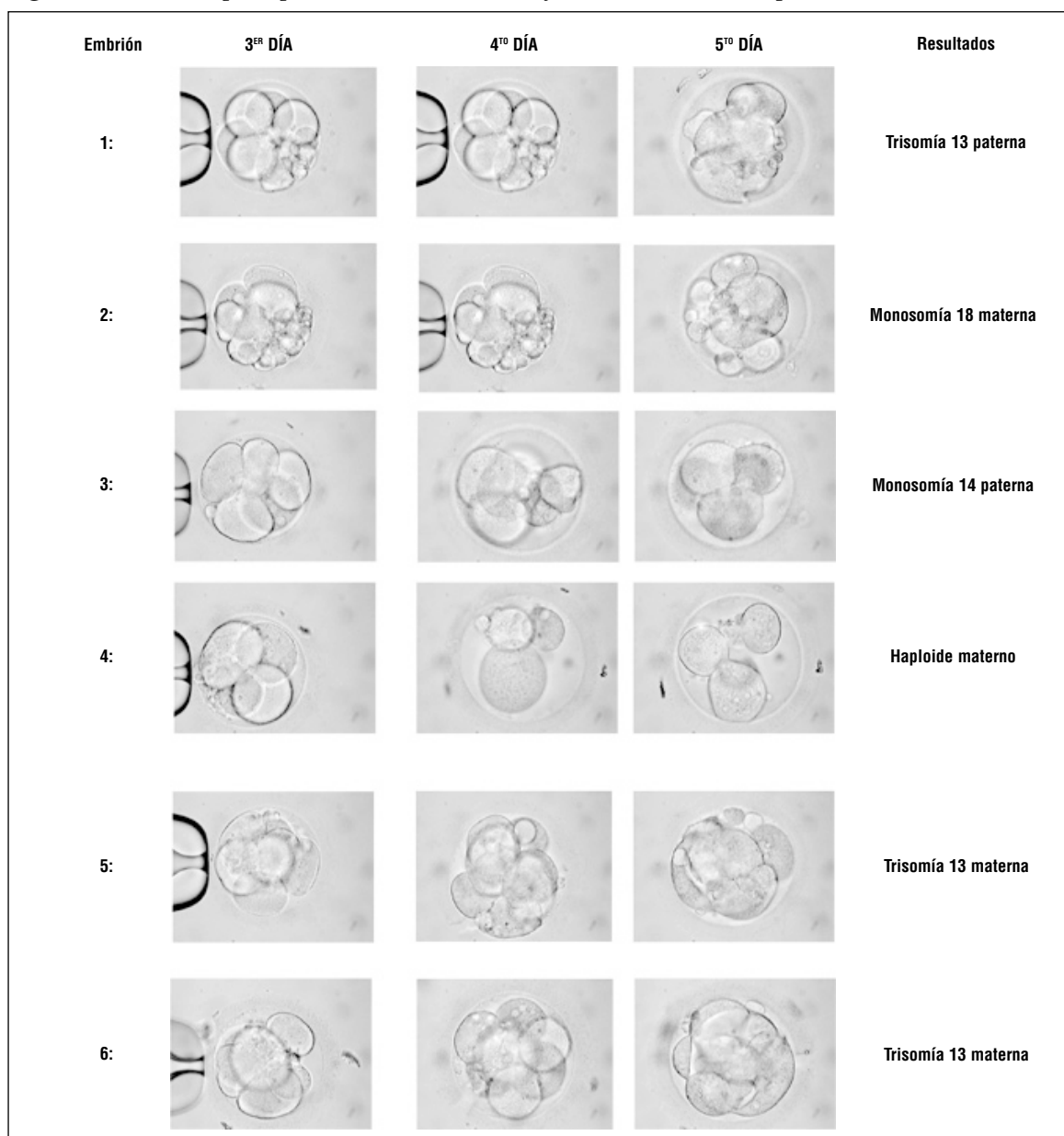
La monosomía 18 (embrión #2) evidenció un solo alelo del padre (no disyunción materna).

La haploidía (embrión #4) evidenció un solo alelo materno para todos los marcadores (activación partenogénica).

### Discusión

Es conocido que los portadores de translocaciones 13;14 tienen un riesgo teórico para segregaciones anormales del 66% de acuerdo con el Esquema 1.

En el presente estudio todos los embriones

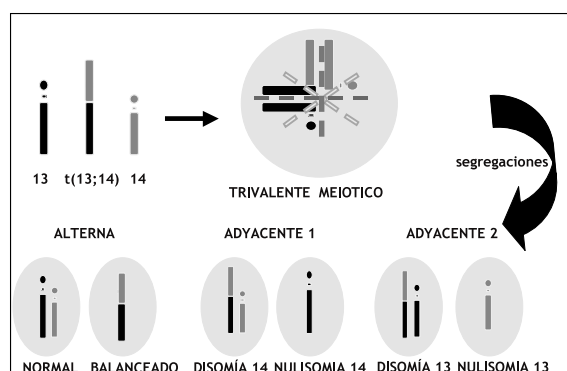
**Figura 4.** Desarrollo preimplantacional de los huevos fecundados clivados biopsiados.

Nótese que los embriones #2, #3 y #4 fueron no evolutivos, mientras que los embriones trisómicos (#1, #5 y #6) fueron evolutivos.

estudiados resultaron anormales. Si el estudio se hubiera realizado por FISH, muy probablemente se hubiesen adjudicado a segregaciones anormales predisuestas por la translocación paterna. El estudio de las aneuploidías por PCR fluorescente nos permitió determinar el origen de las mismas. Solo dos de las anomalías se debieron a la segregación anor-

mal del trivalente meiótico paterno. Tres de las 4 restantes fueron de origen materno y muy probablemente relacionadas con la edad materna aumentada, mientras que la última anomalía se debió al estímulo mecánico del ovocito que entró en embriogénesis al inyectar el espermatozoide, con la subsiguiente eyección del mismo (partenogénesis inducida

**Esquema 1.** Segregaciones del trivalente meiótico  $t(13;14)$ .



por la manipulación). Este efecto benévolo de la translocación  $t(13;14)$  en sus patrones de segregación ya fue descrita por otros autores (Antón y col, 2004; Coco y col, 2005).

Se señala la importancia de este tipo de estudios en el esclarecimiento del comportamiento de la segregación del trivalente meiótico, que de no haberse realizado con esta metodología se hubieran atribuido a las implicaciones de translocación  $t(13;14)$ . Teniendo en cuenta los datos de riesgo empírico para dicha translocación en los varones, la edad materna parecería que juega el mismo rol o más en la producción de aneuploidías que la translocación  $t(13;14)$ .

El hecho de que la pareja no haya podido ser transferida con embriones normales está en acuerdo con lo registrado internacionalmente, en que más del 60% de los PGDs con menos de seis embriones biopsiados no

llegan a la transferencia por ser anormales o no evolutivos (Data VII PGD consortium ESHRE, 2008).

Consideramos que sería interesante ampliar este tipo de estudios en individuos portadores de translocaciones robertsonianas y recíprocas con la finalidad de aportar más datos sobre el comportamiento meiótico del multivalente y sus efectos indirectos sobre otros cromosomas.

#### Referencias

- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation  $t(13;14)(q10;q10)$ . Hum Reprod 2004;19(6):1345-1351.
- Coco R, Coco Ludueña F, Urquiza M, Mincman J, Gallo A, Gismondi F, Neuspiller N. Riesgo genético reproductivo en portadores de rearrreglos cromosómicos. Revista Reproducción 2005;20(1):25-36.
- De Braekeleer M, Dao T-N: cytogenetic studies in male infertility: a review. Hum Reprod 1991;6:245-250.
- Harper JC, de Die-Smulders C, Goosens V, Harton G, Montou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synidimos J, Van Rij MC, Viville S, Wilton L, Sermón KD. Eshre PGD consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005. Hum Reprod 2008;23(4):741-755.
- Lejeune J. Autosomal disorders. Pediatrics 1963;32:326-337.
- Nielsen J, Woblert M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: from 13 year incidence study in Arhus, Denmark, Hum Genet 1991;87:81-83.
- Schaffer LG, Jackson-Cook CK, Stasiowski BA, Spence JE, Brown JA. Parental origin determination in thirty de novo Robertsonian translocation. Am J Med Genet 1992; 43:957-963.
- Tur-Kaspa I, Bernal A, Tkachenko N, Pawlovska J, Rechitsky S, Verlinsky Y. To PGD or not to PGD. is there a magic number of oocytes to start with? Fertil Steril 2008;88:S231-S232.