

Genética reproductiva: **Screening** genético preimplantatorio (PGS) - Indicaciones y técnicas

Reproducción 2017;32:41-43

Integrantes de la mesa

Roberto Coco (Coordinador)

Pamela Nicotra Perassi (Secretaria)

Laura Kopcow

Alicia Pené

Adán Nabel

Marcos Pierro

Cristian Álvarez Sedó

El *screening* genético preimplantatorio (PGS) permite la detección de alteraciones cromosómicas numéricas, aneuploidías, presentes en embriones producto de una fertilización *in vitro*.

Es una metodología que combina una técnica de micro-manipulación embrionaria (biopsia) junto con el estudio genético de las células extraídas para inferir la constitución cromosómica del embrión biopsiado.

La mayoría de las aneuploidías cromosómicas homogéneas es letal, tanto en la etapa preimplantatoria y embrionaria, e interfieren con la implantación y son causa de abortos espontáneos. Por lo tanto, la transferencia de embriones euploides, sin anomalías cromosómicas, tiene la finalidad de mejorar los resultados en los procedimientos de FIV/ICSI, al permitir elegir al embrión que pueda establecer un embarazo evolutivo.

A) Indicaciones de PGS

Es bien reconocido que aproximadamente la mitad de los embriones originados *in vitro* tiene aneuploidías, aún en pacientes sin historia de fallas repetidas en FIV o de abortos espontáneos. Además, la tasa de aneuploidía aumenta con el avance de la edad materna, desde un 30% en mujeres de ≤ 35 años hasta 80% en mujeres ≥ 40 años de edad.

Por lo tanto, las mujeres de más de 35 años son las que se podrían beneficiar con la selección de los embriones euploides. Pero está bien reconocido que con el aumento de la edad

materna, la reserva ovárica y la respuesta a la estimulación están disminuidas, por lo tanto, se recomienda, previo a acceder a un ciclo de PGS, predecir la cantidad de ovocitos y/o blastocistos que producirá la pareja. Lo recomendable es desentusiar a aquellas mujeres con dosajes hormonales comprometidos y un recuento de folículos antrales muy disminuido. Una alternativa para aquellos casos de pobre respuesta es intentar hacer acopio de ovocitos/blastocistos en varios ciclos de estimulación o en ciclos con estimulación en fase folicular y lútea con la finalidad de contar con un número suficiente de blastocistos que permita elegir a los euploides.

Otros candidatos para el potencial beneficio del PGS, además de la edad materna, son los varones con OAT que se caracterizan por tener una alta tasa de aneuploidía espermática, las parejas con abortos espontáneos por aneuploidías recurrentes, parejas con repetidas fallas en procedimientos de FIV/ICSI, y en definitiva, para las parejas que quieran lograr la mayor eficacia en los procedimientos FIV/ICSI.

Desde el auge del PGS en 1999 hasta el presente ha habido una infinidad de ciclos de PGS reportados, para algunos con mejores tasas de nacidos vivos y para otros con un efecto adverso al esperado, como así también la falta de beneficio alguno. Desde el inicio hasta hace pocos años, la mayoría de los PGS se abordaban por FISH para un número variable de cromosomas, variando entre 5 y 19 cromosomas. En el año 2011 Mastenbroeck realiza un metaanálisis sobre PGS. Sobre

nueve ensayos clínicos (RCTs), todos abordados por FISH con biopsia en D+3, excepto uno que fue en D+5, concluye que la tasa de nacidos vivos en el grupo con PGS fue significativamente menor que el grupo no estudiado.

A partir de la segunda década del presente siglo, con la posibilidad de la biopsia de trofoblasto y el cariotipado molecular, aparecen una serie de trabajos que reportan una excelente tasa de embarazo con la transferencia del blastocisto euploide respecto del grupo control no cariotipado. Recientemente Elías Dahdouh y col publica en *Fert & Steril* un metaanálisis conformado por tres RCTs (Yang y col 2012, Forman y col 2013 y Scott y col 2013) y ocho ensayos observacionales, la mayoría retrospectivos (Sher y col 2009, Schoolcraft y col 2010, Fishel y col 2011, Forman y col 2012, Keltz y col 2013 y Lee y col 2015), en los que se evidencia en pacientes de buen pronóstico un significativo aumento en la tasa de embarazo y nacidos vivos.

Las mejores tasas de embarazo con transferencia de blastocistos, sostiene la hipótesis de que la llegada al estado de blastocisto es una selección natural del mejor embrión. Lamentablemente no se puede aseverar su euploidía, pero existen trabajos publicados que apoyan que la mayoría de los blastocistos de buena calidad tienen un cariotipo normal. Vi Phan y col, en 2014 comunican que la tasa de euploidía de los blastocistos de clase A, B y C (bueno, regular y malo) logrados en D+5 son 74,1%, 70,3% y 34,8%, respectivamente. En cambio, los logrados en D+6 son menores: 40,9%, 45,5% y 15,7%, respectivamente.

Blazek y col, comunican en el congreso de la ESHRE en Lisboa datos similares, siendo los valores de euploidía para los blastocistos A, B y C: 79,31%, 60,51% y 38,66%, respectivamente.

B) Momento de la biopsia

Se recomienda realizar la biopsia en estadio de blastocisto (embriones de día 5 o día 6), teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

Mayor cantidad de ADN

Embriones en estadio de blastocisto permiten obtener biopsias del trofoectodermo con mayor cantidad de células,^{4,6} logrando así mayor cantidad de ADN para realizar el estudio.

Menor tasa de no resultado

Existe menor tasa de no resultados, debido a la posibilidad de biopsiar mayor cantidad de células y a la utilización de mejores técnicas de extracción y amplificación del ADN.

Menor cantidad de embriones para biopsiar

Teniendo en cuenta que la tasa de llegada a blastocisto es del 50% de los oocitos fecundados, y que el cultivo prolongado se considera un método de selección embrionaria; realizar la biopsia en D5/D6 versus D3 permitiría disminuir la cantidad de embriones a biopsiar/estudiar y los costos para el paciente.

Menor tasa de mosaicismo

Este aspecto está principalmente relacionado a la mayor tasa de mosaicismo en embriones de día 3.

Sin embargo, la biopsia en día 3 es aceptable. La verdad es que solo basta con ver los resultados de embarazo, nacidos vivos y error diagnóstico de la ESHRE con biopsia en D+3 con los datos que se vienen obteniendo con la de blastocisto. Richard Scott en su RCT concluye que disminuye a la mitad la tasa de implantación, no encontrando diferencia en la implantación entre los biopsiados y no biopsiados.

C) Diferentes técnicas de estudio para PGS

Hibridación genómica comparada CGH (*Comparative genomic hybridization*).

La técnica CGH permite determinar desbalances cromosómicos al co-hibridar una mezcla de ADN control y ADN a probar, ambos marcados con fluorocromos diferentes, rojo y verde, respectivamente, sobre una metafase control (mCGH) o sobre una plataforma constituida por segmentos de cromosomas clonados en bacterias (aCGH) y el posterior análisis al microscopio de fluorescencia o con un *scanner*. Si el ADN a probar es igual al ADN control, ambos tienen la misma posibilidad de hibridar sobre la metafase o plataforma sintética. La relación de color entre ambas lecturas es 1. En cambio, cuando el ADN a probar tiene un segmento deletado, total o parcial, tiene más posibilidad de hibridar el ADN control. En este caso, la relación de color estará desplazada hacia el rojo en el cromosoma o segmento deletado. En cambio, cuando el ADN a probar, tiene un segmento o un cromosoma duplicado, tendrá más chance de hibridar respecto del control, por lo tanto, la relación de color estará desplazada hacia el verde en el segmento o cromosoma duplicado. La resolución es similar a la de un cariotipo con técnica de bandeado G 500 bandas.

Microarreglos de polimorfismo de nucleótido simple ("SNPa", "Single Nucleotide Polymorphism arrays")

Esta técnica también se utiliza para analizar a los 23 pares de cromosomas. Los SNP son nucleótidos que son diferentes entre los individuos. Existen diferentes plataformas; cuanto

más SNPs se utilizan, mayor es la resolución diagnóstica. La principal ventaja de esta técnica es que en los casos de afecciones génicas, el análisis de los SNPs ligados y adyacentes al gen, permite determinar si el embrión es afectado, portador o libre de mutación, además de determinar la ploidía.

Secuenciación de nueva generación (“NGS”, “*Next generation sequencing*”)

La secuenciación masiva en paralelo, como su nombre lo indica, permite realizar varios estudios al mismo tiempo, lo que eventualmente bajaría sustancialmente los costes de los estudios. El inconveniente es el mayor valor de los equipos. Tiene una alta sensibilidad y especificidad, especialmente indicado para translocaciones crípticas.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (“qPCR”, “*Quantitative Polymerase Chain Reaction*”)

Esta técnica utiliza STRs marcados ligados a los cromosomas que se quieren enumerar. En la medida que se usen más STRs para un determinado cromosoma, habrá más resolución en el diagnóstico del mismo. Esta técnica fue una alternativa mejor al FISH, pero ambas hoy, frente al avance de las demás técnicas, se han dejado de usar para inferir euploidía, pero de suma utilidad para saber la ploidía, cuando se usa aCGH. Además, para enfermedades génicas familiares, que no tienen caracterización molecular, permite el diagnóstico preimplantatorio por ligamiento, similar al *karyomapping* o a SNPs de acuerdo al número de STRs que se utilicen.

¿Se puede transferir un blastocisto aneuploide?

Si bien la finalidad del PGS es seleccionar a los embriones euploides, se debe tener en cuenta que el PGS, ya sea con biopsia en D+3 o en D+5, que las células extraídas hubiesen formado parte de la placenta, vellosidades coriónicas y tejido extraembrionario, que no siempre concuerda con la constitución del embrión-feto-nacido, motivo por el cual, en sentido

estricto, no es más que un *screening* como lo constituye el estudio de las vellosidades o el estudio no invasivo en ADN fetal en sangre materna. Teniendo en cuenta que la mayoría de los mosaicos son postfecundación a partir de una cigota normal (Til Taylor 2011) y solamente hay dos trabajos publicados acerca de la tasa de falsos positivos (Scott y col 2013 y Werner y col 2015) y son contradictorios, probablemente por el número tan pequeño de las series estudiadas; antes de descartar la posibilidad de transferencia de un único blastocisto de excelente calidad, uno debería interrogarse si la aneuploidía hallada corresponde solamente a las células extraídas y no a todo el blastocisto. Hasta que no se disponga de más datos de RCTs bien diseñados para responder la tasa de falsos que posee el método, cuando se halla una aneuploidía que no fue descrita en abortos espontáneos ni en recién nacidos, no sería correcto su descarte.

D) Momento y manejo de la transferencia embrionaria

Se acepta transferencia embrionaria tanto en *freshos* como en *descongelados*.

Transferencia en fresco

Si el resultado del PGS está disponible dentro del tiempo que permite la transferencia en fresco, recomendamos:

Biopsia D3: Transferir en D4 o D5.

Biopsia D5: Transferir en D6 temprano.

Biopsia D6: Siempre vitrificar, transferencia diferida.

Cantidad de embriones a transferir

- 1 embrión euploide.
- Se *contraíndica* transferir más de 2 embriones euploides.
- Si la paciente tiene 3 o más embriones euploides, se recomienda *fuertemente* transferir de a 1.