



Gemma Daina i Noves

Doctora en biologia
cel·lular (UAB), llicenciada
en biologia i en bioquímica
(Universitat de Navarra).
Biòloga al Centre de
Reproducció Assistida-
Clínica Sagrada Família,
Barcelona



Gemma Daina i Noves

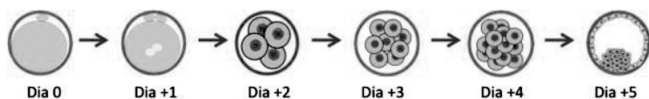
El diagnòstic genètic preimplantacional: com evitar la transmissió de malalties a la descendència

Fertilitat i desenvolupament embrionari

L'espècie humana es caracteritza per presentar una taxa de fecunditat baixa. Diversos estudis fets a embrions de cicles naturals han evidenciat unes taxes de no-divisió del 16%, un 15% més moren durant la primera setmana de desenvolupament en diverses etapes preimplantatòries i un 27% addicional no sobreviuen després de la segona setmana, durant les etapes primerenques de desenvolupament embrionari postimplantació. Es coneix que una dona en edat fèrtil té, en cada cicle menstrual, tan sols un 25% de probabilitat de concebre i dur a terme un embaràs. Aquest percentatge es redueix dràsticament en les parelles amb problemes reproductius, en les quals la taxa se situaria entorn al 10%. És en aquests casos que els tractaments de reproducció assistida prenen importància.

Les causes d'infertilitat poden ser molt diverses. Hi pot haver problemes ginecològics relacionats amb els senyals entre l'úter i l'embrió en el moment de la implantació, reg sanguini baix a l'úter, proliferació endometrial inadequada, increment de les concentracions hormonals, anomalies citoplasmàtiques o mitocondrials en els oòcits, etc. Tots aquests problemes poden tenir com a resultat la disminució de la fertilitat humana. Tot i així, l'aneuploidia d'origen masculí o femení (alteracions en el nombre de cromosomes) s'ha postulat com una de les principals causants d'infertilitat.^{1,2}

El desenvolupament embrionari s'inicia en el moment de la fecundació, quan un espermatozoide penetra a l'interior d'un òvul i continua fins a la desena setmana de gestació. La fecundació té lloc a les trompes de Fal·lopi i a partir d'aquí el zigot es comença a desenvolupar i descendeix fins a l'úter, on uns dies després haurà d'implantar (imatge 1). Mentrestant, tenen lloc les primeres divisions cel·lulars i els primers estadis de desenvolupament embrionari.



Imatge 1. Primers cinc dies de desenvolupament embrionari

Evitar la transmissió de malalties hereditàries

Actualment, disposem de tècniques per evitar que les parelles amb risc de tenir descendència afectada per determinades malalties monogèniques greus les transmetin a la seva descendència. Les metodologies que ho fan possible són: el diagnòstic prenatal, el diagnòstic genètic preimplantacional i la utilització de gàmetes o embrions de donants anònims. Una altra opció és decantar-se per l'adopció. En cas de voler tenir fills biològics lliures de malalties monogèniques familiars, es pot optar o bé pel diagnòstic genètic prenatal o bé pel diagnòstic genètic preimplantacional.

El diagnòstic prenatal, segons la legislació espanyola, es pot dur a terme en dos moments de l'embaràs. Si l'estudi es fa en les vellositats coriòniques, el test es fa entre les setmanes 11 i 13 d'embaràs. En canvi, si s'opta per analitzar el líquid amniòtic, s'efectua entre la setmana 15 i la 20 d'embaràs.

El resultat positiu d'un diagnòstic prenatal, que determina que l'individu estarà afectat de la malaltia, comporta que les parelles hagin de prendre la decisió d'interrompre un embaràs en curs. Moltes vegades, prenen la decisió tenint en compte les dificultats de tractament del seu futur fill i la baixa qualitat de vida que tindrà, però cal tenir present el procés traumàtic que pot suposar prendre aquesta decisió.

El diagnòstic genètic preimplantacional és el conjunt de tècniques que permeten diagnosticar de manera genètica i cromosòmica els embrions obtinguts mitjançant tècniques de reproducció assistida abans de transferir-los a l'úter matern. El diagnòstic genètic preimplantacional té l'avantatge de seleccionar els embrions sans respecte de la malaltia d'estudi per transferir-los a l'úter matern.

A diferència del diagnòstic prenatal, el diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) requereix que la parella se sotmeti a tractaments de reproducció assistida. Per diagnosticar els embrions cal la inseminació in vitro dels oòcits madurs mitjançant la injecció de l'espermatozoide; posteriorment s'analitzen els embrions evolutius resultants. El DGP s'ha

utilitzat per diagnosticar més de 150 malalties monogèniques diferents d'herència dominant o recessiva, segons les dades recollides en l'última compilació de la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).³

Amb aquestes tècniques, a més de la detecció de malalties monogèniques familiars, també es poden diagnosticar alteracions cromosòmiques estructurals o numèriques (aneuploidies). En els últims anys, les comissions d'ètica de diversos països també han permès dur a terme diagnòstics preimplantacionals en famílies amb risc de malalties d'aparició més tardana, com la predisposició familiar a certs tipus de càncer o la malaltia de Huntington.

El primer embaràs després de l'aplicació clínica del DGP es va produir l'any 1990⁴ i des de llavors s'han desenvolupat diferents procediments d'anàlisi genètica millorats i adaptats a l'estudi d'una cèl·lula o d'un baix nombre de cèl·lules de l'embrió.

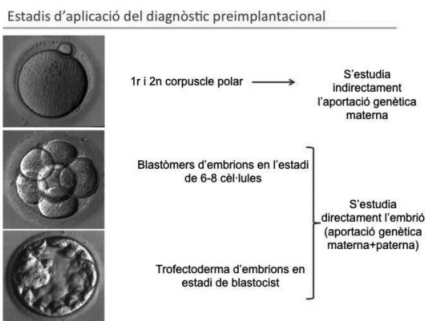
Estadis d'aplicació del DGP

Per al DGP es poden utilitzar tres tipus de materials biològic diferents: els blastòmers, els corpuscles polars i les cèl·lules del trofotoderma (imatge 2).

La primera aplicació clínica de DGP es va fer mitjançant la biòpsia de blastòmer en l'estadi embrionari de 6-8 cèl·lules (el tercer dia de desenvolupament embrionari) i es va aconseguir diagnosticar els embrions i transferir només els que estaven lliures de les malalties monogèniques estudiades. Amb aquell protocol, l'any 1990 es va aconseguir l'embaràs de bessones en dos famílies.⁴ A partir d'aquell moment es va establir que la biòpsia i el diagnòstic de blastòmer eren una bona estratègia per transferir embrions sans a l'úter matern.

Fins ara, el blastòmer ha estat el tipus cel·lular utilitzat més freqüentment per dur a terme qualsevol tipus de diagnòstic preimplantacional. La utilització del blastòmer, però, presenta dos desavantatges que es deriven de la utilització d'una sola cèl·lula embrionària: les possibles errades diagnòstiques —degudes a fallades d'amplificació d'algun dels dos al·lels presents en la cèl·lula— i el mosaïcisme embrionari, és a dir, la coexistència de més d'una línia cel·lular amb dotació cromosòmica diferent dins del mateix embrió, que podria causar un error

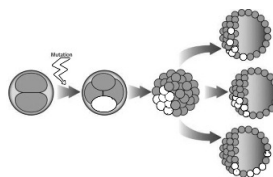
Imatge 2. Estadis d'aplicació del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP)



diagnòstic perquè la cèl·lula analitzada no és representativa de la resta de l'embrió (imatge 3).

La utilització del primer o segon corpuscle polar per al DGP s'ha emprat majoritàriament per a l'estudi d'aneuploidies (anomalies cromosòmiques numèriques) en l'anomenat PGS (*preimplantational genetic screening*), que estudia indirectament la dotació cromosòmica dels oòcits. El principal avantatge de recórrer als corpuscles polars per al diagnòstic és que no tenen cap utilitat en el desenvolupament embrionari, perquè són cèl·lules que contenen les dotacions cromosòmiques complementàries de l'oòcit i que estan destinades a degenerar i, per tant, no suposen cap pèrdua de material per a l'embrió. També presenta desavantatges perquè són cèl·lules que tan sols informen de l'aportació materna a l'embrió.

L'estudi de material provinent de la biòpsia de cèl·lules del trofèctoderma en DGP és l'opció més desenvolupada i aplicada actualment. La biòpsia es duu a terme el cinquè o sisè dia de desenvolupament embrionari, quan l'embrió arriba a l'estadi de blastocist, i ja es diferencia la massa cel·lular interna i el trofèctoderma. El principal avantatge de biopsiar en aquest moment és que permet disposar de diverses cèl·lules per a l'anàlisi, fet que permet que el diagnòstic sigui més robust i es pugui detectar la presència de mosaïcisme embrionari. Un altre avantatge de la utilització de trofèctoderma és que se seleccionen els embrions més competents evolutivament i es descarten per a l'estudi tots els que no arriben a l'estadi de blastocist. L'estudi genètic de cèl·lules de trofèctoderma requereix la criopreservació dels embrions en la majoria dels casos per tenir temps de dur a terme el diagnòstic genètic.



Imatge 3. Representació gràfica del mosaicisme embrionari

DGP per a malalties monogèniques

Una de les limitacions principals del DGP és que es disposa de poca quantitat de DNA per dur a terme l'estudi genètic. És per això que els protocols per al diagnòstic han de ser molt sensibles i acostumen a ser específics per a cada família perquè cadascuna és portadora d'unes mutacions concretes.

DGP per al cribratge d'aneuploidies

Les aneuploidies són els desequilibris en què el nombre de cromosomes està alterat. En les cèl·lules somàtiques de l'espècie humana (les que formen l'organisme) hi ha 46

cromosomes i 23 cèl·lules germinals (cèl·lules reproductives: òvuls i espermatozoides). Qualsevol canvi en aquest nombre podrà tenir conseqüències d'importància variable en el futur individu.

Les poliploidies són alteracions en el nombre de dotacions cromosòmiques completes. Per exemple: si en lloc de dos còpies de cada cromosoma n'hi hagués tres, s'originaria una triploidia (69, XXX, 69, XXY o 69, XYY). Aquests tipus d'errors en l'espècie humana són inviàbles i, per tant, letals. Per això els embrions amb aquests cariotips, tot i poder implantar, provocarien avortaments en etapes primerenques del desenvolupament embrionari.

D'altra banda, hi ha aneuploidies en què no es veu afectat tot el complement sinó que només està alterat el nombre d'alguns cromosomes concrets. En lloc de dos cromosomes homòlegs, se n'observarien més o menys. En cas que hi hagi tres còpies d'un determinat cromosoma es tracta d'una trisomia, i si només n'hi ha una es denomina monosomia. Les nul·lisomies representen la pèrdua dels dos cromosomes homòlegs d'un parell concret. La majoria d'aneuploidies no són viables i donen lloc a fallades en la implantació o a avortaments durant els primers mesos d'embaràs, com s'ha evidenciat en nombrosos estudis de material biològic procedents d'avortaments espontanis. Tot i així, hi ha certes aneuploidies viables que donen lloc al naixement d'individus afectats de síndromes que en molts casos comporten malformacions o retards mentals. La síndrome de Turner és l'única monosomia viable descrita (45, X0). Pel que fa a les trisomies, la més coneguda i freqüent és la síndrome de Down, ocasionada a causa de la trisomia del cromosoma 21; però també hi ha la síndrome d'Edwards, causada per la trisomia del cromosoma 18, i la síndrome de Patau, que es deu a la trisomia del cromosoma 13. Les aneuploidies de cromosomes sexuals produeixen la síndrome de Klinefelter (47, XXY) amb variants menys freqüents com ara la 48, XXYY o 48, XXXY, la síndrome triple X (47, XXX) i els individus XYY (47, XYY), aquests últims amb poques manifestacions fenotípiques.

L'aneuploidia pot afectar la implantació embrionària perquè la majoria d'embrions amb determinades alteracions no aconsegueixen implantar. S'ha descrit que el 60% dels avortaments espontanis es deuen a la presència d'aquest tipus d'alteracions cromosòmiques.

És ben conegut l'efecte de l'edat materna en relació amb la davallada de la fecunditat, alguns autors ho han atribuït a una disminució en la receptivitat de l'úter o a l'envelliment dels oòcits. Altres estudis han detectat una correlació entre l'augment de l'aneuploidia en els oòcits a mesura que l'edat materna avança. D'acord amb això, a les dones se'ls recomana l'ús del cribratge d'aneuploidies o PGS (*preimplantation genetic screening*) sobretot a partir dels 38 anys. La PGS també està indicada en casos en què s'hagin experimentat avortaments de repetició, perquè s'ha descrit que en els embrions d'aquestes parelles l'aneuploidia és força recurrent, i pot arribar a taxes del 50 o 60%. La presència d'aneuploidies en els avortaments espontanis també ha estat descrita àmpliament.

Tècniques aplicades a la PGS

L'aplicació de la PGS s'ha generalitzat molt en els últims anys i s'aplica en molts centres de reproducció assistida. Hi ha diverses tècniques per dur-la a terme:

FISH

La FISH o hibridació in situ fluorescent utilitza fragments de DNA marcats amb fluorescència per visualitzar les regions que corresponen a cromosomes diferents. Fa uns anys s'aplicava àmpliament per estudiar nou cromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y), tot i que existeixen protocols que permeten estudiar els 24 cromosomes humans mitjançant aquest tècnica.

Hibridació genòmica comparada (CGH i array-CGH)

La hibridació genòmica comparada (CGH) és un procediment d'estudi citogenètic que permet estudiar en una sola anàlisi tots els cromosomes del complement en tota la seva longitud, amb un límit de resolució d'entre 10 i 20 Mb. Es tracta d'un procediment més laboriós que la FISH i requereix de personal especialitzat per a l'anàlisi. Per això, més tard es van desenvolupar els *arrays* de CGH (aCGH), que es basen en la mateixa tecnologia però més automatitzada i amb més bona resolució.

SNPmicroarrays

Els microarrays de SNP (polimorfismes d'un sol nucleòtid) van

Notes i Bibliografia

- 1- SIMON, L.; EMERY BR.; CARRELL DT.: "Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction." a Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2017, p. S1521-6934(17)30114-1.
- 2- HASSOLD T.; HUNT P.: "To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy." a *Nature Reviews Genetics*. Abril 2001; 2(4); p. 280-91.
- 3- DE RYCKE M.; BELVA F.; GOOSSENS V.; MOUTOU C.; SENGUPTA SB.; TRAEGER-SYNODINOS J.; COONEN E.: "ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011." a *Human Reproduction*. Agost 2015; 30(8): p. 1763-89.
- 4- HANDYSIDE AH.; KONTOGIANNI EH.; HARDY K.; WINSTON RM.: "Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification" a *Nature*. Abril 1990; 344(6268), p. 768-70.

ser dissenyats originalment per genotips variants de DNA simultàniament, però actualment la seva aplicació i permet el diagnòstic preimplantacional de malalties monogèniques, però també d'anomalies cromosòmiques.

NGS (Next-generationsequencing)

Les tecnologies de seqüenciació massiva, també anomenades *next-generation sequencing*, validades recentment, s'ofereixen com a eines amb molt potencial tant per detectar anomalies cromosòmiques com també per diagnosticar malalties monogèniques i mitocondrials. El descens en el cost d'aquestes tecnologies les fa prometedores per ser aplicades àmpliament dins el camp del diagnòstic preimplantacional.