

El comité editorial encargará al especialista la realización de una publicación original sobre un tema determinado. La revisión tiene como finalidad examinar la bibliografía publicada y situarla en cierta perspectiva. El artículo sintetizará los resultados y conclusiones de las publicaciones sobre el tópico encargado. Mantendrá el siguiente ordenamiento: título de la revisión, autor/es (apellido y nombre, lugar de trabajo, dirección de correo electrónico del contacto), resumen (en castellano y en inglés) y palabras claves.

Las citas bibliográficas deben presentar la estructura detallada previamente en trabajos originales, y numeradas según aparición en el texto. Las tablas, cuadros y figuras deberán llevar el epígrafe correspondiente y deberán ir adecuadamente referenciados en el texto; si es necesario, el autor especificará en qué parte del texto deben ir intercalados. En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

La CGH con *arrays* (aCGH) para todos los cromosomas: Un concepto avanzado para el diagnóstico genético preimplantatorio

Vanessa Rawe,^{1,2} Juliana Cuzzi^{2,3}

¹ REPROTEC, Patología de Gametas y Embriones, Humboldt 2433, PB 10, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Genesis Genetics Argentina, Humboldt 2433, PB 10, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³ Genesis Genetics Brasil, Rua Mato Grosso 306-CJ506, San Pablo, Brasil.

Reproducción 2012;27:96-100

En la reproducción humana las tasas de embarazo e implantación de embriones son inversamente proporcionales a la edad materna. Los resultados obtenidos a partir de tres décadas de estudios sugieren un aumento en los errores en la segregación de los cromosomas durante la ovogénesis de mujeres mayores de 35 años. Así, el aumento de la edad materna aumenta el riesgo de aneuploidías (alteraciones en el número de cromosomas) embrionarias, elevando el riesgo de aborto involuntario y una disminución en la tasa de implantación del embrión debido a aberraciones cromosómicas incompatibles con el desarrollo y la diferenciación celular. Otros dos grupos de pacientes con elevada producción de embriones alterados desde el punto de vista genético son las parejas con fracasos reiterados en tratamientos de fertilidad asistida o con abortos recurrentes, una vez que la tasa habitual de embriones con alteraciones genéticas ronda el 30%, pero en estas parejas esta cifra asciende al 70%.

En la actualidad, la asociación de técnicas de reproducción asistida y de investigación citogenética molecular permite la identificación de los embriones cromosómicamente alterados a tra-

vés del diagnóstico genético preimplantatorio (DGP) de los ovocitos (cuerpo polar) o blastómeras obtenidas por técnicas de micromanipulación de biopsias embrionarias. El uso de la técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) para diagnóstico citogenético del embrión es capaz de detectar sólo la mitad o menos del cariotipo humano (de 5 hasta 12 cromosomas) y la eficiencia del diagnóstico se reduce cuando muchos cromosomas son analizados en el mismo procedimiento. La hibridación genómica comparada por *arrays* (aCGH) es una técnica de citogenética molecular que permite el análisis simultáneo de todos los pares de cromosomas y se puede utilizar para detectar aneuploidías en células individuales. El análisis cromosómico obtenido por aCGH permite la transferencia de embriones euploides para el útero materno, incrementando la tasa de implantación, promoviendo el éxito del embarazo y el nacimiento de un hijo sano.

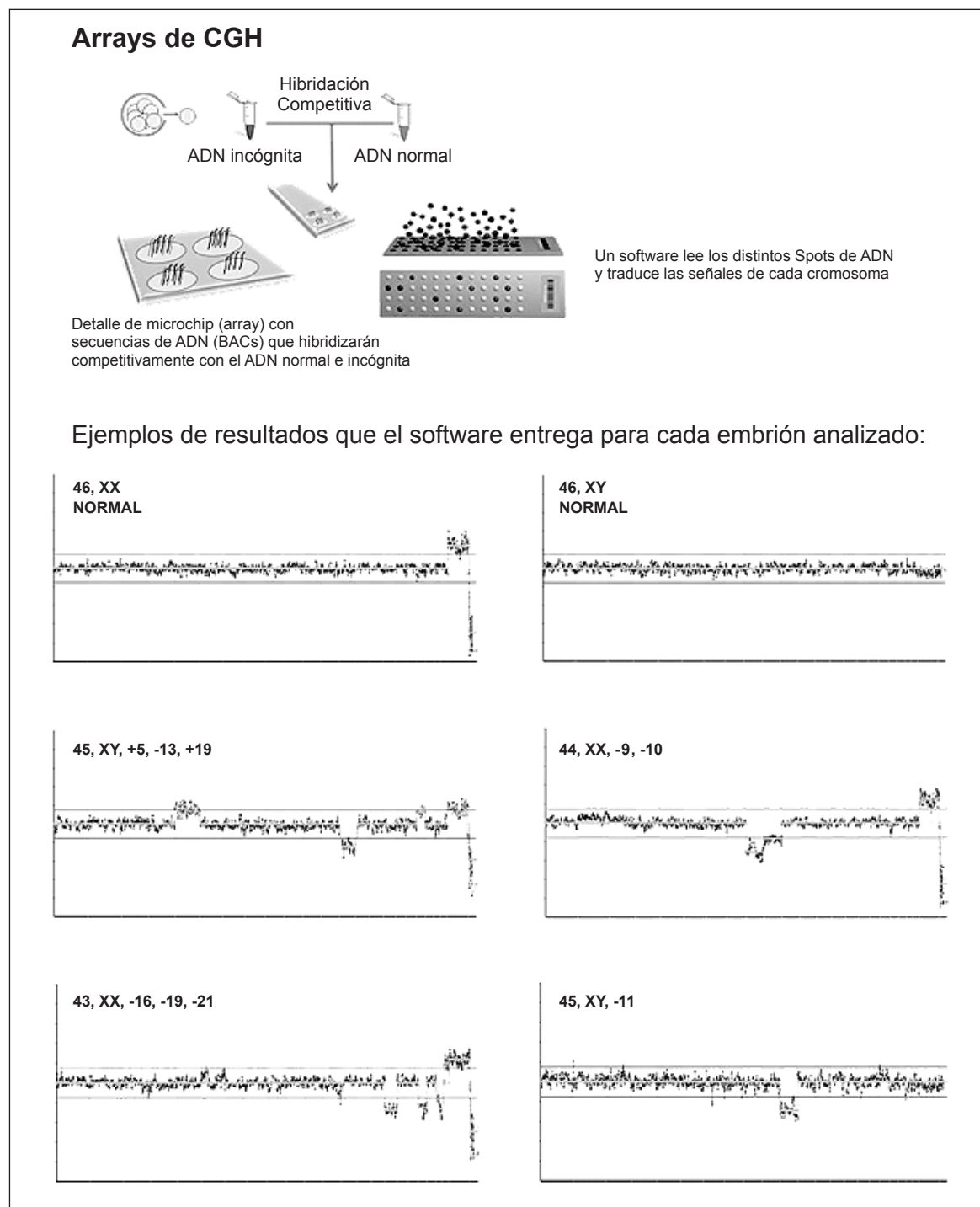
“Danos la biopsia embrionaria Día+3 o Día+5 y nosotros nos ocupamos del resto”. Cuando escuchamos esas palabras, empezamos a darnos cuenta de que esta metodología se iba a insertar de fácil manera en los laboratorios de reproducción asistida y que sería el futuro para lograr excelentes tasas de implantación y embarazo de niños sanos. Si el laboratorio de embriología de una

Correspondencia: Vanessa Rawe
E-mail: genesisgeneticsargentina@gmail.com,
vanessa.rawe@repro-tec.com

clínica de fertilidad no realiza DGP porque la metodología para FISH es tediosa, requiere de manos expertas, es de larga duración y no se tra-

duce en resultados confiables, la posibilidad de realizar el análisis de CGH con *arrays* viene a resolver esos problemas.

Gráfico 1. Representación esquemática del procedimiento de CGH con arrays. Se presentan también algunos ejemplos de resultados de embriones analizados. Gentileza: Genesis Genetics Brasil.



¿Qué es un array o microarray de ADN?

Un array de ADN (también conocido como *chips* o *microchips* de ADN) consiste en una superficie sólida a la cual se han adherido unos fragmentos de ADN. Las secuencias de ADN se adhieren en unos micropuntos conocidos como *spots* (ver Gráfico 1).

¿Cómo funciona el estudio basado en microchips?

El ADN se extrae de la célula embrionaria (blastómera), se lo amplifica por PCR con *kits* para todo el genoma humano (*whole genome amplification*) y se lo mezcla con otro conocido como normal. Ambos *sets* de ADN (blastómera y normal) son marcados con fluorescencia de colores diferentes (verde y rojo) y luego asociados a placas con *microchips* que contienen ADN artificial. Los dos ADN competirán por los espacios en el *microchip* y un *software* leerá el exceso, defecto o balance en la cantidad de ADN de esa célula (Gráfico 1). Luego de un exhaustivo análisis de técnicos especializados y con ayuda del *software*, se entrega un gráfico en el que se puede visualizar cuáles son los cromosomas afectados por demás o de menos (ver ejemplos en Gráfico 1).

Los avances y la aplicación de esta tecnología en medicina de la reproducción están generando resultados muy prometedores. Los expertos en biología molecular y genetistas (entre los cuales se encontró el Dr Mark Hudges a cargo de *Genesis Genetics Institute*), discutieron las ventajas de esta técnica en el congreso general de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida que se llevó a cabo en Río de Janeiro, Brasil, (en mayo de 2011) y en la última reunión americana de Medicina Reproductiva en Orlando, EE.UU. (ASRM, en octubre de 2011). En este último evento el Dr Hughes presentó la experiencia con más de 12.000 embriones mostrando resultados muy promisorios según grupos etarios. En ese mismo congreso se presentaron los resultados de *Genesis Genetics Brasil* ([P-392] *Preimplantation genetic screening using array CGH improves clinical pregnancy rates in AMA patients*), en los que se muestran las siguientes tendencias:

Los datos sugieren que el uso de aCGH eleva las probabilidades de los embriones de generar embarazo independientemente de la edad materna. Si se compara el grupo de aCGH con el Grupo control, se observa que las tasas de embarazo clínico en mujeres ≥ 41 años son significativamente más altas en ciclos que involucran aCGH (50% vs 6.8%, $p=018$). Un dato de importancia es que se reduce de manera significativa el número de embriones transferidos en todos los grupos etarios cuando se utiliza aCGH (media: 1.5 vs 2.4). En este pequeño reporte los autores concluyen que la aCGH es una muy útil tecnología para incrementar las tasas de embarazo clínico evolutivo en pacientes de pobre pronóstico como son las mujeres mayores de 41 años.

¿Qué información nos permite obtener los aCGH?

Los aCGH nos permiten obtener información a nivel de cromosomas. Es decir, podemos saber si el blastómero tiene un número normal o anormal de cada cromosoma del genoma humano y también si ha dado ganancias o pérdidas de porciones cromosomales. El estudio puede ser realizado en:

- Segundo cuerpo polar luego de la fertilización.
- Blastómera de embrión día 3 (D+3).
- Trofoectodermo (embrión de día 5: blastocisto, D+5).

Hoy en Argentina *Genesis Genetics* nos da la posibilidad de trabajar de dos maneras para realizar aCGH durante un DGP: en embriones de 8 células (D+3) o en trofoectodermo (D+5, blastocistos). El trabajo se puede plantear de dos maneras principales en el laboratorio (Gráfico 2):

- **Opción A:** Si se prefiere la biopsia en D+3 por falta de experiencia con la biopsia de trofoec-

	Grupo aCGH			Grupo Control		
	≤ 37	38-40	≥ 41	≤ 37	38-40	≥ 41
Edad materna						
Número de pacientes	68	35	28	236	107	94
Ciclos sin embriones sanos (%)	41.6	60	60.7	-	-	-
Embriones / Transferencia	1.6	1.55	1.16	2.37	2.67	2.60
Embarazo clínico (%)	59	45.5	50	49	33.9	6.8

to dermo o por falta de los materiales técnicos adecuados (láser), se puede realizar la biopsia en todos los embriones disponibles, congelarla a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y dejar en cultivo los embriones biopsiados hasta el estadio de blastocisto. En el D+5 se informará a *Genesis Genetics Argentina* cuáles de las blastómeras serán procesadas para aCGH (Opción A, Gráfico 2). La idea es que sólo el embrión biopsiado que llegó a blastocisto sea el estudiado por aCGH. A continuación, el blastocisto es vitrificado y se espera el resultado final luego de aproximadamente tres semanas. De esta manera el blastocisto sano será transferido en un ciclo subsecuente con un mejor endometrio.

• **Opción B:** Si se prefieren biopsiar los embriones en D+5, las células del trofoectodermo representan la mejor fuente, son varias decenas y el material es muy informativo. Luego de la biopsia y al igual que la **Opción A**, el blastocisto es vitrificado y se espera el resultado final luego de aproximadamente tres semanas (**Opción B**, Gráfico 2). De la misma manera, *Genesis Genetics* realizará la *WGA* de todas las células y no de una única célula como es el caso de la **Opción A**.

¿Qué ventaja ofrece aCGH frente a la técnica de FISH?

La ventaja principal frente al método de FISH es que permite detectar alteraciones numéricas (aneuploidías) de todos los cromosomas en un único *test*. Con la aplicación del *array* cromosómico detectamos hasta un 50% más anomalías que ante el FISH de 12 cromosomas.

Por otro lado, reduce el posible error asociado a la fijación de los blastómeras. Además, es un

método robusto que ofrece información del cromosoma completo, mientras que el FISH basa el diagnóstico en una pequeña región del ADN cromosómico en el que hibrida la sonda. Un resumen comparativo entre ambas técnicas se detalla en la Tabla 1.

Validación de la técnica

Una investigación realizada en Oxford, Inglaterra, se basó en el trabajo conocido como “*Validation of microarray comparative genomic hybridation of comprehensive analysis of embryos*” (Gutiérrez-Mateo y cols, 2010). El estudio consistió en la realización de biopsias en embriones donados del día-3 y 5. Se dividieron en dos grupos, los cuales usaron dos protocolos diferentes para el estudio de los cromosomas. Cada muestra de cada grupo fue procesada, en primer lugar, utilizando el método aCGH, y luego re-analizado por la técnica de FISH para posterior comparación de resultados. Luego de todo el análisis y la cuantificación de muestras, se reportaron las anomalías cromosómicas, como aneuploidías, poliploidías y los cromosomas involucrados; también se estudió si existía alguna correlación de estas anomalías con la edad de la madre. Se pudo concluir que la aCGH detecta aproximadamente 42% más anomalías y un 13% más de embriones anormales que el método de FISH. La tasa de aneuploidías en los embriones analizados fue de 63.2%, porcentaje que se incrementa con la edad materna. Los cromosomas más involucrados fueron el 16, 22, 21, y 15.

Luego de la aCGH sólo el 2.9% de los embriones fueron no informativos, lo cual la hace una técnica muy robusta si la comparamos con una tasa con FISH (de 11.2% en este rubro). Luego

Gráfico 2. Opciones frente a la remoción de célula única en D+3 o trofoectodermo en D+5.

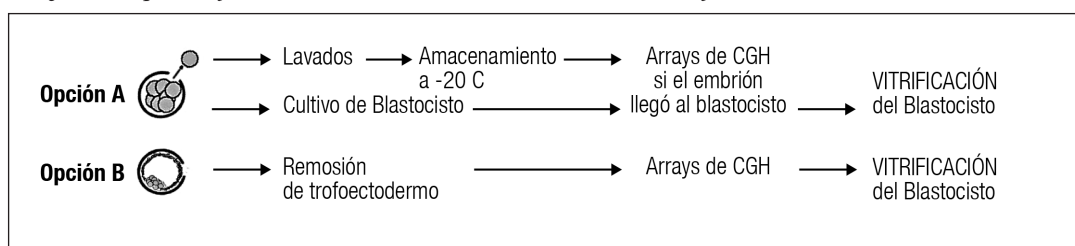


Tabla 1. Comparativa entre FISH y aCGH.

FISH	aCGH
<p>Cromosomas analizados: 5-7 hasta 12. Consecuencias:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Transferencia de embrión aneuploide. • Para conseguir el análisis de los cromosomas se necesitan varias rondas de hibridación limitando la señal (disminuye eficacia de resultado). <p>Técnica de fijación. Dificultades:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pérdida del núcleo o pérdida de material genético: embrión no informativo. • Si el núcleo se conserva, se puede perder la estructura tridimensional: errónea interpretación de señales. <p>Manipulación de blastómeras:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se requieren habilidades especiales del biólogo. • Lugar propicio para manejo de fijadores celulares; lugar seco y frío (incompatible con laboratorio de embriología). • Requerimiento de tiempo y realización de mapas de células fijadas. <p>Material de estudio: Biopsia de una única célula con requerimientos de re-biopsiar.</p> <p>Alteraciones cromosómicas en cariotipo de la pareja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se requiere compra específica de sondas. 	<p>Cromosomas analizados: Todos. Consecuencias:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mayor tasa de cancelación de transferencia. • Cuando conseguimos transferencia de embrión/es las tasas de embarazo e implantación compatibles c/ pacientes de grupo etéreo son de buen pronóstico. <p>El ADN amplificado se puede utilizar para diagnóstico de enfermedades monogénicas (más de 2.000, www.genesisgenetics.org/testing).</p> <p>Técnica de fijación. No hay fijación de células.</p> <p>Manipulación de blastómeras:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fácil. • No requiere un lugar separado. • Compatible con laboratorio de embriología. • Rápido. <p>Material de estudio: Permite biopsia de varias células: trofoectodermo en blastocisto.</p> <p>Alteraciones cromosómicas en cariotipo de la pareja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • No tenemos que comprar sondas específicas. • Se pueden estudiar: <ul style="list-style-type: none"> a. Traslocaciones. b. Inversiones. c. Cromosomas marcadores.

de la aCGH la tasa de error fue de 1.9%, lo cual la hace muy específica vs FISH (con una tasa de 9%). Este trabajo proveyó de una validación importante de la técnica a nivel mundial. Se concluyó que la aCGH tiene menos limitaciones y más ventajas comparada con otras técnicas.

La CGH con *arrays* combina los últimos avances para la visualización entera del genoma pre-embriionario y representa la integración de la citogenética tradicional y la molecular. El advenimiento de nuevas metodologías diagnósticas en medicina reproductiva, y en embriología en particular, nos proporciona una herramienta de gran poder terapéutico a la hora de mejorar las tasas de implantación y embarazo evolutivo en pacientes que así lo requieran.

Referencias

1. 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.
2. Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC. A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the "good prognosis" patients. *Fertil Steril* 2009;91:1731-1738.
3. SchoolcraftWB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *FertilSteril* 2009;1700-1706.
4. Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K. Live birth after polar body array comparative genome hybridization prediction o embryo ploidy - The future of IVF? *Fertil Steril* 2010;93:1006-1010.
5. Fragouli E, Wells D, Delhanty JD. Chromosome Abnormalities in the Human Oocyte. *Cytogenet Genome Res* 2011;133(2-4):107-118.