

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

TESIS DOCTORAL

Título de la tesis doctoral: Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Doctoranda: M^a Dolores Lozano Arana

D.N.I.: 27304162 B

Director: Guillermo Antiñolo Gil

Departamento: Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.



El Dr. Guillermo Antiñolo Gil, profesor titular de la Universidad de Sevilla y Director de la Unidad de Gestión Clínica de Medicina Materno-fetal, Genética y Reproducción de Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y la Dra. Raquel Fernández García, Facultativo Especialista de Área de Genética de la mencionada Unidad,

Certificamos que: M^a Dolores Lozano Arana, con DNI 27304162B, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Sevilla, con la especialidad de Análisis Clínicos y Facultativo Especialista de Área de Genética de la citada Unidad, ha realizado bajo nuestra supervisión el estudio titulado:

“DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTATORIO: IMPLANTACIÓN, DESARROLLO Y ACTUALIZACIÓN DE UN PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTATORIO EN UN SISTEMA SANITARIO PÚBLICO”
para la obtención del título de Doctora.

La Doctoranda

Firmado: M^a Dolores Lozano Arana

Los Directores de la Tesis

Firmado: Guillermo Antiñolo Gil
Director

Firmado: Raquel Fernández García
Co-Directora

En Sevilla, a ____ de _____ de 2015

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

AGRADECIMIENTOS

Dedicada a Sara

AGRADECIMIENTOS

Hace ya 11 años empecé a trabajar en el Hospital Virgen del Rocío. Quiero agradecer en primer lugar a Salud y a Guillermo por darme la oportunidad de iniciar un gran proyecto en este Hospital, el Diagnóstico Genético Preimplantatorio. Y como no a Ana y a Juan Carlos, pioneros como yo en la puesta a punto del PGD. Con ellos formé un equipo estupendo en aquellos años, que seguro siempre recordaremos.

También quiero recordar a todos mis compañeros del Laboratorio de Reproducción, especialmente a mi compañera Beatriz y a todos los técnicos y a los antiguos becarios. Sin su esfuerzo de cada día habría sido imposible llevar a cabo el proyecto del PGD. También a mis compañeros de la Consulta de Reproducción. Entre todos hacemos posible un precioso trabajo.

No me puedo olvidar de Raquel, sin la cual nunca habría podido terminar esta tesis doctoral y a la cual estoy profundamente agradecida. Sin olvidarme del resto de genetistas, Irene y Javier, por su sabiduría.

Y por último, y no por eso menos importante, a mi familia.

Gracias a todos,

Mariló

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADO	<i>Allele Drop-Out</i>, Amplificación preferencial de un alelo
AME	Atrofia Muscular Espinal
AMH	Hormona Antimülleriana
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>, Sociedad americana de Medicina Reproductiva
BTM	Beta Talasemia Mayor
CE	Control de Estimulación
CF	Control de Frenación
CGH	<i>Comparative Genome Hybridization</i>, Hibridación genómica comparada
CMBDA	Conjunto Mínimo Básico de Datos al Alta Hospitalaria de Andalucía
CNRHA	Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida
CR	Control de Regla
CP	Corpúsculo Polar
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMB	Distrofia Muscular de Becker
DMS	Distrofia Miotónica de Steinert
DP	Diagnóstico Prenatal
EBE	Estudio Básico de Esterilidad
EH	Enfermedad de Huntington
EPA	Estudio Preanestésico
ESHRE	<i>European Society for Human Reproduction and Embriology</i>, Sociedad europea de reproducción humana y embriología
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>, Hibridación fluorescente in situ
FIV	Fecundación In Vitro
FRAXA	Fragilidad del cromosoma X
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
HCG	<i>Human Chorionic Gonadotrophin</i>, Gonadotrofina coriónica humana
HVR	Hospital Virgen del Rocío
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>, Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i>
MII	Ovocitos en metafase II
MLPA	<i>Multiple Ligation Probe Amplification</i>, Amplificación de sondas tras ligación múltiple
PAF	Poliposis Adenomatosa Familiar
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>, Reacción en cadena de la polimerasa
PGD	<i>Preimplantation Genetic Diagnosis</i>, Diagnóstico genético preimplantatorio; PGD de alto riesgo.
PGD-AS	<i>Preimplantation Genetic Diagnosis- Aneuploidy Screening</i>, Diagnóstico genético preimplantatorio - Screening de aneuploidías; PGD de bajo riesgo
PGD-HLA	Diagnóstico Genético preimplantatorio asociado a la determinación de antígenos de histocompatibilidad con fines terapéuticos para terceros.
PGDIS	<i>Preimplantation Genetic Diagnosis international Society</i>, Sociedad Internacional sobre PGD
PGS	<i>Preimplantation genetic screening</i>, Screening genético preimplantacional; PGD de bajo riesgo
SCA	Ataxia Espino Cerebelosa
SEF	Sociedad Española de Fertilidad
SHO	Síndrome de Hiperestimulación Ovárica
SSPA	Servicio de salud público andaluz
STRs	<i>Short tandem repeats</i>, repeticiones cortas en tandem
TEC	Transferencia de embriones congelados
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida
UGCGRMF	Unidad de Gestión clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal
WGA	<i>Whole genome amplification</i>, Amplificación de genoma completo

INDICE

INDICE

1.- Resumen	13
2.- Introducción	16
2.1 Definición	19
2.2 Indicaciones generales	20
2.3 Tipos de PGD	24
2.4 Legislación en Andalucía e indicaciones en el SSPA	26
2.5 Criterios de aplicación de PGD en el SSPA	31
2.6 Programa de PGD	34
2.6.1 Fase previa	34
2.6.2 Ciclo de Fecundación <i>in vitro</i>	36
2.6.3 Biopsia embrionaria	37
2.6.4 Análisis genético	39
2.6.5 Transferencia embrionaria y congelación	44
2.7 Análisis genético en célula única	44
2.7.1 Limitaciones de la biopsia	45
2.7.2 Limitaciones de la FISH	45
2.7.3 Limitaciones de la PCR	47
2.7.4 Análisis genético de célula única mediante MDA	52
2.7.5 Análisis genético de célula única mediante CGH	53
3.- Hipótesis y Objetivos	57
4.- Pacientes y metodología	60
4.1 Pacientes del programa de PGD	62
4.2 Valoración pre-PGD	62
4.3 Fase previa	63
4.3.1 Primera consulta	63
4.3.2 Segunda consulta	64
4.3.3 Solicitud de autorización para PGD-HLA	66

4.4 Programación y ciclo PGD	68
4.4.1 Consulta para confirma regla (CR)	68
4.4.2 Consulta de frenación (CF)	69
4.4.3 Consulta de estimulación (CE)	70
4.4.4 Punción folicular	71
4.4.5 Fecundación en el Laboratorio	72
4.4.6 Biopsia embrionaria	72
4.4.7 Análisis genético	75
4.4.8 Transferencia y congelación embrionaria	75
4.5 Protocolo FISH para enfermedades ligadas al cromosoma X	76
4.5.1 Deshidratación de las preparaciones para FISH	77
4.5.2 Hibridación de las preparaciones	77
4.5.3 Lavado de las muestras tras hibridación	78
4.5.4 Contratinción tras lavado y visualización al microscopio de fluorescencia	78
4.6 Diseño y optimización de los protocolos basados en PCR aplicados a PGD	79
4.6.1. Selección de marcadores STR para el análisis molecular indirecto de cada patología	79
4.6.2. Diseño de primers para las PCR múltiples	80
4.6.3. Obtención de material de estudio para la optimización de los métodos	81
4.6.4. Lisis celular previa a protocolo de PCR	81
4.6.4.1. Lisis alcalina	82
4.6.4.2. Lisis enzimática	82
4.6.5. Química general y programas para las PCR multiplex	82
4.7. Amplificación de genoma completo mediante la técnica MDA	85
4.8. Técnicas de diagnóstico molecular directo sobre los productos resultantes de MDA sobre célula única	86
4.8.1. Secuenciación automática sobre productos MDA	86
4.8.2. MLPA sobre productos MDA	88

5. Resultados	93
5.1 Resultados clínicos del programa de PGD	94
5.2 Aplicación FISH a la determinación de sexo en preembriones de parejas con enfermedades ligadas al cromosoma X	100
5.3 Optimización y desarrollo de protocolos basados en PCR múltiple para PGD de enfermedades monogénicas	101
5.3.1 Optimización del protocolo general para PGD de la Enfermedad de Huntington	101
5.3.2 Optimización del protocolo general para PGD de Fibrosis Quística	106
5.3.3 Optimización del protocolo general para PGD de enfermedades ligadas a X	111
5.3.3.1 Sexado	111
5.3.3.2 Distrofia Muscular de Duchenne/Becker	113
5.3.3.3 Hemofilia A	119
5.3.4 Optimización del protocolo general para PGD de PGD-HLA	125
5.3.5 Optimización del protocolo general para PGD de Beta Talasemia	130
5.3.6 Optimización del protocolo general para PGD de Atrofia Muscular Espinal	135
5.3.7 Optimización del protocolo general para PGD de la Enfermedad de Steinert	140
5.3.8 Optimización del protocolo general para PGD de Síndrome de X Frágil	145
5.3.9 Optimización del protocolo general para PGD de Poliposis Adenomatosa Familiar	152
5.3.10 Optimización del protocolo general para PGD de Síndrome de Marfan	157

5.4 Optimización y desarrollo de protocolos de WGA de blastómeras mediante MDA	162
5.4.1 Secuenciación sobre productos de MDA de ADN de blastómeras: Secuenciación de un fragmento del exón 15 del gen APC	165
5.4.2 PCR fluorescente para testar grandes expansiones sobre productos de MDA de ADN de blastómeras: Análisis de la expansión responsable de enfermedad de Machado-Joseph	167
5.4.3 MLPA sobre productos de MDA de ADN de células Únicas	169
5.5 Resultados de la aplicación de la técnica CGH para la detección de aneuploidías y otros reordenamientos cromosómicos desequilibrados en blastómeras	172
6- Discusión	174
7.- Conclusiones	184
8.- Referencias	187
9.- Anexos	199
a. Informe del Comité de ética del Hospital Virgen del Rocío	200
b. Modelo de Consentimiento informado para PGD-HLA	201
c. Resultados de WGA y CGH para blastómeras	206

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

RESUMEN

1. RESUMEN

El Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) surge con el objetivo de ofrecer una opción reproductiva a familias con alto riesgo de transmitir enfermedades de base genética a su descendencia. Básicamente consiste en analizar genéticamente los preembriones (terminología legal para definir embriones de menos de 14 días de desarrollo) obtenidos por técnicas de fecundación *in vitro*, de forma que sólo son transferidos al útero los no afectados de la enfermedad de riesgo. El análisis genético se realiza sobre una o dos células extraídas al preembrión cuando éste tiene 3 días de desarrollo. El resultado será representativo del resto del embrión.

Podría decirse que es una forma precoz de Diagnóstico Prenatal (DP), pero con una ventaja principal respecto a este, como es evitar la interrupción voluntaria del embarazo por enfermedad fetal, pues los progenitores no tienen que pasar por el trance de decidir si continúan o no con una gestación ya establecida afectada de una enfermedad grave que ellos portan o padecen.

El PGD contribuye a la interrupción de la transmisión familiar de las enfermedades hereditarias, que supone un alivio del sufrimiento familiar, y tiene gran importancia social y sanitaria al reducir el número de pacientes afectados de estas dolencias.

En España, el PGD está contemplado en la actual Ley de Reproducción Humana Asistida (Ley 14/2006 de 26 de mayo, Artículo 12), donde se especifica cuáles son las indicaciones susceptibles de PGD permitidas en nuestro país y los pasos administrativos para poder realizarlo.

Andalucía concretamente, ha sido la primera Comunidad donde se ha incorporado y regulado la realización del PGD en el ámbito público, mediante el Decreto 156/2005, de 28 de junio, "... por el que se regula el PGD en el Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA), se crea la Comisión Andaluza de Genética y Reproducción y se designa a la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal (UGCGRMF) como centro de referencia dentro del SSPA". (Esta Unidad hoy día es conocida como Unidad de Gestión Clínica de Medicina Materno-fetal, Genética y Reproducción, de Hospital Virgen de Rocío-Virgen Macarena). Dicho Decreto contempla el Anexo II, donde se recoge un listado de enfermedades inicialmente incluidas en el programa de PGD del SSPA, que ha sido posteriormente ampliado.

El objeto fundamental de esta tesis doctoral ha sido proporcionar al programa de PGD de la UGCGRMF de nuevas estrategias diagnósticas, con el fin de llegar a un mayor número de familias afectadas por Enfermedades Raras. Todo ello a lo largo de 10 años, desde su implantación hasta la actualidad.

Para ello se han optimizado los protocolos basados en PCR de todas las enfermedades incluidas en el Decreto 156/2005 y en su posterior ampliación, se ha optimizado e incorporado la metodología MDA (Multiple Displacement Amplification) para el diagnóstico en un determinado grupo de familias y se ha iniciado la valoración para una posterior incorporación de la CGH (Hibridación Genómica Comparada) al programa, con el objetivo de diagnosticar una enfermedad monogénica y detectar aneuploidías y otros reordenamientos cromosómicos desequilibrados en una única célula. Todos los resultados del balance del programa son presentados.

INTRODUCCION

2. INTRODUCCION

Según la definición de la Unión Europea, las enfermedades raras, minoritarias, huérfanas o enfermedades poco frecuentes son aquellas enfermedades con riesgo de muerte o de invalidez crónica que tienen una prevalencia menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes. Esta definición fue la adoptada por el 'Programa de Acción Comunitaria sobre Enfermedades Raras 1999-2003' y es utilizada también por la *European Medicines Agency* (EMA) para la declaración de medicamentos huérfanos, así como por varios estados miembros (Alemania, Francia, Italia, Países Bajos y España).

Aunque se trata de enfermedades poco frecuentes de forma aislada, en su conjunto son importantes ya que afectan a un 5-7% de la población de países desarrollados.

A pesar de constituir un grupo muy heterogéneo de entidades clínicas, las enfermedades raras comparten algunas características:

- a) En general, son enfermedades hereditarias que habitualmente se inician en la edad pediátrica.
- b) El 80% tienen un origen genético identificado.
- c) Tienen carácter crónico, contando con una elevada morbimortalidad y alto grado de discapacidad.
- d) Presentan gran complejidad diagnóstica y terapéutica.
- e) Requieren un seguimiento multidisciplinar.

De sus características se derivan los principales problemas a los que se enfrentan:

- a) El desconocimiento y la desinformación de los profesionales.
- b) La ausencia de terapias y la escasa disponibilidad de medicamentos.
- c) El elevado coste social.
- d) La escasa rentabilidad teórica para los sistemas sanitarios.

Respecto al último punto, los datos nos dicen otra cosa. En el Reino Unido, el tratamiento y la atención sanitaria de los pacientes que padecen estos trastornos suponen un gasto para los servicios sanitarios y sociales de más de 2 billones de libras anuales.

Si nos centramos en Andalucía, la información disponible sobre morbilidad obtenida a partir de la explotación de los datos del Conjunto Mínimo Básico de Datos al Alta Hospitalaria de Andalucía (CMBDA) puede ayudarnos a realizar una aproximación a la situación de las enfermedades de base genética en nuestra área. Ya en el año 2004, las enfermedades de base genética constituían el 5,27% de las altas del CMBDA y el 7,85% de todas las estancias hospitalarias.

Estos datos dan una idea de la envergadura del coste sanitario que plantean estas enfermedades.

El avance del conocimiento en genética humana, paradigma del cual es la presentación en el año 2000 del primer borrador de la secuencia completa del genoma humano, ha supuesto un cambio drástico en nuestra comprensión del desarrollo humano y de la causa de muchas enfermedades. El desarrollo de las tecnologías de análisis genómico y citogenética molecular, la bioinformática y el acceso a la información *on line*, junto al avance del conocimiento derivado

de la obtención y desarrollo de los mapas genéticos y la identificación de nuevos genes y mecanismos moleculares, están abriendo nuevas vías para la planificación, diseño y desarrollo de estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas más eficientes y efectivas en las enfermedades de base genética. Entre las aplicaciones clínicas derivadas de esa traslación, se encuentra de forma destacada el Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) (Monk and Handyside, 1988).

2.1 DEFINICION

El PGD surge con el objetivo de ofrecer una opción reproductiva a familias con alto riesgo de transmitir enfermedades de base genética a su descendencia. Básicamente consiste en analizar genéticamente los preembriones (terminología legal para definir embriones de menos de 14 días de desarrollo) obtenidos por técnicas de fecundación *in vitro*, de forma que sólo son transferidos al útero los no afectados de la enfermedad de riesgo.

Podría decirse que es una forma precoz de Diagnóstico Prenatal (DP), pero con una ventaja principal respecto a este, como es evitar la interrupción voluntaria del embarazo por enfermedad fetal, pues los progenitores no tienen que pasar por el trance de decidir si continúan o no con una gestación ya establecida afecta de una enfermedad grave que ellos portan o padecen.

Como consecuencia, el PGD contribuye a la interrupción de la transmisión familiar de las enfermedades hereditarias, lo que a corto plazo supone un alivio del sufrimiento familiar, mientras que a largo plazo puede tener gran

importancia social y sanitaria al reducir el número de pacientes afectados de estas dolencias.

Revisiones importantes sobre este tema, como la realizada por el *Genetics Commissioning Advisory Group* para el *National Health Service* británico, consideran que el PGD es una alternativa adecuada en algunos casos individuales, tras una evaluación cuidadosa y un consejo genético apropiado, pero no debe interpretarse como un servicio generalizado.

La primera gestación conseguida mediante PGD se publica en 1990 (Handyside *et al.*, 1990). Consiguen el nacimiento de niñas sanas mediante la aplicación de PGD en enfermedades ligadas al cromosoma X, determinando el sexo del preembrión. En España la primera gestación que llegó a término con dos niñas sanas se obtuvo en 1993 (Veiga *et al.*, 1994).

Desde entonces ha crecido de forma considerable el número de familias con distintas enfermedades raras a las que se ofrece el PGD como una opción reproductiva.

2.2 INDICACIONES GENERALES

Inicialmente, en los años 90, el PGD se plantea en pacientes portadores de enfermedades genéticas ligadas al cromosoma X, para rápidamente extenderse a las enfermedades hereditarias autosómicas dominantes y las recesivas, y posteriormente a las anomalías cromosómicas estructurales.

En definitiva, aquellas enfermedades raras con un origen genético bien identificado, para las que hasta que aparece el PGD solo existía el Diagnóstico Prenatal como forma de diagnóstico precoz.

Este concepto de PGD lo avalan distintas sociedades científicas como la Sociedad americana de Medicina Reproductiva (ASRM), la Sociedad Internacional sobre PGD o el Consorcio para PGD de la ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embriology), que han editado guías o normas básicas para la correcta práctica del PGD. Todas coinciden en que básicamente las indicaciones de PGD deben cumplir unos criterios genéticos mínimos:

- La enfermedad debe de ser hereditaria crónica, severa y/o progresiva que genere un grado variable de discapacidad sensorial, motora o intelectual para la que no se disponga a corto plazo de un tratamiento curativo o comprometa seriamente la calidad de vida.
- Se tiene que disponer de un informe genético donde se especifique el estatus genético de la mujer, pareja o familia consultante en relación a la enfermedad que se va a consultar.
- Que exista riesgo genético conocido de transmisión del fenotipo alterado a la descendencia (>10%).

La sociedad científica española ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción), ha elaborado un listado con algunas de las enfermedades sobre las que no cabe duda que reúnen los criterios mencionados, y son las más prevalentes en nuestro país.

Enfermedades hereditarias (general)

Alport, Síndrome de
Ataxia de Friedreich
Ataxias espinocerebelosas
Atrofia Muscular Espinal
Charcot Marie Tooth, Enfermedad de
Distrofia facioescapulohumeral
Distrofia Miotónica (Steinert)
Distrofia Muscular de Duchenne y de Becker
Fibrosis Quística
Hemofilia A y B
Huntington, Enfermedad de
Incontinencia Pigmenti
Marfan, Síndrome de
Miopatía miotubular
Osteogenesis imperfecta
Poliquistosis renal (autosómica dominante y recesiva)
Retinosis Pigmentaria
Talasemias
Wiskott Aldrich, Síndrome de
X Frágil, Síndrome

Enfermedades metabólicas hereditarias con mutaciones definidas

Adrenoleucodistrofia
Gaucher, Enfermedad de
Gangliosidosis
Hunter, Síndrome de (Mucopolisacaridosis tipo II)
Hurler, Síndrome de (Mucopolisacaridosis tipo I)
Lesch Nyhan, Síndrome de
Síndromes de Cáncer hereditario
Anemia de Fanconi
Esclerosis Tuberosa 1 y 2
Poliposis Adenomatosa familiar
Neurofibromatosis 1 y 2
Neoplasia Múltiple endocrina 1 y 2
Von Hippel-Lindau

Anomalías cromosómicas estructurales

Pero aprovechando las posibilidades que ofrece el PGD también han aparecido otras indicaciones de reciente incorporación que no cumplen los criterios anteriormente mencionados, y a las que no es posible ofrecer DP por las connotaciones que llevan implícitas. Algunas de ellas son cuestionadas desde un punto de vista moral y entre ellas se encuentran:

- a) diagnóstico de enfermedad en combinación con la determinación de antígenos de histocompatibilidad (HLA) en preembriones *in vitro* con fines terapéuticos para terceros (PGD-HLA), o solo la determinación de antígenos de histocompatibilidad en preembriones *in vitro* con fines terapéuticos para terceros (Tipaje HLA).
- b) Enfermedades que no presentan un patrón de herencia mendeliano, como las enfermedades degenerativas o la predisposición genética al cáncer.

- c) PGD para mutaciones con penetrancia incompleta:
 - Cardiomiopatías
 - Síndrome QT largo (muerte súbita)
- d) PGD por razones médicas indirectas. Un ejemplo son las parejas donde el varón es hemofílico, y solo desean tener hijos varones.
- e) PGD para concebir hijos afectos parejas que desean que sus hijos hereden su discapacidad, como sordera o acondroplasia.
- f) PGD social, basado en elegir el sexo del futuro bebé.

Por otra parte, hay que destacar una corriente que rápidamente comienza a introducirse a finales de los 90. Se trata de un nuevo concepto que permite ofrecer el PGD a otro perfil de pacientes. Es decir, parejas infértiles en tratamiento de FIV, con el objetivo de mejorar las tasas de gestación. Las indicaciones para las que se ofrece son:

- Mujeres de edad avanzada (>37 años)
- Fallos repetidos de implantación tras FIV
- Parejas con cariotipo normal con abortos de repetición
- Factor masculino severo

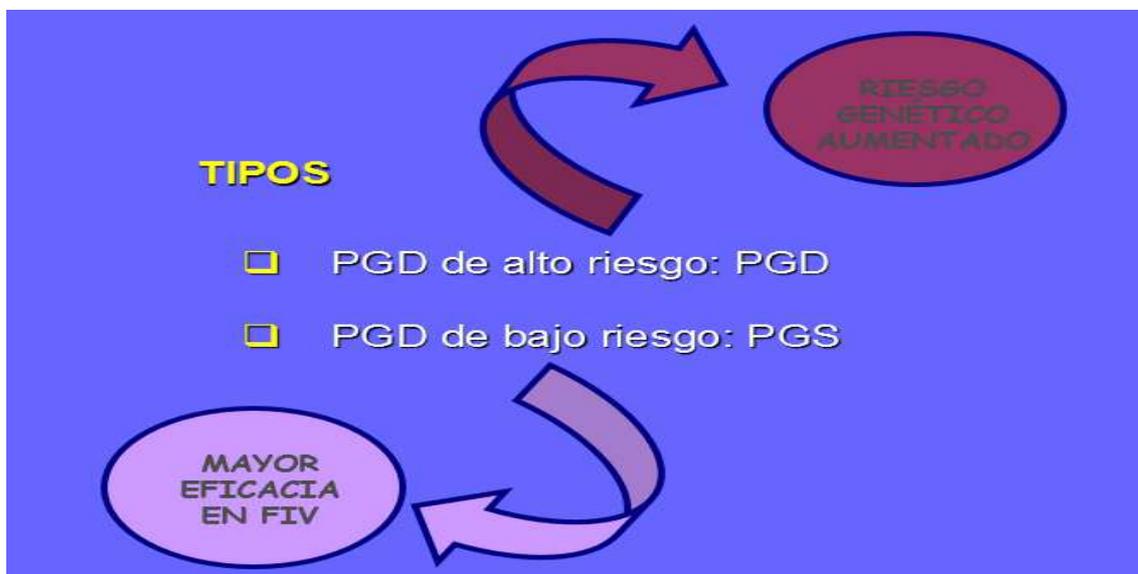
Esta indicación de PGD tiene como fundamento lo siguiente. Se conoce que las alteraciones numéricas de los cromosomas (aneuploidías) son responsables de más del 50% de los abortos de primer trimestre. Si se estudian en los preembriones los cromosomas responsables de estos abortos y los relacionados con los fallos de implantación (cromosomas 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X, Y) y no transferimos los preembriones con alteraciones numéricas para

dichos cromosomas, aumentaremos la tasa de implantación y la de gestación. Realmente estamos hablando de un *screening* de aneuploidias.

2.3 TIPOS DE PGD

Como se deriva del apartado anterior, existen dos tipos bien definidos de PGD:

- a) El PGD destinado a parejas portadoras de una enfermedad de riesgo, conocido como **PGD de alto riesgo (o PGD sin más)**. Es el PGD al que se ha hecho referencia desde el inicio de esta tesis.
- b) El PGD destinado a parejas infértiles en tratamiento de FIV, con el objetivo de mejorar las tasas de gestación, conocido como **PGD de bajo riesgo, PGD-AS (Screening de aneuploidías) o PGS (Screening genético preimplantacional)**.



El PGS está dirigido a aumentar las tasas de gestación en parejas en tratamiento de fecundación *in vitro*. Al no estar incluida en la cartera de servicios del SSPA, no forma parte de los objetivos de esta tesis. No obstante,

haré algunas consideraciones necesarias para comprender algunos aspectos de la misma.

Su aplicación clínica supone una alternativa para un gran grupo de parejas procedentes de ciclos de fecundación *in vitro* de mal pronóstico. En dichas parejas, el PGS tiene como objetivo mejorar las tasas de implantación y reducir las tasas de aborto y concepciones afectas de posibles aneuploidías, gracias a la posibilidad de seleccionar los embriones con una carga cromosómica euploide (Munné *et al.*, 1999; Gianaroli *et al.*, 2001).

Desde su inicio, el PGS rápidamente se extiende en los centros de reproducción asistida, pero sin suficientes estudios (ensayos clínicos prospectivos randomizados) que avalen y ratifiquen su utilidad. Al poco tiempo comienza la publicación de diversos trabajos, determinando un efecto negativo del PGS sobre las tasas de embarazo evolutivo y niño nacido en mujeres de edad materna avanzada (Mastenbroek *et al.*, 2007; Staessen *et al.*, 2008), Así comienza una gran controversia sobre su posible utilidad clínica y es denostada por la comunidad científica.

La técnica inicial de análisis citogenético utilizada en PGS ha sido la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Esta metodología presenta el gran inconveniente de no poder analizar los 23 pares de cromosomas debido a la limitación en el número de sondas fluorescentes y la pérdida de eficiencia en caso de realizar rondas sucesivas de hibridación sobre una misma muestra. La mayoría de los autores coinciden en que esta es la hipótesis más probable para explicar los resultados desalentadores del PGS.

Sin embargo, el concepto teórico del PGS sigue siendo válido. Recientemente, han sido optimizadas técnicas que permiten analizar todo el complemento cromosómico en una sola célula, y la obtención de resultados en poco tiempo, suponiendo una nueva vía para el estudio de aneuploidías en embriones preimplantacionales.

Actualmente, la técnica de arrays de hibridación genómica comparativa (a-CGH) está validada para PGS y es de extensa aplicación en la práctica clínica. No obstante, la comunidad científica es cautelosa y pide más estudios para establecer cuales son verdaderamente las categorías de pacientes (de edad materna avanzada, con fallo de implantación, abortadoras de repetición, con factor masculino severo) que se puede beneficiar de su aplicación en el campo de la reproducción asistida (Forman EJ et al., 2012).

2.4 LEGISLACION EN ANDALUCIA

El PGD es sin duda considerado como una opción reproductiva, pero tiene una limitación fundamental. Solo se puede ofrecer en aquellos países donde su legislación lo permite.

En España es posible realizar PGD de alto riesgo y también el de bajo riesgo o PGS. Está contemplado en la actual Ley de Reproducción Humana Asistida (Ley 14/2006 de 26 de mayo, Artículo 12), donde se especifica cuáles son las indicaciones susceptibles de PGD permitidas en nuestro país y los pasos administrativos para poder realizarlo.

El PGD queda recogido en el artículo 12.1.a, y el PGS en el 12.1.b. En ambos casos se debe comunicar su realización a las autoridades sanitarias correspondientes.

En el apartado 12.2 se establece la posibilidad de realizar PGD con cualquier otra finalidad que no esté recogida en el apartado 12.1, o cuando se quiera realizar PGD-HLA, siempre contando con la autorización de las autoridades sanitarias correspondientes y previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA).

Artículo 12. Diagnóstico preimplantacional.

1. Los centros debidamente autorizados podrán practicar técnicas de diagnóstico preimplantacional para:

a) La detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo posnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los preembriones no afectados para su transferencia.

b) La detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del preembrión.

La aplicación de las técnicas de diagnóstico preimplantacional en estos casos deberá comunicarse a la autoridad sanitaria correspondiente, que informará de ella a la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

2. La aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para cualquiera otra finalidad no comprendida en el apartado anterior, o cuando se pretendan practicar en combinación con la determinación de los antígenos de histocompatibilidad de los preembriones in vitro con fines terapéuticos para terceros, requerirá de la autorización expresa, caso a caso, de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, que deberá evaluar las características clínicas, terapéuticas y sociales de cada caso.

Andalucía concretamente, ha sido la primera Comunidad donde se ha incorporado y regulado la realización del PGD en el ámbito público, mediante el Decreto 156/2005, de 28 de junio, "... por el que se regula el PGD en el Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA), se crea la Comisión Andaluza de Genética y Reproducción y se designa a la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal (UGCGRMF) como centro de referencia dentro del SSPA". (Esta Unidad hoy día es conocida como Unidad de Gestión Clínica de Medicina Materno-fetal, Genética y Reproducción, de Hospital Virgen de Rocío-Virgen Macarena).

Dicho Decreto contempla el Anexo II, donde se recoge un listado de enfermedades inicialmente incluidas en el programa de PGD del SSPA, es decir, la cartera de servicios. Hay que destacar que se trata de un listado de enfermedades monogénicas de alto riesgo. No se autoriza la realización de PGS.

Este Anexo, a través de la Comisión Andaluza de Genética y Reproducción, ha sido ampliado dos veces. Primero con la Orden de 25 de noviembre de 2008, donde se amplía el listado de enfermedades monogénicas y se incluye el PGD-HLA.

Posteriormente en julio de 2015, a través de la publicación de la nueva versión de la Guía de Reproducción Humana Asistida del SSPA se introducen novedades:

1. la ampliación del listado de enfermedades monogénicas con informe favorable de la Comisión Andaluza de Genética y Reproducción.

2. la incorporación de las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en esta Comunidad.
3. La posibilidad de realizar PGD para cualquier enfermedad monogénica que cumpla los criterios establecidos.

La Guía de Reproducción Humana Asistida del SSPA es elaborada con el consenso de un grupo de trabajo, y constituye la referencia para las unidades de reproducción humana asistida del SSPA y todos los implicados en el proceso. Desde el año 2002 que se publica la primera, se ha ido actualizando con la edición de las versiones 2004, 2006, 2013 y 2015.

Es en la versión de 2006 donde se incluye por primera vez el PGD (una vez publicado el Decreto 156/2005) estableciéndose requisitos, indicaciones y criterios de aplicación del programa en esta comunidad autónoma y dentro del SSPA.

En la Guía de 2013 se actualiza fundamentalmente el listado de enfermedades incluidas en cartera, aunque ya estaban autorizadas desde el año 2008 (Orden de 25 de noviembre de 2008), y recientemente, en Julio de 2015, se publica la última versión de la Guía, siendo uno de los factores que han condicionado esta modificación la publicación de la Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, "...por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud".

A fecha de septiembre de 2015, las indicaciones con informe favorable de la Comisión Andaluza de Genética y Reproducción Asistida que se han

incorporado al programa de PGD en el SSPA son las que se describen a continuación (Tabla I1).

Tabla I1. Enfermedades monogénicas con informe favorable de la Comisión Andaluza de Genética y Reproducción

<p>Decreto156/205 Anexo II</p>	<p>a. <i>Atrofia Muscular Espinal</i> b. <i>Distrofia Muscular de Duchenne</i> c. <i>Enfermedad de Huntington</i> d. <i>Fibrosis Quística</i> e. <i>Hemofilia A</i> f. <i>Hemofilia B</i> g. <i>Otras enfermedades con herencia recesiva ligada cromosoma X</i> h. <i>Síndrome de Alport ligado al cromosoma X</i></p>
<p>Orden 25Nov/2008</p>	<p>i. <i>Distrofia Miotónica Tipo 1</i> j. <i>Síndrome X-FRAGIL</i> k. <i>Síndrome de Marfan</i> l. <i>Poliposis adenomatosa familiar del colon</i> m. <i>Selección HLA</i> n. <i>Ataxia Espinocerebelosa Autosómica Dominante:</i> - <i>Ataxia Espinocerebelosa 1 Ataxia Espinocerebelosa 2 (SCA2)</i> - <i>Enfermedad de Machado-Joseph(MJD)(SCA3)</i> - <i>Ataxia Espinocerebelosa 6 (SCA6)</i> - <i>Ataxia Espinocerebelosa 7 (SCA7)</i> - <i>Ataxia Espinocerebelosa 8 (SCA8)</i> - <i>Atrofia Dentatorubral-palidoluisiana (DRPLA)</i></p>
<p>Guía SAS 2015</p>	<p>o. <i>Beta-Thalassemia Major</i> p. <i>Distonía primaria de torsión (DYT-1)</i> q. <i>Distrofia muscular oculofaríngea (DMOF)</i> r. <i>Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (genes PMP22, GJB1 y MPZ)</i> s. <i>Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1: MEN1</i> t. <i>Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2: MEN2</i> u. <i>Síndrome de Von Hippel Lindau (VHL)</i> v. <i>Cáncer de colon no polipósico (Síndrome de Lynch)</i> w. <i>Cáncer de mama y ovario hereditario</i> x. <i>Síndrome de McKusick Kaufman</i> y. <i>Amiloidosis visceral familiar (genes APOA1, FGA y LYZ)</i> z. <i>Enfermedad de Pompe</i></p>

2.5 CRITERIOS DE APLICACIÓN DEL PGD EN EL SSPA

Existen unos criterios universales o **criterios generales de inclusión** para la aplicación de PGD (Consortio para PGD de la ESHRE):

- El diagnóstico genético de la enfermedad en cuestión ha de ser posible y fiable (fiabilidad >90%).
- Debe existir alto riesgo de recurrencia de dicha enfermedad (>10%)
- El trastorno genético derivado debe generar graves problemas de salud.
- Debe ser posible realizar un procedimiento FIV-ICSI con una respuesta adecuada tras estimulación ovárica controlada.

Además, en todas las ediciones de la Guía de Reproducción Humana Asistida del SSPA se especifican unos criterios generales para la aplicación de Técnicas de Reproducción Humana Asistida (TRA), y unos requisitos y criterios de aplicación específicos para PGD.

Criterios generales para indicación y aplicación de TRA

Son criterios a los que también se tiene que ajustar las parejas del programa de PGD, ya que aunque probablemente no tengan problemas de esterilidad, necesariamente han de someterse a un ciclo de Fecundación in vitro.

Estos criterios han sufrido algunas modificaciones. A continuación se indican los criterios generales de la Guía 2015.

- Edad de 18 años y plena capacidad de obrar.

- Edad de la mujer para acceso a las distintas técnicas, según esta Guía (anteriormente se consideraba que la mujer tenía que tener menos de 40 años. Actualmente hay matizaciones).
- Edad del varón menor de 55 años (No incluido en versiones anteriores a la del 2013).
- Esterilidad primaria o esterilidad secundaria sin hijo sano en las parejas heterosexuales, y mujeres sin pareja y sin hijo, o sin hijo sano, que deseen descendencia, y mujeres con pareja femenina sin hijo o sin hijo sano.
- No existencia de esterilización voluntaria de cualquier miembro de la pareja o usuaria (No incluido en versiones anteriores a la del 2013).
- No existencia de embriones congelados en cualquier centro (No incluido en versiones anteriores a la del 2013).
- Consentimiento informado firmado.
- Informe de la Comisión de asesoramiento del programa de RHA del centro², en caso de existencia de factores que afecten o dificulten gravemente el proceso reproductivo (No incluido en versiones anteriores a la del 2013).
- Documento de declaración de veracidad de los datos aportados firmado.
Índice de masa corporal mayor de 19 y menor de 32.

Requisitos para PGD

Son específicos para PGD y han variado poco desde el inicio del programa.

Se resumen los de la última edición de 2015:

- Edad de la mujer menor de 40 años.
- Adecuación a las indicaciones que se especifican en la Guía y en el Decreto 156/2005.
- Serologías VIH, VHB, VHC negativas, salvo técnicas de tratamiento de semen (El Hospital Virgen de las Nieves es centro de referencia para las técnicas de lavado de semen).

Criterios de aplicación de PGD

- El acceso al DGP se realizará según el artículo 4 del Decreto 156/2005.
- El número máximo de ciclos a realizar será, a criterio médico, de hasta tres ciclos de DGP, tal como recoge el protocolo de la Unidad de Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Virgen del Rocío-Hospital Virgen Macarena.
- La indicación del procedimiento terapéutico debe estar informada tanto por la Unidad de Reproducción/UGC de Ginecología y Obstetricia del paciente como por la Unidad de Genética de referencia.
- El procedimiento terapéutico requiere la firma de un consentimiento informado.
- El PGD puede aplicarse en combinación con la determinación de los antígenos de histocompatibilidad de los preembriones con fines terapéuticos a terceros (PGD-HLA). En este caso se requiere informe previo favorable de la Comisión Nacional de RHA, según establece el artículo 12 de la ley 14/2006.

2.6. PROGRAMA DE PGD

Un programa de PGD se apoya en dos pilares fundamentales, la Genética y la Reproducción.

Se trata de un procedimiento complejo que consta de varias fases, donde interviene un equipo multidisciplinar de profesionales que incluye genetistas clínicos, ginecólogos especializados en técnicas de reproducción asistida, embriólogos, citogenetistas y genetistas moleculares, entre los que la comunicación debe ser clara y estrecha, con estrictos controles de calidad.

Para regular y estandarizar el PGD, las distintas sociedades científicas como la Sociedad americana de Medicina Reproductiva, la Sociedad Internacional sobre PGD o el Consorcio para PGD de la ESHRE han editado guías o normas básicas. Las más conocidas y utilizadas son las editadas por el Consorcio europeo (Harton *et al.*, 2011). Son Guías de práctica clínica, donde se hacen consideraciones sobre todas las partes del proceso que conlleva un programa de PGD, en términos que “recomendable”, “aceptable” o “no recomendable”.

Para hacerlo más didáctico dividimos un programa de PGD en 5 fases, incluyendo las recomendaciones del Consorcio europeo:

2.6.1. Fase previa

Las parejas que consultan por este programa son vistas en una primera consulta conjunta de consejo genético y reproducción. Se trata de parejas con un historial reproductivo muy particular, que suele incluir:

- El nacimiento de un hijo afecto.

- Múltiples interrupciones del embarazo espontáneas o terapéuticas.
- Un conocimiento exhaustivo de la patología y problemática de su caso debido a su historia personal o a familiares directos afectados.

Tras valorar su caso, se les asesora e informa de las distintas opciones reproductivas para tener un hijo sano:

- Conseguir gestación de forma natural y asumir el riesgo.
- No tener hijos.
- Optar por la opción de la donación de gametos masculinos o femeninos según cuál de los dos cónyuges sea el portador de la enfermedad.
- La adopción.
- El Diagnóstico prenatal: se realiza cuando la mujer está ya embarazada, bien por estudio de líquido amniótico (amniocentesis) o por estudio de vellosidades coriales.
- El PGD, como alternativa al diagnóstico prenatal que se realiza en el embrión antes de su implantación en el útero.

En esta consulta se explica de forma exhaustiva los resultados, complicaciones y efectos secundarios de un ciclo de PGD.

A las parejas que optan por esta opción reproductiva, se les indica un Estudio Básico de Esterilidad (EBE). En la mayoría de los casos estas parejas no presentan problemas de esterilidad, pero al tener que someterse a un tratamiento de Fecundación in vitro (con el fin de obtener los preembriones objeto del estudio), es necesario el EBE que determinará si existe alguna contraindicación para someterse al mismo.

También es necesario realizar una extracción de sangre a la pareja y a sus hijos y/o familiares afectados de la enfermedad en cuestión (si los hubiera), para poder realizar los test genéticos previos al tratamiento de PGD, y poner a punto la técnica para cada enfermedad y cada familia.

2.6.2. Ciclo de Fecundación *in vitro*

Una vez superada esta fase previa se inicia tratamiento de Fecundación *in vitro*, realizándose estimulación ovárica controlada y posterior recuperación de los ovocitos mediante punción transvaginal ecoguiada (día 0).

La estimulación ovárica ha de ser algo mayor que para un ciclo de FIV, puesto que necesitamos un número mínimo de ovocitos (que cada centro debe determinar según sus resultados y según de qué enfermedad se trata y su tipo de herencia) para completar un ciclo de PGD con ciertas garantías.

Los ovocitos maduros recuperados (MII) son inseminados mediante ICSI (*Intracytoplasmic sperm injection*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides) para evitar la contaminación de ADN de otros espermatozoides ó de células de la granulosa. Hasta el día 3 de desarrollo embrionario el ciclo de PGD es como un ciclo de FIV convencional.



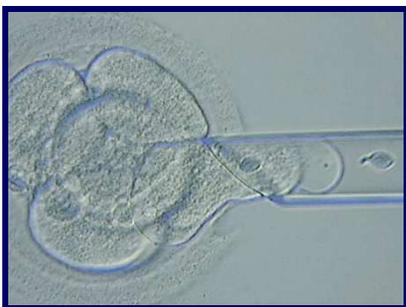
2.6.3. Biopsia embrionaria

La biopsia consiste básicamente en realizar un orificio a la zona pelúcida por donde extraer una o dos células al preembrión. Para ello se pueden emplear técnicas mecánicas, químicas (ácido tyrodes) o láser. Este último sistema es el más preciso, rápido y seguro. El único inconveniente es el elevado coste de su adquisición, pero queda compensado por sus ventajosas características.

La biopsia puede realizarse en distintas etapas del desarrollo embrionario:

a) Estadio de células

En día +3 de desarrollo embrionario es cuando habitualmente se realiza la biopsia embrionaria, momento en que los preembriones tienen entre 6-8 células. En esta fase las células del preembrión son totipotenciales (aún no se han diferenciado) y están iniciando la compactación. Hay que tener en cuenta que estas células realmente no son siempre genéticamente equivalentes, como lo demuestran las distintas tasas de mosaicismos descritas en diferentes trabajos (Munné *et al.*, 1994).



b) Estadio de blastocisto

Es un estadio más avanzado de desarrollo del preembrión, que ya tiene unas 150 células. Se realiza la biopsia en la mañana del día +5, pero previamente en d+3 se debe hacer un orificio en la zona pelúcida.

La ventaja principal es que hay más células para realizar el diagnóstico (se extraen 5-6), y el inconveniente es que hay menos tiempo para tener los resultados disponibles (hay que tener en cuenta que la transferencia se hace en día +5 ó +6). Se analizan células del trofoectodermo (que dará lugar a la placenta) donde se ha visto un alto grado de mosaicismo (varias líneas celulares),



c) Corpúsculo polar

La biopsia de corpúsculo polar (del 1º y del 2º) se realiza sobre el ovocito, no sobre el preembrión, por lo que solo ofrece información materna. Se realiza en los países donde están prohibidas las dos anteriores.



2.6.4. Análisis genético

Las células extraídas son el objeto del estudio genético, representativas del resto del embrión. En principio, cualquier enfermedad causada por una mutación en un gen conocido puede ser diagnosticada en célula única, con el hándicap de que solo disponemos de una o dos células para realizar el diagnóstico.

Además las técnicas que se utilizan en el análisis genético deben permitir un diagnóstico muy rápido y preciso, compatible con el período máximo que los preembriones se mantienen viables en cultivo *in vitro*, es decir 5-6 días después de la recuperación de los ovocitos. En el caso de que no se disponga del resultado genético a tiempo, los embriones se tienen que congelar programándose posteriormente su transferencia en un ciclo de transferencia de embriones congelados (TEC), una vez se disponga del resultado.

Las técnicas empleadas para el análisis de célula única, proceden de la citogenética básica y la biología molecular. La dificultad reside en adaptar los protocolos existentes para las distintas enfermedades a la circunstancia de disponer solo de una célula.

Las dos técnicas básicas utilizadas son dos:

- a) La Hibridación in situ fluorescente (FISH, *Fluorescent in situ Hybridization*).** La técnica FISH es una técnica que permite detectar la localización de secuencias de ADN conocidas en los cromosomas. Utiliza sondas fluorescentes que se unen específicamente a las regiones del cromosoma cuya secuencia es complementaria. Utilizando

microscopía fluorescente se pueden visualizar los puntos de unión entre la sonda y el cromosoma.

La FISH conlleva tres fases:

1. Fijación del núcleo en un portaobjetos.

Para fijar el núcleo existen tres métodos descritos (Velilla *et al.*, 2002):

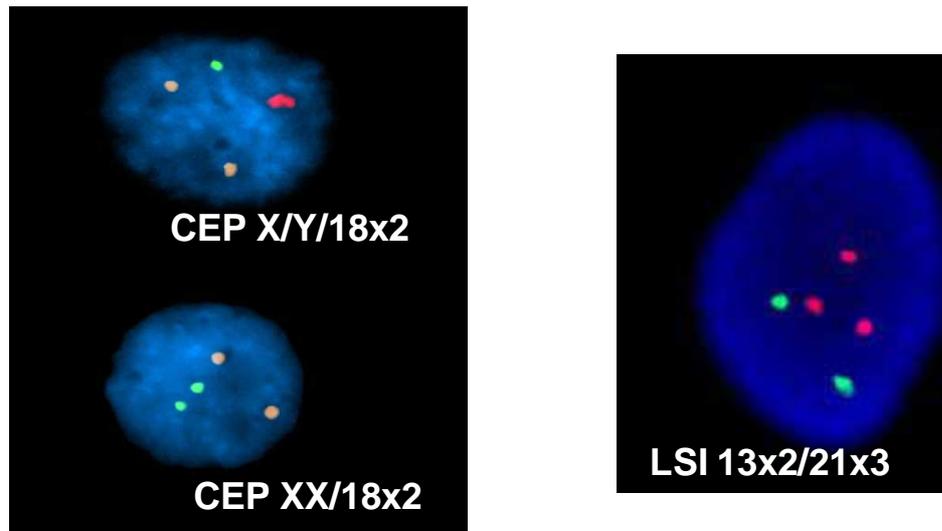
- Acido acético/metanol (Carnoy) (Tarkowsky *et al.*, 1966, modificado por Munné *et al.*, 1998)
- Tween 20HCL (Coonen *et al.*, 1994)
- Tween 20HCL y ácido acético/metanol (Dozortsev and McGinnis., 2001)

Se basan en la lisis celular y liberación del núcleo de los restos citoplasmáticos, que queda fijado en un portaobjetos.

2. Hibridación.

Esta fase conlleva una desnaturalización previa de la doble cadena del núcleo ya fijado y de las sondas específicas marcadas (según los cromosomas que queremos analizar), para una posterior hibridación de la sonda con su secuencia complementaria, en condiciones de humedad y temperatura controladas.

3. Análisis bajo microscopio de fluorescencia. Una célula euploide presenta 2 señales para cada cromosoma (excepto para el cromosoma X e Y según el sexo).



La FISH se emplea para *screening* de aneuploidias en el PGS, para determinación de sexo en enfermedades hereditarias ligadas al cromosoma X y para el estudio de anomalías cromosómicas estructurales.

Esta técnica tiene varias aplicaciones para análisis preimplantacional:

- Por una parte, y tal y como se ha comentado previamente, se aplicaba al PGS para parejas procedentes de ciclos de fecundación in vitro de mal pronóstico. Se recomienda el análisis de los cromosomas más frecuentemente implicados en cromosopatías viables y abortos de primer trimestre (cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X e Y). Además se aconseja incluir el estudio de otros cromosomas en función de cada indicación. No obstante, para esta indicación en particular, la FISH en la actualidad ha quedado desbancada por tecnología más eficiente y completa como la CGH.
- También se ha utilizado para el PGD de enfermedades ligadas al cromosoma X, tales como hemofilia o la distrofia muscular de Duchenne/Becker. El fundamento es muy sencillo, ya que consiste en

utilizar sondas específicas del cromosoma X y del cromosoma Y, marcadas con diferentes fluorocromos, cuya visualización al microscopio es fácil de interpretar. No obstante, actualmente en la inmensa mayoría de los laboratorios se ha preferido sustituir esta técnica por el sexado mediante PCR, o por protocolos específicos directos y/o indirectos para determinar el estatus de embriones sanos, portadores o afectados de la enfermedad.

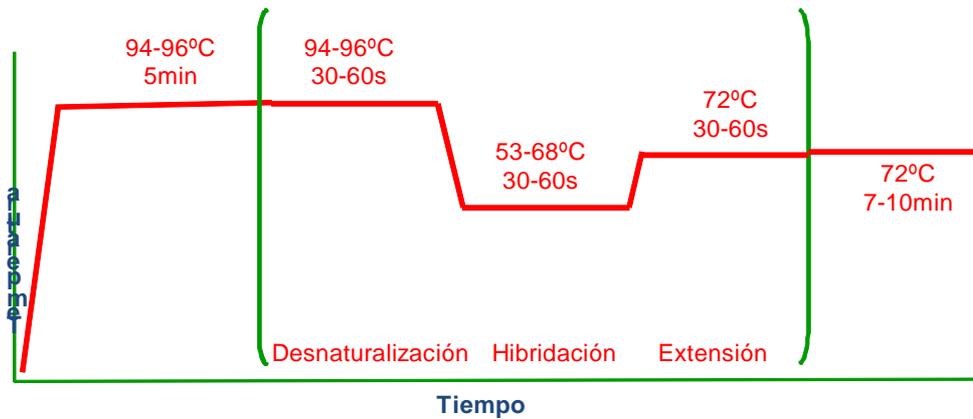
- Por último, también se puede utilizar FISH para la detección de anomalías cromosómicas estructurales y de aneuploidías. El ejemplo más claro es el de parejas, en las que uno de los dos miembros es portador de una translocación cromosómica equilibrada, que puede transmitir en desequilibrio a su descendencia. El caso más representativo puede ser el de una translocación robertsoniana entre dos cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22) o la translocación cromosómica recíproca más frecuente entre un cromosoma 11 y un cromosoma 22.

b) La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Se trata de una técnica de clonación in vitro que permite obtener un elevado número de copias de una o varias regiones concretas de interés del genoma. Hoy por hoy, la inmensa mayoría de los procedimientos de diagnóstico molecular aplicado al PGD de enfermedades monogénicas requieren aislamiento de blastómera, lisis celular, y técnicas fundamentalmente basadas en PCR para análisis molecular directo y/o indirecto.

Para llevar a cabo la amplificación de un fragmento específico de ADN es necesario conocer las secuencias flanqueantes a la región de interés, las cuales nos van a aportar la información necesaria para el diseño de los cebadores o primers. Dichos cebadores son secuencias cortas de ADN de unas 15 a 30 bases complementarias a cada una de las cadenas de la región que se quiere amplificar. También son necesarios los desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, que actúan como precursores del ADN, así como una ADN polimerasa, que es la enzima que sintetiza las nuevas copias del fragmento de ADN de interés. La PCR se desarrolla normalmente en tres pasos:

- Desnaturalización: esta fase se realiza a 94°C-96°C y consiste en la separación de la doble cadena de ADN.
- Hibridación: fase en la que los cebadores o primers se unen a su molde. La temperatura de hibridación es específica de cada fragmento y de los cebadores empleados.
- Extensión: esta fase se realiza a 72°C y en ella la enzima ADN polimerasa incorpora los desoxinucleótidos disponibles en el medio y extiende la hebra que se está sintetizando.

Un esquema general de una reacción de PCR es el siguiente, aunque siempre hay modificaciones de la técnica que se pueden realizar:



2.6.5. Transferencia embrionaria y congelación

Una vez diagnosticados, los preembriones sanos son transferidos al útero, habitualmente uno o dos. En caso de tener preembriones supernumerarios o sobrantes, se congelan para intentos posteriores.

Las técnicas que se utilizan en el análisis genético deben permitir un diagnóstico muy rápido y preciso, compatible con el período máximo que los preembriones se mantienen viables en cultivo *in vitro*, es decir 5-6 días después de la recuperación de los ovocitos. En el caso de que no se disponga del resultado genético a tiempo, los embriones se congelan programándose posteriormente su transferencia en un ciclo de transferencia de embriones congelados (TEC), una vez se disponga del resultado.

2.7. ANALISIS GENETICO DE CELULA UNICA

Los avances experimentados en los últimos años en el área de embriología y genética clínica han aumentado tanto la eficiencia de la biopsia embrionaria, como la fiabilidad del diagnóstico genético a partir de una sola

célula. Sin embargo, en su aplicación, nos encontramos con una serie de limitaciones, especialmente técnicas.

2.7.1. Limitaciones de la biopsia

Desde la introducción del láser en el laboratorio de reproducción, es innegable que la eficiencia de la biopsia ha aumentado. Al ser más rápido y preciso, se evita la exposición a agentes químicos (ácido tyrodes), se reducen los tiempos de exposición de los preembriones a los medios utilizados para biopsia (libres de calcio y magnesio para la descompactación celular) y se reduce el tiempo de exposición a condiciones adversas de humedad, CO₂ y temperatura (cuando están fuera del incubador durante el tiempo de biopsia).

2.7.2. Limitaciones de la FISH

Los principales riesgos y limitaciones del PGD mediante FISH son que debido a problemas inherentes al procesado de las biopsias obtenidas (fijación, células anucleadas, multinucleación, etc.), se estima que un 7% de los embriones biopsiados no tendrá diagnóstico. Además, actualmente, no es posible analizar la totalidad y la estructura de los cromosomas en un único núcleo interfásico mediante FISH. Teniendo en cuenta las limitaciones del diagnóstico en células únicas y el posible mosaicismo embrionario, con la FISH el riesgo de error diagnóstico, es decir, la posibilidad de feto o niño afecto de una cromosopatía tras PGD, se ha establecido en el 0,9%.

Para realizar con eficiencia cualquiera de los métodos de fijación se necesita gran entrenamiento y habilidad por parte del personal. Esto conlleva inevitablemente una larga curva de aprendizaje

Por otra parte, el gran inconveniente que presenta esta técnica cuando se utiliza para PGS, es no poder analizar los 23 pares de cromosomas debido a la limitación en el número de sondas fluorescentes y la pérdida de eficiencia en caso de realizar rondas sucesivas de hibridación sobre una misma muestra de cromosomas. Esto ha llevado a poner a punto metodologías más eficientes. Gracias a la introducción de técnicas de amplificación de genoma completo (WGA) para célula única, hoy día es posible aplicar técnicas de hibridación genómica comparada (Comparative Genomic Hybridization, CGH) para el análisis de todo el complemento y de grandes reorganizaciones.

Finalmente, en enfermedades genéticas ligadas al cromosoma X, en las que la anomalía genética es desconocida o técnicamente no es posible el diagnóstico molecular de la mutación responsable de dicha enfermedad en célula única, también se utiliza FISH. Lo que se determina es el sexo del preembrión, transfiriendo hembras y descartando los varones (aunque la mitad de los varones pueden ser sanos). Esto supone un reto para los genetistas, como vemos en el siguiente apartado, que realizan grandes esfuerzos por realizar optimizaciones en las técnicas de diagnóstico molecular y reducir al mínimo el uso de FISH en estas situaciones.

2.7.3. Limitaciones de la PCR

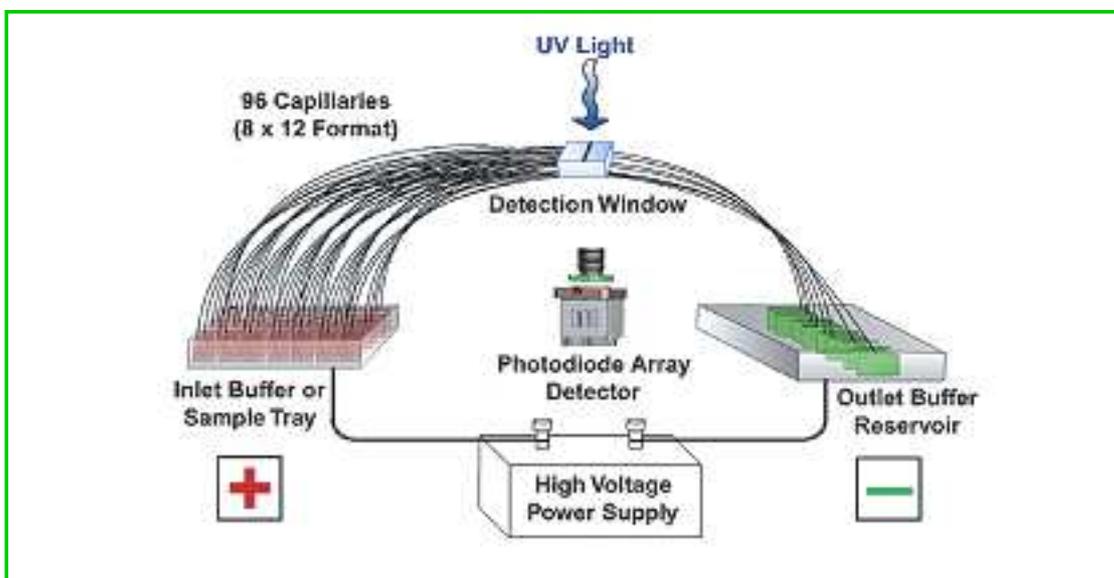
El análisis molecular directo consiste en la visualización de la presencia o ausencia de el/los evento/s mutacional/es responsables de la enfermedad en cada familia. La limitación fundamental es la mínima cantidad de ADN genómico de partida (<6 picogramos de ADN por cada célula), que implica la inversión de un gran esfuerzo para la optimización de los protocolos de PCR en cada caso, intentando minimizar los problemas de contaminación o de amplificación selectiva de un solo alelo (*Allele Dropout*, ADO) (El-Hashemite y Delhanty, 1997). El problema del ADO reside en que se pueden cometer errores de diagnóstico en embriones heterocigotos, fundamentalmente en el caso de enfermedades de carácter dominante.

La mayoría de las publicaciones describen para la PCR una eficiencia de amplificación en torno al 80% (pudiendo llegar al 90-95%) y unas tasas de ADO del 10% (rango 0-40%).

Por ello han surgido diversas estrategias metodológicas con el fin de acometer estas dificultades, como se verá más adelante (Spits and Sermon, 2009).

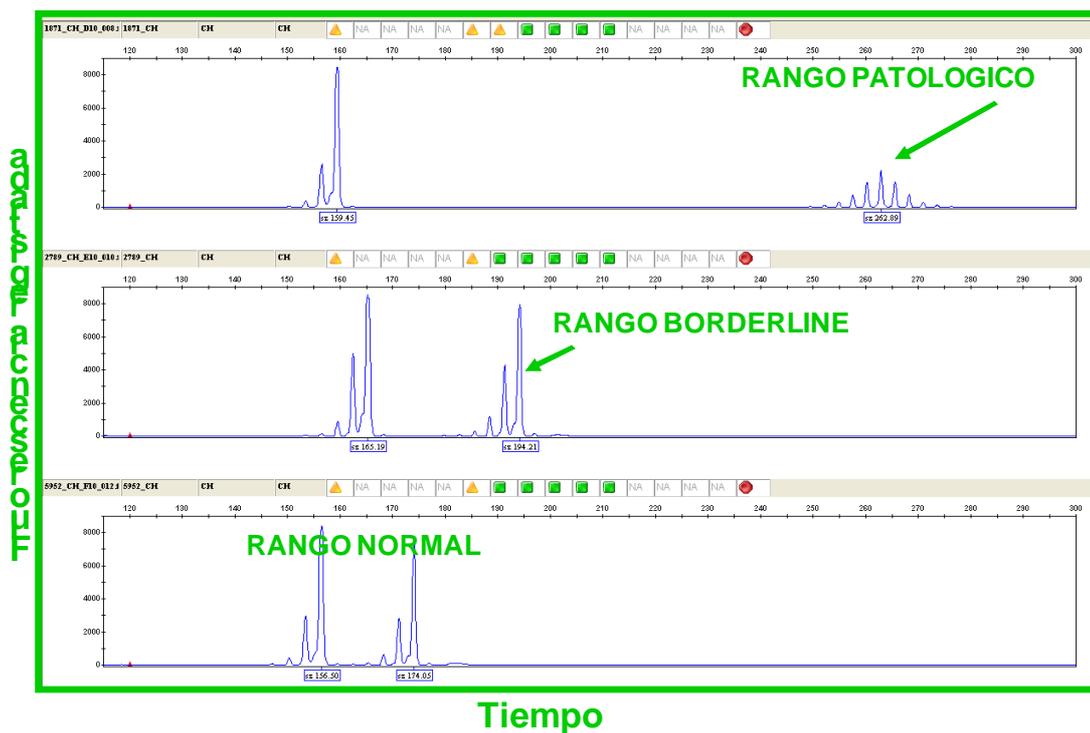
El análisis molecular directo resulta relativamente sencillo para el caso de patologías causadas por mutaciones dinámicas del tipo expansiones, fácilmente detectables mediante PCR fluorescente (Enfermedad de Huntington, Distrofia muscular de Steinert...). En la PCR fluorescente, uno de los 2 cebadores utilizados para amplificar la región de interés va marcado con una molécula fluorescente, por lo que los productos finales de amplificación tendrán también ese marcaje. Una vez terminada la PCR, los productos son sometidos a electroforesis capilar en secuenciador automático, proceso en que dichos

productos van migrando a través de la matriz del capilar desde el polo negativo hasta el polo positivo. Las moléculas más pequeñas encontrarán menos dificultades para migrar a través de la matriz que las moléculas más grandes, es decir migrarán más rápidamente. Así, la electroforesis permite separar los productos de PCR en virtud de su tamaño, el cual depende directamente de la presencia de mutación. Hay una localización exacta en el secuenciador automático en la que se emite luz UV, de manera que en el momento exacto en el que los productos de PCR pasan por esa posición, la molécula fluorescente es excitada y empieza a emitir en la longitud de onda correspondiente. La emisión de fluorescencia es registrada durante todo el proceso de la electroforesis, y el software del sistema permite presentar los resultados de la intensidad de la misma frente al tiempo.



En el ejemplo de la enfermedad de Huntington, existen unos rangos bien establecidos (alelos normales, intermedios o borderline, y patológicos) según el nº de tripletes CAG en el gen *HTT*. Si se amplifica por PCR fluorescente la región que incluye esos tripletes, el tamaño de los productos será dependiente

del nº de repeticiones. Cuanto mayor sea el nº de tripletes, mayor será el tamaño del producto de PCR, más lenta será la migración capilar, más tarde se registrará la fluorescencia emitida por el fluorocromo ligado al producto, y más hacia la derecha aparecerá en el plot de análisis que representa la fluorescencia frente al tiempo.



En el caso de enfermedades causadas por mutaciones puntuales (sustituciones nucleotídicas, pequeñas deleciones, inserciones o duplicaciones), o por grandes deleciones o duplicaciones de exones completos del gen responsable, el análisis molecular directo ha de realizarse por otras técnicas como la secuenciación automática o el MLPA respectivamente, para las que la cantidad de ADN de partida sí es una limitación importante. Se requiere necesariamente una preamplificación del ADN de la blastómera, incrementándose notablemente el riesgo de

contaminación con otras fuentes de ADN y el tiempo en obtener resultados. Además, hay que contar con la posibilidad de que falle el procedimiento de preamplificación, y el ciclo no sea informativo. Por ello, es frecuente recurrir al análisis molecular indirecto.

Para el análisis molecular indirecto se suele hacer uso de marcadores de tipo STR (*Short Tandem Repeat*) ligados a la/s mutación/es, que sean informativos en cada familia. Los marcadores STR son pequeñas regiones de ADN que contienen múltiples copias de secuencias repetitivas cortas (P. Ej CAACAACAACAA.... o GTTGTTGTTGTT....) y que se emplean como marcadores genéticos para rastrear la herencia familiar o mapear enfermedades en el genoma. Son polimórficos, en el sentido de que el número de repeticiones varía, y precisamente lo que se analiza es ese número de repeticiones. Si los STRs están físicamente próximos al locus donde se ubica/n la/s mutación/es responsables de la enfermedad, se transmitirán en bloque. Por consiguiente, si se puede inferir la combinación específica de alelos para cada STR que está ligada a una mutación (es decir, que se encuentra en el mismo cromosoma), el análisis de los mismos servirá para deducir si los embriones la portan o no. El análisis de STRs se basa también en PCR fluorescente y electroforesis capilar, siguiendo el mismo fundamento que el previamente explicado. Concretamente la PCR multiplex fluorescente (amplificación de diferentes loci en una única reacción de PCR), es la mejor opción ya que permite análisis simultáneo de varios STRs ligados al locus de la enfermedad, así como detectar de forma segura contaminaciones y posibles fenómenos de ADO (Spits and Sermon, 2009; Peciña *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista técnico, el análisis molecular indirecto con STRs mediante PCR multiplex fluorescente es mucho más rápido, sencillo y seguro que técnicas de análisis directo que requieren preamplificación. No obstante tiene el inconveniente que de esta manera podrían pasar inadvertidos ciertos eventos de recombinación que, aunque extremadamente improbables, no pueden llegar a excluirse totalmente. Además, este análisis indirecto no siempre es factible:

- Puede ocurrir que los marcadores STRs no sean suficientemente informativos en el contexto de una familia en particular, es decir, que no sea posible inferir la combinación de alelos ligada a la enfermedad.
- En enfermedades de herencia autosómica dominante, puede ocurrir que la mutación responsable del cuadro en uno de los miembros de la pareja sea un evento *de novo*, es decir no heredada de sus progenitores. En estos casos no habrá otros miembros familiares portadores de la misma mutación, con lo que no se podrán llevar a cabo estudios de segregación que permitan esclarecer qué alelos de cada STR están ligados a la enfermedad.

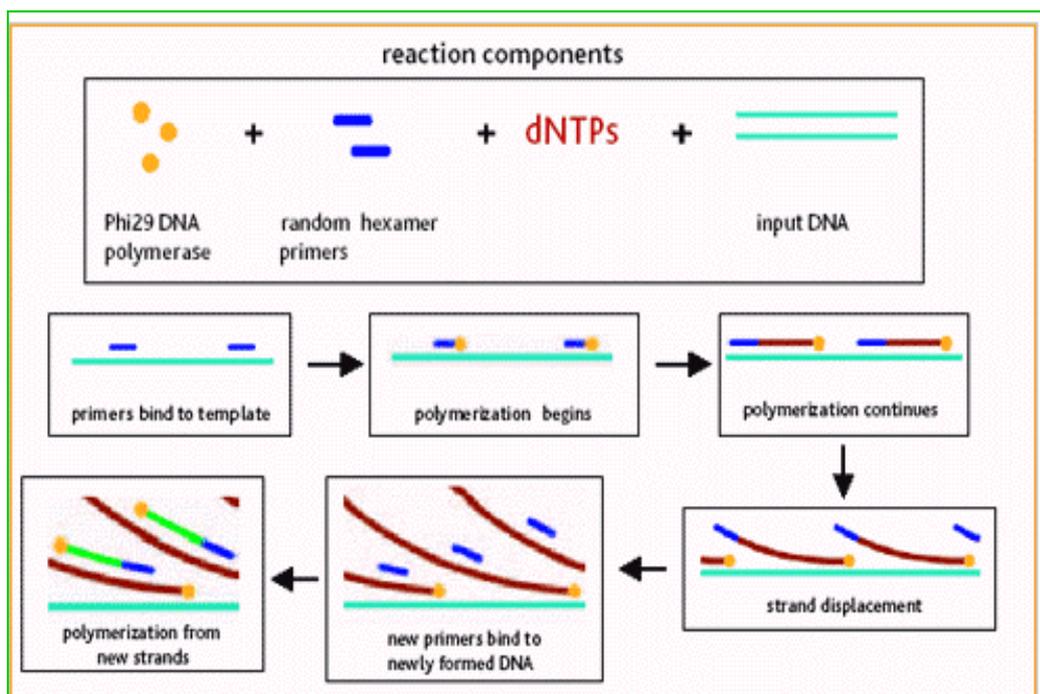
En estos casos se ha de optar ineludiblemente por el análisis molecular directo, recurriendo a formas de salvar la limitación de la poca cantidad de ADN de partida.

Una solución bastante satisfactoria desde el punto de vista técnico consiste en la aplicación de la técnica MDA (*Multiple Displacement Amplification*), para la amplificación de genoma completo (*Whole Genome Amplification*, WGA) de la blastómera (Coskum and Asmaldi, 2007; Spits and Sermon, 2009).

2.7.4. Análisis genético de célula única mediante MDA

La MDA se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos hexaméricos de secuencia al azar que hibridan en distintas regiones del genoma a amplificar y que son extendidos posteriormente por la ADN polimerasa del bacteriófago $\phi 29$, en una reacción isotérmica a 30°C, sin que se requieran ciclos de desnaturalización/renaturalización. El éxito de MDA radica en las características intrínsecas y específicas de la ADN polimerasa de $\phi 29$:

- 1º) Capacidad de polimerizar más de 100.000 nucleótidos sin disociarse del ADN.
- 2º) Capacidad de atravesar regiones de doble cadena ya que el enzima acopla la síntesis del ADN a la apertura (desnaturalización) de las dos cadenas del ADN, haciendo innecesarios ciclos térmicos de desnaturalización,
- 3º) Elevada fidelidad de síntesis del ADN.



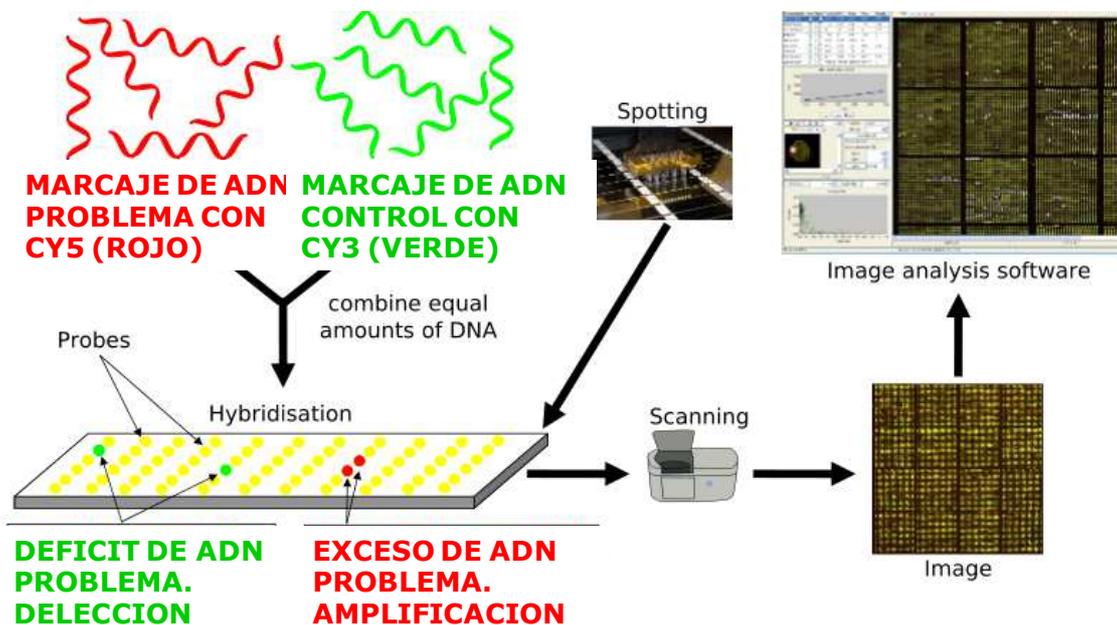
Con el MDA se consigue por tanto obtener una suficiente cantidad de ADN a partir del material genómico de partida de una blastómera, para poder llevar a cabo a posteriori una amplia variedad de técnicas, que permiten analizar un alto número de loci y conducir a un diagnóstico seguro en aquellas enfermedades ocasionadas por mutaciones cuya detección a nivel molecular implica procedimientos más complejos.

2.7.5. Análisis genético de célula única mediante CGH

Según los resultados publicados en el registro de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana (ESHRE), sólo el 18% de los embriones libres de la enfermedad estudiada y transferidos al útero materno, implantan y dan lugar a embarazo ecográfico (Goossens *et al.*, 2009). Se ha atribuido esta baja tasa de implantación a la posible existencia de aneuploidías en los embriones transferidos, no detectadas por las técnicas habitualmente empleadas para el diagnóstico de las distintas enfermedades analizadas. Es previsible que la implementación de técnicas que permitan la detección de dichas aneuploidías, conduzca a una mejor selección de los embriones transferibles y por consiguiente a un mayor índice de éxito en los ciclos de PGD.

La CGH es una tecnología, entre cuyas numerosas aplicaciones se encuentra el PGS, en el que el objetivo no es el diagnóstico de una enfermedad monogénica determinada, sino la identificación de aneuploidías para los 23 pares de cromosomas. Brevemente la CGH consiste en 1º) la amplificación de genoma completo de ADN procedente de blastómera 2º) marcaje de dicho "ADN-problema" y de un ADN control con fluorocromos diferentes y mezcla de

ambos tipos en igual cantidad, 3º) hibridación de la mezcla de ADNs marcados con varios miles de sondas de ADN de todo el genoma, fijadas a un soporte físico llamado array, y 4º) medida de la intensidad de la fluorescencia del ADN-problema y del ADN control para calcular el ratio entre ellas, lo que permite detectar cambios en el número de copias de las distintas regiones cromosómicas.



Su aplicación al estudio de células aisladas, y más concretamente a blastómeras biopsiadas de embriones, fue descrita por primera vez en 1999 (Voullaire *et al.*, 1999). El potencial de esta técnica reside en que permite detectar desequilibrios de cromosomas enteros, o de fragmentos de más de 10 Mb de longitud. Se ha aplicado a PGS consiguiendo un índice de éxito en embarazo de hasta el 57% (Wells *et al.*, 2002; Sher *et al.*, 2007). No obstante sólo algunos centros a nivel mundial están utilizando esta herramienta con distintas aplicaciones al PGD. Al principio del desarrollo de esta tecnología CGH, uno de los inconvenientes estaba en que se requerían al menos 4 días para la obtención de resultados. Por

ello, si se realizaba CGH sobre las blastómeras biopsiadas en día +3, o bien sobre biopsia de blastocisto en día +5 (Wilton *et al.*, 2001; Voullaire *et al.*, 2002; Sher *et al.*, 2009; Fragouli *et al.*, 2009; Schoolcraft *et al.*, 2010), resultaba ineludible la congelación de los embriones, puesto que las recomendaciones generales son la transferencia en día +5, y no había margen de tiempo. El problema de esta estrategia es que alrededor del 33-50% de los embriones no sobreviven los procesos de congelación/descongelación (Obradors *et al.*, 2008). Una de las alternativas que surgió para solucionar este problema es el método en el que se combina el uso de CGH para la detección de aneuploidías en el primer corpúsculo polar, biopsiado inmediatamente tras fertilización por ICSI en día 0 (Durban *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2002), y el diagnóstico molecular de la enfermedad de riesgo en blastómera biopsiada del embrión en día +3 (Obradors *et al.*, 2008, 2009, 2010). Con esta estrategia se consigue un margen de tiempo suficientemente amplio (5 días) para obtener los resultados de CGH, sin necesidad de congelar los embriones. No obstante, en este caso también existe una limitación importante y es que no se obtiene información alguna sobre la dotación paterna del embrión.

Posteriormente se publicó un protocolo modificado de CGH bastante más rápido, aplicable a blastómeras, que permite detectar reordenamientos cromosómicos desequilibrados de >4 Mb en tiempo suficiente como para que se pueda realizar la transferencia de los embriones sanos en día +5 (Rius *et al.*, 2010, 2011). Esta estrategia, combinada con el análisis genético de la enfermedad monogénica en riesgo, sería una solución ideal para las parejas de PGD, a las que se les podría transferir únicamente aquellos embriones libres

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

de la enfermedad monogénica de riesgo y de alteraciones cromosómicas detectadas por CGH, dentro del mismo ciclo de FIV y sin previa congelación.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El PGD es una opción reproductiva para aquellas parejas con alto riesgo de transmitir una enfermedad de base genética a su descendencia, y aunque se considera una alternativa idónea al diagnóstico prenatal, tiene numerosas limitaciones, especialmente desde el punto de vista técnico.

El objeto fundamental de esta tesis doctoral es proporcionar al programa de PGD de la UGCGRMF nuevas estrategias diagnósticas, mediante la combinación del análisis molecular directo e indirecto de las diferentes enfermedades monogénicas, y el análisis de posibles aneuploidías o reordenamientos cromosómicos no equilibrados, que parecen ser responsables de la baja tasa de implantación registrada para los ciclos de Fecundación in vitro y por consiguiente de PGD.

Con esta estrategia se prevé conseguir un enfoque completo de cada caso clínico, abrir el abanico de posibilidades para ofrecer respuesta a las familias afectadas de enfermedades genéticas raras e incrementar el porcentaje de embarazo tras los ciclos de PGD.

Los objetivos principales de esta tesis son:

1º- Optimización de las estrategias diagnósticas para diagnóstico molecular en célula única de enfermedades ligadas al cromosoma X, de enfermedades autosómicas dominantes y de enfermedades autosómicas recesivas, así como valoración de su impacto en el programa.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

2º- Optimización de la técnica MDA, para la amplificación de genoma completo del ADN de blastómeras, con el fin de una posterior implementación de la misma.

3º- Valoración de la técnica CGH para la detección de aneuploidías y otros reordenamientos cromosómicos desequilibrados en blastómeras, para su posterior aplicación en el programa.

Esta tesis doctoral está enmarcada dentro de un proyecto de investigación concedido y financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (2012PI/097). Se adjunta informe favorable del Comité de ética de Hospitales Virgen del Rocío. (ANEXO a)

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

PACIENTES Y METODOLOGÍA

4. PACIENTES Y METODOLOGIA

En esta tesis doctoral se realiza un estudio retrospectivo del programa de PGD en el SSPA de 10 años de evolución, desde su origen en el año 2005 hasta el año 2015.

Previamente al inicio del Programa y precisamente para su puesta en funcionamiento, la UGCGRMF hubo de ser dotada de recursos humanos y físicos.

Dentro de los recursos humanos se contrataron 3 facultativos especialistas en Ginecología, Genética y Embriología respectivamente, actualmente en contrato de interinidad en dicha Unidad.

Se adquirieron recursos físicos para la puesta a punto del programa por un total (incubador, microscopio invertido y micromanipulación, estereomicroscopio, campana de flujo laminar, sistema de láser, sistema de hibridación y otros varios).

A lo largo del año 2005 se llevaron a cabo varias estancias formativas por parte de la Genetista y la Embrióloga, concretamente en dos centros privados españoles y un centro europeo. Hay que tener en cuenta que ese momento aún no estaba muy extendida la aplicación clínica del PGD y no existía la regulación y estandarización que hoy existe para el PGD, sobre todo tras la publicación de las 4 Guías de práctica clínica de la ESHRE. En el año 2005 se contaba con unas recién publicadas Guías de PGD de la ASRM y de la ESHRE y Guía de la Sociedad Internacional de PGD (PGDIS), muy generales.

En estas circunstancias se inicia el programa de PGD en noviembre de 2005 con la siguiente estructura de trabajo.

4.1. PACIENTES DEL PROGRAMA DE PGD

El Decreto 156/2005, de 28 de junio, establece que “...la aplicación de esta técnica se hará, con cargo al sistema sanitario público, para todas aquellas personas residentes en Andalucía que presenten riesgo de transmitir a sus descendientes cualquiera de las patologías recogidas en el Anexo 1 del citado decreto. (Este anexo ha sido ampliado con la Orden de 25 de noviembre de 2008 y tras la edición de la Guía SAS 2015).

La derivación se realizará desde el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Centro Hospitalario que corresponda por razón de domicilio, y a través de Gestoría del Usuario”.

En la práctica, estos pacientes se derivan desde todas las provincias andaluzas (en algunos caso de PGD-HLA desde otras Comunidades) a la UGCGRMF, que es el asignado como centro de referencia, tanto por los Servicios de Ginecología como por los Especialistas relacionados con las distintas enfermedades que se estudian.

4.2. VALORACIÓN PRE-PGD

Las solicitudes recibidas para PGD son valoradas por los ginecólogos asignados al programa de PGD en base a los requisitos y criterios de aplicación establecidos en el Decreto (y sus posteriores ampliaciones) y en la Guía SAS en vigor.

Antes de la primera consulta se verifica que existe informe que acredite diagnóstico genético de la enfermedad. Si no hubiese diagnóstico genético, dicho estudio se debe solicitar al hospital de referencia del paciente/s.

Una vez valorada la solicitud la pareja es citada a consulta.

4.3. FASE PREVIA

Las parejas de Andalucía que optan por el programa PGD son inicialmente atendidas en nuestra Unidad por ginecólogos con experiencia en Consejo Genético y Técnicas de Reproducción Asistida.

4.3.1. Primera Consulta

Se trata de una primera consulta conjunta de consejo genético y reproducción, donde se realizan los siguientes pasos:

a. Se ofrece información sobre el programa de PGD, haciendo especial hincapié en posibilidades de éxito, fracaso y alternativas reproductivas.

b. Se completa la historia clínica, se traza el árbol genealógico y se verifican los informes de análisis genéticos aportados por la pareja, para comprobar la factibilidad de la realización de un ciclo.

c. Exploración ginecológica y ecográfica de la paciente.

d. Solicitud de estudio básico de esterilidad (EBE), que consta de las siguientes pruebas diagnósticas:

- i. Serología de ambos miembros de la pareja: VHB, VHC, VIH y Lues a ambos, Rubeola IgG a la mujer.
- ii. Grupo y Rh de la pareja.

- iii. Analítica general realizada en ayunas a la mujer con determinación de Hemograma, Bioquímica con perfil renal y hepático y Estudio de coagulación.
- iv. Analítica hormonal realizada entre los días 2º al 4º del ciclo menstrual con determinación de FSH, LH, E2 y PRL. En la Guía 2015 se solicita Hormona Antimülleriana (AMH).
- v. Seminograma al varón.

El EBE puede realizarse en el hospital de referencia y posteriormente ser remitido por Fax a nuestra Unidad para su valoración.

e. Entrega del documento de consentimiento informado específico de PGD (ANEXO b. Consentimiento informado para PGD-HLA).

4.3.2. Segunda Consulta

En una segunda consulta se llevan a cabo los siguientes pasos:

- a. Recogida del documento de consentimiento informado debidamente cumplimentado y firmado por la pareja y el facultativo.
- b. Valoración de los resultados del estudio básico.

En caso de ser necesario, se solicitarán pruebas complementarias adicionales o la repetición de alguna prueba en nuestro laboratorio, como en las siguientes situaciones:

- 4. En caso de OTA severa se realizará un 2º seminograma en nuestro laboratorio para verificar los resultados y la posibilidad de realizar PGD.
- 5. En caso de valores de FSH elevados (≥ 10 UI/ml) que puedan hacer sospechar de la existencia de una baja reserva ovárica se solicitará

un Test de Clomifeno mediante la determinación de FSH en los días 3º y 10º de ciclo menstrual con la toma de 50 mg/12 horas de Citrato de Clomifeno entre los días 5º al 9º. En caso de ser patológico (suma de ambas cifras de FSH ≥ 26) se excluirá a la paciente para la realización de un ciclo de PGD. Actualmente se está introduciendo la determinación de hormona antimülleriana para valorar reserva ovárica)

6. En caso de detectar la presencia de alguna enfermedad infecciosa mediante Serología no diagnosticada con antelación, se valorará la necesidad de realizar determinaciones analíticas adicionales así como la posibilidad de valoración por parte del Servicio de Infecciosos.
 7. El Hospital Virgen de la Nieves de Granada es el Hospital de referencia para pacientes con serología positiva. En caso necesario este Hospital realiza el lavado de semen que posteriormente se usará en el ciclo de PGD.
 8. En caso de OTA severa, criptozoospermia o azoospermia, se valorará la necesidad de realización de pruebas genéticas (cariotipo y microdelecciones del cromosoma Y), estudios hormonales al varón y la valoración por parte del Servicio de Urología con vistas a la posibilidad de realización de Biopsia Testicular.
- c. Extracción de sangre a la pareja y a los familiares según indicación del Genetista responsable de realizar el estudio genético de informatividad.

Una vez que los resultados del EBE y del estudio genético están listos y se confirma la posibilidad de realizar un diagnóstico seguro y fiable, se planifica el ciclo de PGD.

4.3.3. Solicitud de autorización para PGD-HLA

Para la realización de PGD-HLA o tipaje HLA es necesario contar con la autorización por parte de las autoridades sanitarias correspondientes, previo informe favorable de la CNRHA. Los requisitos para iniciar la solicitud de selección embrionaria son:

1. Informe clínico detallado y actualizado de las características del paciente para el que se solicite la selección embrionaria, incluyendo en los casos que sea necesario hemograma reciente y estudio de médula ósea, así como los tratamientos aplicados con anterioridad y su resultado.
2. En el caso de que se haya indicado previamente el trasplante de progenitores hematopoyéticos para el paciente, justificación de la ausencia de donantes emparentados compatibles, documentando, en su caso, el inicio de búsqueda de donante no emparentado si éste se ha indicado, así como el tiempo de búsqueda y los resultados de ésta.
3. Justificación de la solicitud de selección embrionaria para la obtención de donante por el médico que la indique, especificando si se trata de un tratamiento consolidado o si éste es de carácter experimental, aportando las evidencias existentes al respecto.
4. Compromiso expreso de una unidad o servicio en el que se realicen trasplantes de células de cordón umbilical de que se llevará a cabo el

trasplante en ese servicio si se logra la generación de un donante por la vía solicitada.

5. Otros datos de la pareja a la que se ha indicado la selección embrionaria, incluyendo la edad de la madre y los antecedentes reproductivos de la pareja.
6. Especificación de los medios materiales y personales con los que cuenta el centro en el que se pretenda llevar a cabo la selección embrionaria para desarrollar la misma, incluyendo declaración de si el centro dispone de servicio o unidad general de genética clínica.
7. Exposición de la experiencia previa del centro en el que se pretenda llevar a cabo la selección embrionaria en Diagnóstico Genético Preimplantacional y determinación de antígenos de histocompatibilidad en preembriones, especificando las enfermedades para las que se haya llevado a cabo el DGP y número de casos de cada enfermedad, e igualmente el número de casos en los que se haya practicado la determinación de los antígenos de histocompatibilidad embrionaria.
8. Formulario de consentimiento informado firmado por la pareja solicitante en el que se acredite que ésta ha recibido información suficiente sobre los procedimientos implicados, posibilidades de éxito y los aspectos éticos y legales.

Una vez recogidos todos los documentos se envía solicitud a la autoridad sanitaria competente.

En febrero de 2015 la CNRHA ha editado los nuevos “Requisitos documentales para la solicitud de informes de la CNRHA” donde se contempla la actual documentación requerida para la realización de PGD-HLA.

4.4. PROGRAMACIÓN Y CICLO PGD

Para la planificación de los ciclos se utiliza un cuadrante. El número de ciclos semanales a realizar dependerá de la planificación de cada momento, siendo lo habitual 2.

Se contacta por teléfono con la pareja desde la consulta de Reproducción y se planifica su ciclo en función de la fecha de su ciclo menstrual y el cuadrante. Se indica la toma de anticonceptivos orales.

En el caso de que algún ciclo no pueda programarse la semana esperada (ej. la paciente no regla en la fecha prevista), el facultativo que atiende a la paciente modifica el cuadrante de forma que los Laboratorios de Genética y Embriología puedan realizar una mejor planificación del trabajo.

4.4.1. Consulta para confirmar la regla (CR):

La paciente es citada en consulta para confirmar la fecha de la regla al menos 15 días antes de la fecha prevista de control de frenación (CF) según aparece en el citado cuadrante.

En esta consulta se realiza:

- a. Comprobación de recogida del Consentimiento Informado, debidamente firmado por la pareja y el facultativo responsable.

- b. Complimentación de las Hojas del ciclo FIV (para la H^a clínica y para la paciente).
- c. Se dan a la paciente las indicaciones para comenzar el tratamiento de frenación hipofisaria (Análogo de GnRH) y suspensión de los ACO.
- d. Solicitud de estudio preanestésico (EPA), que se realizará preferiblemente el día en que la paciente viene a la siguiente consulta, es decir al control de frenación (CF).
- e. Citar a la paciente para el primer control de frenación que se realizará 14-15 días después, habitualmente un lunes.

4.4.2. Consulta para control de frenación (CF):

El primer control de frenación se realiza aproximadamente tras 14 días de análogos de GnRH (dicha consulta se efectuará en Lunes según el cuadrante de SIDCA).

En este día se realizará:

- a. Ecografía, para comprobar si se cumplen los criterios de frenación:

Ovarios con folículos < 10 mm y Endometrio < 6 mm.

Tras valoración ecográfica, se pueden dar los siguientes escenarios:

- i. Que la paciente haya menstruado siendo la frenación correcta:
 - Se disminuye la dosis del análogo de GnRH a la mitad.
 - Se comienza la estimulación ovárica adecuada al caso.
 - Se cita a la paciente a los 7 días (generalmente lunes siguiente) para el primer control de estimulación (CE).

- ii. Que la paciente ha menstruado y la frenación no sea correcta:
 - Seguir el tratamiento con análogo agonista una semana más y efectuar nuevo control de frenación.
- iii. Que la paciente no haya menstruado aunque la administración del análogo de GnRH sea correcta.

Ello puede deberse a diversas posibilidades (ausencia de crecimiento endometrial previo, embarazo a descartar o que la paciente no estaba en fase lútea y se ha producido una estimulación). El ginecólogo debe descartar estas posibilidades e indicar la actitud a seguir.

- b. Citar a la paciente para Control de estimulación

4.4.3. Consulta para control de estimulación (CE):

La primera visita para controlar la estimulación se efectuará después de realizar tratamiento estimulador con Gonadotropinas durante 7 días, es decir, el lunes siguiente al CF. En caso de que se sospeche un gran riesgo de hiperestimulación o la situación clínica así lo indique, el control puede realizarse antes.

- a. Se realiza valoración ecográfica de la estimulación ovárica.
 - a1. Si la estimulación es adecuada se puede programar para el viernes de esa semana la punción folicular:
 - Se indica la administración de HCG 36 horas antes de la punción folicular (a las 22:30 horas del día anterior al anterior).

- Se suspende la administración de análogos de GnRH el día de la administración de HCG.
- Cursar parte de Quirófano para el día de la punción folicular.
- El varón deberá entregar el Semen el día de la punción en el Laboratorio de FIV.
- La paciente debe realizar lavado vaginal (Rosalgín) el día de la HCG y el día posterior, tomar Antibiótico profiláctico (Azitromicina 1 gr monodosis) el día anterior a la punción y comenzar tratamiento de Progesterona micronizada (vía vaginal) posteriormente a la punción.

a2. Si la estimulación no es adecuada, seguir tratamiento y controles cada dos días (nueva visita el miércoles) hasta que el diámetro folicular medio sea de 19-20 mm, momento en que se indicará la dosis de HCG.

a3. Si la estimulación sigue sin ser adecuada, considerar cancelación por hipo-respuesta y valorar el caso.

a4. Si la estimulación es excesiva cancelar por riesgo de hiperestimulación.

b. Valoración de los niveles de estradiol (opcional).

4.4.4. Punción folicular:

Se programa la punción folicular para realizarla un viernes o lunes, según el cuadrante.

Se realiza según el procedimiento habitual de FIV, en quirófano y con sedación.

La captación folicular se realiza mediante punción transvaginal ecoguiada.

Al alta se informa a la paciente del número de ovocitos obtenidos y calidad de los mismos, así como de las recomendaciones a seguir:

- Analgésicos si presenta dolor abdominal y la ingestión de líquidos abundantes.
- Comenzar la noche de la punción el tratamiento vaginal con Progesterona micronizada: 200 mg/8 horas.

Posteriormente y en los días sucesivos el personal el Laboratorio irá informando convenientemente del proceso de biopsia y estudio genético y se fijará la fecha de la transferencia.

4.4.5. Fecundación en el Laboratorio

La realización del ciclo de PGD sigue las mismas pautas que el de un ciclo FIV convencional hasta día+3 (Carrillo *et al.*, 2007). La técnica de inseminación que se realiza es siempre ICSI, por el riesgo de contaminación con ADN extraño (espermatozoides y células de la granulosa).

4.4.6. Biopsia embrionaria

La biopsia embrionaria se lleva a cabo siguiendo el protocolo habitualmente empleado por los embriólogos de esta Unidad para los ciclos de PGD (Peciña *et al.*, 2010, Fernández *et al.*, 2013).

Se realiza en la mañana del d+3, en estadio de células, mediante el uso de tecnología láser (Octax laser). Para ello se realiza un pequeño orificio en la zona pelúcida de los preembriones disponibles y se aspira suavemente una o dos blastómeras, Previamente se coloca al preembrión en un medio libre de calcio y magnesio (G-PGDTM Vitrolife) para su descompactación y así facilitar la extracción de las mismas. Se debe realizar en el menor tiempo posible para que

la descompactación no se haga irreversible.

El equipo y material empleado para la biopsia consiste en:

- Microscopio invertido Olympus con micromanipulación
- Microinyector Eppendorf Cell Tram Vario*, para aspiración
- Microinyector Eppendorf Cell Tram Oil, para sujeción
- Equipo Laser Olympus
- Micropipetas Biopsia MBB-BP-SM-30
- Micropipetas Holding MPH-SM-30
- Medio G- DGP (Vitrolife)
- Placas de biopsia (Nunc)

Los criterios de calidad embrionaria utilizados para realizar la biopsia en d+3 son: preembriones de \geq de 5 células con $<$ de 35% de fragmentación y sin multinucleación en d+2 (Alikani *et al.*, 1999, 2000).

En cuanto al número de blastómeras a biopsiar:

- Si los embriones en Día + 3 tienen más de 7 células se extraen 2.
- Si los embriones en Día + 3 tienen 5 ó 6 células se extrae 1.
- Si tiene 4 células o menos en D+3, no se biopsia. (Embrión bloqueado)

Una vez realizada la biopsia, si se va a llevar a cabo un protocolo de FISH, utilizado en los comienzos del programa PGD en nuestra Unidad para sexado de embriones en patologías ligadas al cromosoma X, se realiza fijación de blastómeras mediante el método descrito por Dozortsev, con algunas modificaciones propias. De ese modo, las blastómeras son depositadas sobre un portaobjetos en una gota de 3 microlitros de TWEEN 20, bajo estereomicroscopio.

Preparación de TWEEN 20:

- 2.5 microlitros de Tween-20 (Sigma)
- 2.5 mililitros de agua destilada
- Agitar
- 25 microlitros de HCl 1 N
- (1 ml de HCl 1 N → 83 microlitros de HCl al 37% (MERCK) + 917 microlitros de agua destilada)

A continuación, se traslada el porta al microscopio invertido y se controla en todo momento la liberación del núcleo de los restos citoplasmáticos, hasta la completa evaporación de la gota. Bajo microscopio invertido se hace una marca con rotulador en la proximidad del núcleo, y después se marca la posición por la zona inferior del portaobjetos con un lápiz marcador de punta de diamante. A continuación, se fija la blastómera a la superficie del porta mediante la adición de Carnoy (metanol y ácido acético glacial 3:1). Por último, con el microscopio en el que posteriormente se realiza el análisis del FISH, se miden las coordenadas de la marca realizada con el lápiz de diamante, con el fin de ubicar la posición aproximada de la blastómera.

Si lo que se va a llevar a cabo es un protocolo basado en PCR, cada blastómera es depositada en una gota de 10 μ L de medio, sobre placa de Petri. A continuación, con la ayuda de capilares de 75 micras de grosor, mediante aspiración suave las blastómeras son sometidas a un rápido lavado con tampón de disociación, cuya preparación se detalla a continuación:

Tampón de disociación:

0.8 g de NaCl

0.02 g de KCl

0.005g de NaH₂PO₄

0.1 g de glucosa

0.01 g Phenol red

Agua Milli-Q c.s.p 100ml

Autoclavar y alicuotar. Añadir una cucharadita de BSA justo antes del uso

Finalmente, tras tres lavados consecutivos, las blastómeras son transferidas de forma individual a microtubos de 0.2 mL que contienen 2.5 µL de tampón de lisis.

Una vez entubadas, son almacenadas a –80°C durante al menos 30 minutos.

4.4.7. Análisis genético

Inicialmente para determinar el sexo en las enfermedades ligadas al cromosoma X se realiza mediante FISH.

Posteriormente se optimiza el método de diagnóstico molecular basado PCR, al igual que para el resto de enfermedades monogénicas.

La mayoría de los protocolos han sido optimizados por las genetistas de la UGCGRMF previo a la incorporación en el programa de cada una de las enfermedades.

Tanto las adaptaciones de protocolos previamente publicados, como todas las optimizaciones de nuevos métodos se desarrollan en los apartados 4.5 al 4.8.

4.4.8. Transferencia y congelación de preembriones

Una vez diagnosticados, los preembriones sanos son transferidos al útero, y nunca más de dos, con el fin de evitar grandes gestaciones múltiples (Carrillo *et al.*, 2007). Las transferencias de las punciones del viernes se realizan en d+5, miércoles. Las transferencias de las punciones del lunes se realizan en d+4 (viernes) o d+5 (sábado), en función del tiempo de diagnóstico.

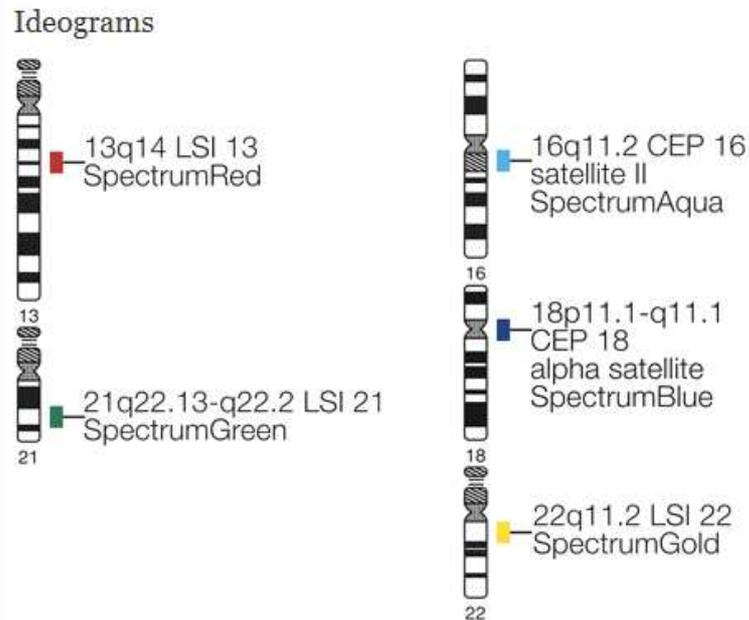
La determinación de la β -HCG se indica sobre el día 9º tras la transferencia. Manteniendo el tratamiento con Progesterona micronizada hasta la próxima consulta o menstruación.

En caso de tener preembriones supernumerarios o sobrantes, en caso de no tener disponible el diagnóstico en d+5 o cuando exista riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), se congelan los preembriones mediante el método de vitrificación (Irvine) para intentos posteriores (este método de vitrificación es el único medio comercial disponible en el año 2005).

En caso de gestación, se recomienda a todas las pacientes la realización de DP, y posterior seguimiento del recién nacido por parte de su pediatra. Se ofrece la realización del DP en la UGCGRMF, independientemente de su lugar de procedencia.

4.5. PROTOCOLO DE FISH PARA ENFERMEDADES LIGADAS AL CROMOSOMA X

Para llevar a cabo el sexado de embriones en caso de enfermedades monogénicas con un modo de herencia ligada al cromosoma X, se ha utilizado el Vysis MultiVysion PB Multi-color Probe Kit. Este kit incluye sondas que hibridan con los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21.



4.5.1. Deshidratación de las preparaciones para FISH

Es preciso eliminar de las preparaciones todo contenido citoplasmático para una correcta visualización posterior del núcleo. Para ello se someten las preparaciones a sucesivos lavados de 1 minuto cada uno a temperatura ambiente en soluciones de etanol al 70%, 80% y 100% respectivamente. Finalizados los lavados, se dejan secar las preparaciones a temperatura ambiente.

4.5.2. Hibridación de las preparaciones

- Una vez identificada la zona donde se localiza la blastómera (gracias a la marca previamente realizada con el lápiz de punta de diamante por la parte inferior del porta-objetos), se procede a la hibridación. Las sondas FISH son sensibles a la luz, por lo que a partir de este paso hay que trabajar siempre con poca luz. El mix de sondas se encuentra preservado a -20°C , y en general es suficiente con sacarlas 5-10 minutos antes de su uso. Para preparar las

sondas, se da un ligero vórtex al tubo que las contiene, seguido de un pulso en centrífuga durante 30 segundos.

- Se colocan las preparaciones en el sistema de hibridación
- Se añade sobre la zona previamente seleccionada 1 μ L de sondas.
- Se coloca un cubreobjetos sobre la superficie de hibridación asegurando que no se formen burbujas, y se cubre la zona de hibridación con parafilm.
- Se selecciona el programa de hibridación: 73°C-5' → 37°C-4h.

4.5.3. Lavado de las muestras tras hibridación

- Se prepara una cubeta coplin de vidrio con solución de lavado 1 (0.4xSSC/0.3% NP-40) y se deja en un baño. Se programa el baño para que suba la temperatura hasta 73°C.
- Asimismo, se prepara otra cubeta coplin de vidrio con solución de lavado 2 (2xSSC/0.1%NP-40) y se deja a temperatura ambiente.
- Cuando la temperatura del baño se haya estabilizado en 73°C, se quita el cubreobjetos de las preparaciones, y estas se introducen en el coplin que contiene la solución de lavado 1 durante 2 minutos.
- A continuación se introducen en el coplin que lleva la solución de lavado 2 durante 1 minuto.
- Se dejan secar a T ambiente en oscuridad.

4.5.4. Contratinción tras lavado y visualización al microscopio de fluorescencia

- Una vez que las preparaciones están completamente secas tras el lavado, se aplican 10 μ L de contratinción DAPI II, y se cubre con cubreobjetos.

- Las preparaciones se visualizan mediante un microscopio de fluorescencia con los filtros específicos para cada fluorocromo.
- Las imágenes se captan con una cámara CCD y se procesan con el software específico (Cytovision, Applied Imagin, Sunderland, UK).

4.6. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS BASADOS EN PCR APLICADOS A PGD

4.6.1. Selección de marcadores STR para el análisis molecular indirecto de cada patología.

Para la selección de marcadores STR ligados a cada locus de enfermedad que se van a utilizar en PGD hay diversas opciones. Cuando los métodos de PCR múltiple están previamente publicados se puede optar por utilizar los mismos marcadores e incluso las mismas condiciones descritas por los autores. En aquellos casos en los que los protocolos no están descritos, es necesario seleccionar una batería de STRs óptimos, priorizándose dos premisas fundamentales:

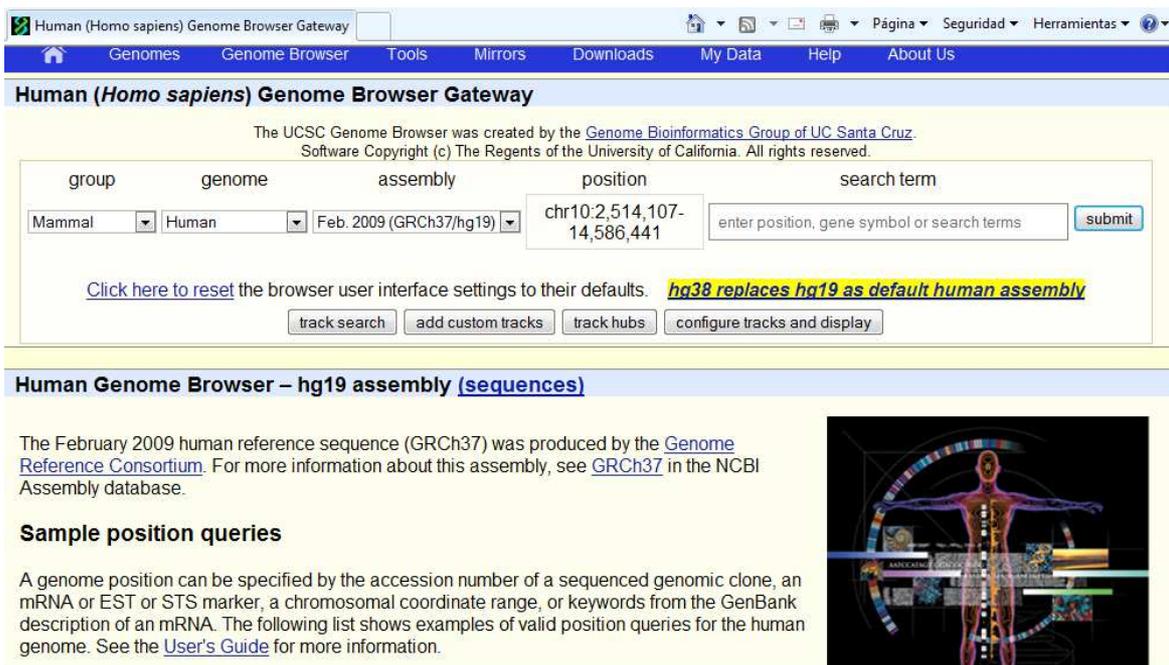
1ª) Deben usarse marcadores intragénicos, y marcadores extragénicos localizados a la menor distancia posible de donde se ubica/n la/s mutación/es responsables de la patología en cuestión, y flanqueándola/s por los dos extremos (regiones 5´ y 3´).

2ª) Han de tener un elevado índice de heterocigosidad para tener mayor probabilidad de que sean informativos en las familias.

La búsqueda se ha realizado utilizando herramientas bioinformáticas adecuadas, como la aplicación Genome Browser de UCSC Genome Bioinformatics

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

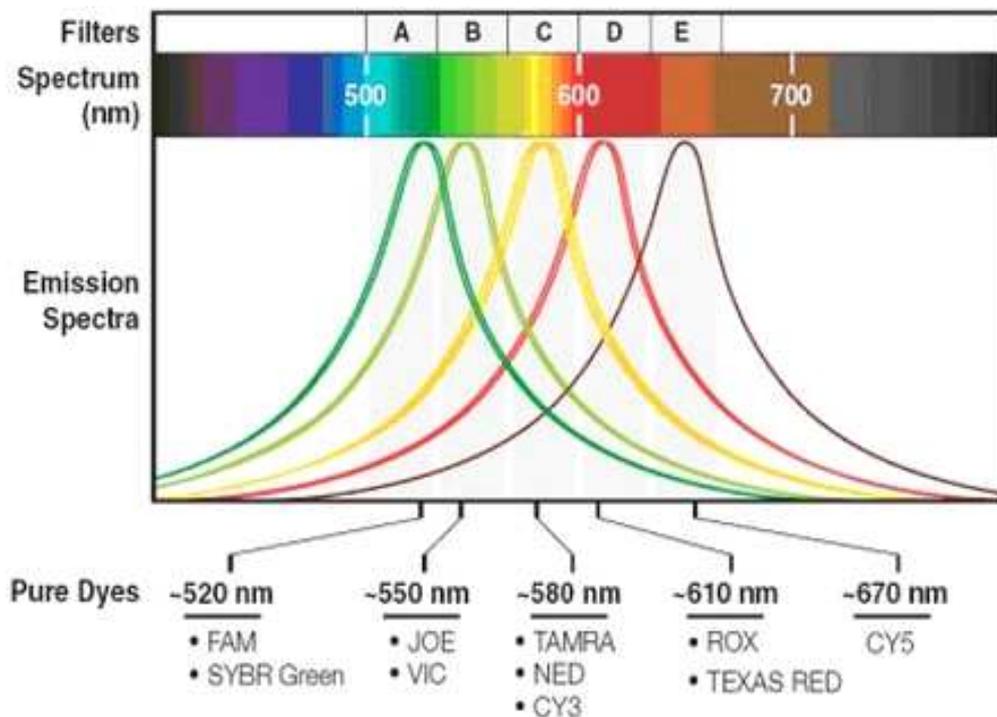
(<https://genome.ucsc.edu/>). Dicha aplicación es una herramienta de búsqueda que permite posicionar el gen de interés y localizar, entre otras cosas, los marcadores STRs intragénicos o flanqueantes, así como conducir mediante links a toda la información poblacional disponible de los mismos (posición genómica, frecuencia, alelos descritos, secuencia completa...).



4.6.2. Diseño de primers para las PCR múltiples.

El diseño de cebadores o primers para amplificar por PCR las regiones en las que se encuentran los STRs se ha realizado con el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Dado que para cada patología el objetivo inicial es amplificar simultáneamente todos los marcadores en una única reacción de PCR, en el diseño de los primers se ha tenido en cuenta que los rangos de tamaños de cada producto no fueran solapantes, para poder discriminar bien cada marcador. En caso de que los tamaños esperables de los productos de PCR para varios STRs fueran parecidos, se ha optado por marcar

los primers con fluorocromos diferentes que emitan a distinta longitud de onda.



4.6.3. Obtención de material de estudio para la optimización de los métodos

Para la optimización y puesta a punto de los distintos protocolos de diagnóstico molecular, se ha partido de blastómeras de preembriones supernumerarios resultantes de los ciclos de FIV, que fueron descartados para transferencia y explícitamente donados para la investigación.

Se realiza biopsia embrionaria y se entuban las blastómeras según el procedimiento explicado en el apartado anterior (4.5).

4.6.4. Lisis celular previa a protocolo de PCR

Para protocolos basados en PCR es preciso liberar el contenido de ADN del núcleo celular de la blastómera, por lo que se requiere un protocolo de lisis. Existen varios protocolos de lisis de blastómera, y en la Unidad se utilizan fundamentalmente dos de ellos.

4.6.4.1 Lisis alcalina

En este caso, el tampón de lisis tiene la siguiente composición:

Tampón para lisis alcalina

0.0077g de Ditioneitol (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$)

200 μ L de KOH o NaOH 1M

800 μ L de H₂O

Tras haber mantenido la blastómera entubada en el tampón de lisis a -80°C durante al menos media hora, los microtubos se someten 10 minutos a 65°C. Se ha de programar el procedimiento para proceder al protocolo de PCR inmediatamente después de la lisis.

4.6.4.2 Lisis enzimática

La composición del tampón es la siguiente:

Tampón para lisis enzimática

Proteinasa K(250mg/mL):SDS (17mM)=2:1

Al igual que en el caso anterior, tras al menos 30 minutos a -80°C, los microtubos que contienen las blastómeras se introducen en un termociclador y son sometidos a 37°C durante 90', seguidos de 15'a 96°C para inactivar la proteinasa K.

Como en el caso de la lisis alcalina, es necesario organizar el procedimiento para proseguir con el correspondiente protocolo de PCR inmediatamente tras la lisis enzimática.

4.6.5 Química general y programas para las PCR multiplex

El kit para llevar a cabo la PCR multiplex ha sido en todos los casos el QIAGEN

Multiplex PCR Kit. El kit contiene concentraciones pre optimizadas de Hot Start Taq DNA polimerasa, $MgCl_2$, más dNTPs y un buffer de PCR innovador especialmente desarrollado para garantizar el éxito de la PCR multiplex. La HotStarTaq DNA Polimerasa es una forma modificada de la Taq DNA polimerasa y no posee actividad polimerasa a temperatura ambiente, lo que previene la extensión de primers hibridados no específicamente a bajas temperaturas durante la preparación de la PCR y los ciclos iniciales de la PCR. La Hot Start Taq DNA polimerasa se activa al inicio de la reacción con un ciclo de calentamiento a $95^{\circ}C$ y 15 minutos. El Buffer Multiplex es un buffer especial que contiene una combinación optimizada de los cationes K^+ and NH_4^+ que alinean el ADN target y balancean sus cargas garantizando una mayor accesibilidad para el alineamiento de los primers. Además lleva un aditivo especial, Factor MP, el cual garantiza la concentración local de los primers en las inmediaciones del target, estabilizando solamente aquellos que se han alineado correctamente, garantizando la eficiente extensión de los primers por parte de la Hot Start, manteniendo una amplificación específica a lo largo de la PCR y promoviendo una alta relación de incorporación específica –no específica de los primers durante cada paso de alineamiento por cada ciclo de la PCR. Otro reactivo que incluye el kit es la Solución Q, que facilita la amplificación de ADN target difícil. Este reactivo único mejora las PCRs deficientes causadas por targets que tienen un alto contenido de estructuras secundarias o que son ricos en GCs. A diferencia de otros reactivos comúnmente utilizados para mejorar la PCR tales como el DMSO, la Q-Solution es usada a una sola concentración de trabajo, no es tóxica y la pureza de la PCR está garantizada.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

De manera general, el programa utilizado para las PCRs multiplex es el siguiente:

$96^{\circ}\text{C}-15' \rightarrow [(96^{\circ}\text{C}-\text{td}) \rightarrow (\text{Ta}-\text{ta}) \rightarrow (72^{\circ}\text{C}-\text{te})] \times 10 \rightarrow [(94^{\circ}\text{C}-\text{td}) \rightarrow (\text{Ta}-\text{ta}) \rightarrow (72^{\circ}\text{C}-\text{te})] \times \text{N} \rightarrow (60^{\circ}\text{C}-10') \rightarrow 4^{\circ}\text{C}-\infty$

td: Tiempo de desnaturalización (entre 30'' y 1')

Ta: Temperatura de *annealing* o hibridación (de 50°C a 63°C)

ta: Tiempo de annealing o hibridación (entre 30'' y 1')

te: Tiempo de extensión (entre 30'' y 2')

N: nº de ciclos

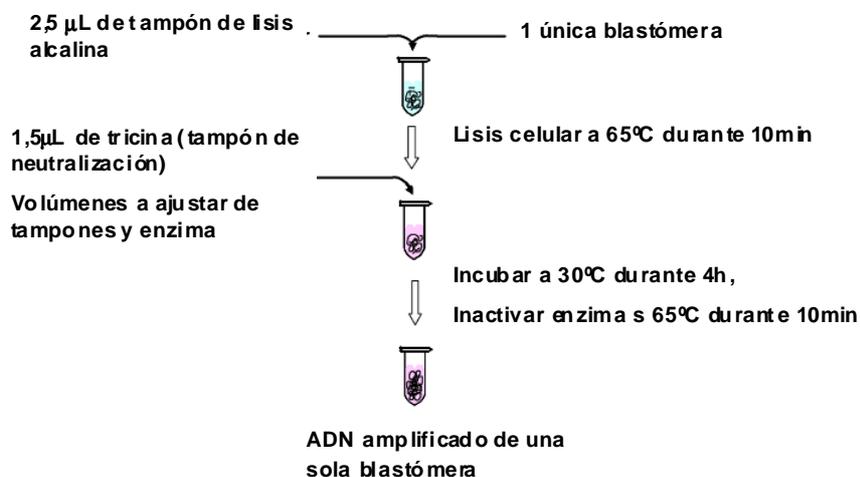
Una vez obtenidos los productos de PCR multiplex, se realiza una dilución (de 1:50 a 1:1000 dependiendo del protocolo), y se mezclan los productos diluidos con un marcador de peso molecular fluorescente (GenescanTM-500LIZ, Applied Biosystems), imprescindible para medir el tamaño de los alelos resultantes. En general se toma 1 µL de las distintas diluciones para mezclar con 0.05 µL de marcador de tamaño molecular y con 8.95 µL de agua.

A continuación se realiza en termociclador una desnaturalización de 5'a 95°C, y seguidamente los productos se someten a electroforesis capilar en secuenciador ABI Prism® 3730 (Applied Biosystems). Las condiciones generales de inyección son un voltaje de 2KV durante 10 segundos. La electroforesis se realiza dentro de cada uno de los capilares rellenos del polímero POP-7TM Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems) bajo 15KV de voltaje. El tiempo de la carrera suele ser de unos 40-50 minutos. El tampón de electroforesis utilizado es 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems).

Finalmente, el análisis de los distintos alelos se realiza con el programa Genemapper (Applied Biosystems).

4.7. AMPLIFICACIÓN DE GENOMA COMPLETO MEDIANTE LA TÉCNICA MDA

La técnica MDA es la técnica para WGA basada en el uso de la polimerasa del fago ø29 y random primers, que permite la obtención de gran cantidad de moléculas de ADN a partir de una cantidad de partida tan pequeña como la de una sola célula. Uno de los objetivos de este proyecto ha sido la puesta a punto de una variación del método desarrollado por Kumar (Kumar *et al.*, 2008) en el que se utiliza el kit Genomiphi (GE Healthcare), partiendo de las blastómeras previamente aisladas y preservadas a -80°C . Mediante este protocolo se pueden llegar a obtener del orden de 4 a 7 μg de ADN en aproximadamente 4 horas. Hemos modificado las condiciones de dicho método adaptándolas a las características de los protocolos de lisis celular que habitualmente utilizamos en el programa PGD de nuestra Unidad. El protocolo de partida propuesto fue el siguiente:



4.8. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DIRECTO SOBRE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE MDA SOBRE CÉLULA ÚNICA

4.8.1. Secuenciación automática sobre productos MDA

Como se mencionaba anteriormente, una de las principales limitaciones técnicas del PGD es la insuficiente cantidad de ADN de la blastómera para poder realizar la técnica de secuenciación automática, única técnica que conduce al diagnóstico molecular directo e inequívoco de mutaciones puntuales causantes de patologías. Como se explica en la sección de resultados, se han seleccionado una serie de loci distribuidos por todo el genoma, cuya secuenciación se realiza de rutina como parte de la Cartera de Servicios de la UGCGRMF, para testar la eficiencia de la secuenciación sobre los productos MDA.

-Básicamente, partiendo de los productos de MDA, se lleva a cabo una reacción de PCR específica para obtener un alto nº de copias de la región de interés. Las condiciones generales de PCR son las siguientes:

$95^{\circ}\text{C}-1' \rightarrow [(95^{\circ}\text{C}-15'') \rightarrow (\text{Ta}-15'') \rightarrow (72^{\circ}\text{C}-10'')] \times 25 \rightarrow 4^{\circ}\text{C}-\infty$

Ta: Temperatura de *annealing* o hibridación (de 50°C a 63°C)

En cuanto a la química de la reacción de PCR, se utiliza la polimerasa MyTaq (Bioline) y las condiciones generales son las que se detallan a continuación:

Reactivos	Cantidad
Producto MDA de partida	A optimizar
Tampón de MyTaq 10x (Bioline)	1X
Solución de cada primer (10µM)	0,2µM
MyTaq ADN polimerasa (Bioline)	1U
H2O csp	25µL

-Una vez finalizada la reacción de PCR se realiza una electroforesis para comprobar la correcta amplificación de cada fragmento y su tamaño, utilizando para ello de 2 a 5 µL. Se hace uso de la electroforesis convencional en geles de agarosa al 2 % p/v, teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml, y visualizados bajo luz ultravioleta con el sistema ChemiDoc™ MP System (Biorad, USA), utilizando como referencia los marcadores de peso molecular V y VI de Roche Diagnostics.

-Seguidamente se procede a la purificación enzimática del producto utilizando ExoSAP-IT (USB Corporation) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el producto purificado se lleva a cabo la reacción de secuenciación basada en el método de Sanger (Sanger y cols., 1992) utilizando el kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) según las condiciones de reacción y programa de amplificación que se detallan:

96°C-3'→[(96°C-10'')→(50°C-5'')→(60°C-4'')]x35→4°C-∞

Reactivos	Cantidad
Producto de la PCR purificado	2µl
Tampón de Secuenciación 5x (Applied Biosystems)	2,5µl
Solución de primer (10 µM)	0,5µl
BigDye® Terminator (Applied Biosystems)	0,5µl
H2O csp	10µl

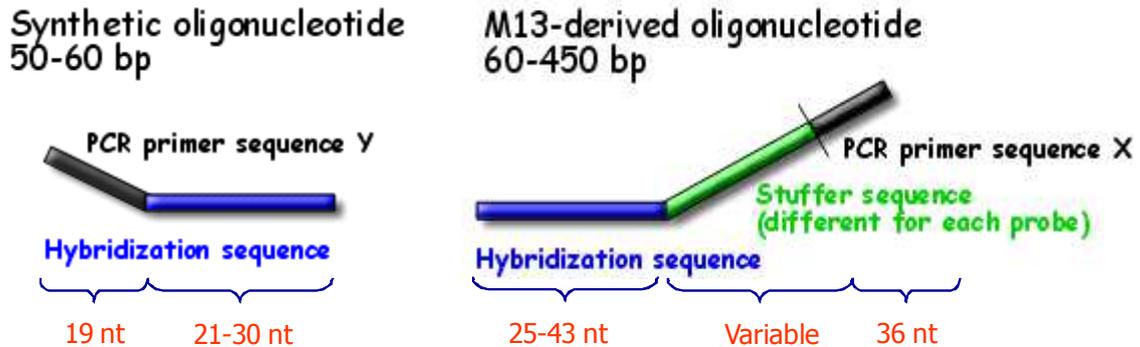
-A continuación, el producto de la reacción de secuenciación se purifica mediante el empleo de placas Performa® DTR V3 96-Well Short Plate (EdgeBio, Maryland USA), que contienen una matriz de filtración en gel hidratado que asegura la eliminación de aquellos reactivos residuales de bajo peso molecular

que quedan tras la reacción de secuenciación. El producto purificado se introduce en el correspondiente dispositivo del secuenciador para proceder a la inyección en el secuenciador ABI Prism® 3730 de 48 capilares (Applied Biosystems). Las condiciones generales de inyección son un voltaje de 1,5 KV durante 15 segundos, aunque en función del producto a secuenciar se pueden modificar los parámetros de tiempo y voltaje. La electroforesis se realiza con polímero POP-7™ bajo 9KV de voltaje y alrededor de 95 minutos (el tiempo de la carrera puede variar en función del tamaño de los productos). El tampón de electroforesis utilizado es 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems).

4.8.2. MLPA sobre productos MDA

La técnica MLPA (*Multiple Ligation Probe Amplification*, Amplificación de sondas tras ligación múltiple) se suele utilizar para la detección de variación de número de copias como deleciones o duplicaciones de regiones genómicas concretas. Por ejemplo, existen kits comerciales ya preparados y que están diseñados para analizar genes concretos que están implicados en enfermedades hereditarias. En la mayoría de los casos consisten en una colección de sondas, cada una de ellas específicas para un exón de un gen. Cada sonda MLPA consiste en un oligonucleótido sintético corto, y un oligonucleótido largo derivado del fago M13. El oligonucleótido corto de cada sonda contiene una secuencia diana específica (21-30 nt) en el extremo 3', y una secuencia común de 19 nt idéntica a la del primer marcado, en el extremo 5'. En cuanto al oligonucleótido largo, contiene una secuencia diana específica de 25-43 nt en el extremo 5', una secuencia de 36 nt complementaria a la del primer de PCR no marcado y que es común a todas las sondas en el extremo 3', y una secuencia de relleno de longitud

variable en medio (stuffer sequence).



El programa general y química para MLPA es el siguiente:

98°C-5' → 25°C-t₁ → 95°C-1' → 60°C-16h → 54°C-15' → 98°C-5' → 60°C-t₂ →
 [(95°C-30'') → (60°C-30'') → (72°C-60'')]x33 → 72°C-20' → 4°C-∞

t₁: tiempo necesario para añadir el mix de sondas a cada tubo de reacción

t₂: tiempo necesario para añadir el mix de reactivos de PCR a cada tubo de reacción.

Reactivos	Cantidad
ADN (100ng/μL)	1 μl
Agua	4 μl
Mix de sondas hibridación (MRC Holland)	1,5 μl
Buffer de hibridación (MRC Holland)	1,5 μl
Ligasa 65 (MRC Holland)	1 μl
Buffer 1 ligación (MRC Holland)	3 μl
Buffer 2 ligación (MRC Holland)	3 μl
Mix PCR (MRC Holland)	2 μl
SALSA polimerasa (MRC Holland)	0.5 μl

El procedimiento tiene varios pasos:

1º) Se toma el ADN que se quiere estudiar, en este caso una cantidad a optimizar del producto MDA, y se desnaturaliza a 98°C durante 5 minutos. Esto

garantiza que la doble cadena de ADN se ha separado completamente y está en forma de cadena simple para permitir que las sondas tengan acceso.

2º) Se añaden las sondas MLPA y se mantienen incubando a 60º durante 16 horas aproximadamente. Este proceso permite que se lleva a cabo en un termociclador, permite que cada uno de los dos oligonucleótidos que forman parte de cada una de las sondas hibride o se pegue a la región específica del ADN.

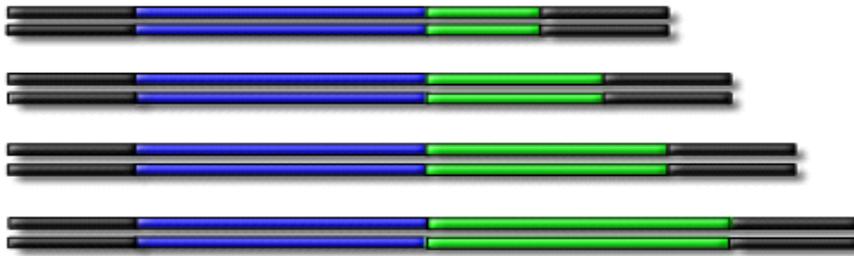


3º) Tras las 16 horas de ligación, se añade una enzima ligasa en un buffer apropiado, y se mantiene a 54ºC durante 15 minutos. Lo que va a hacer la enzima ligasa es como su propio nombre indica, unir o ligar los dos oligonucleótidos que constituyen cada sonda. Para que se dé la ligación, es imprescindible que los dos oligonucleótidos estén perfectamente unidos al ADN en estudio, y por eso la etapa previa de hibridación es clave y se lleva a cabo durante ese largo tiempo.



4º) Transcurridos los 15 minutos de ligación se procede a inactivar la ligasa por calor. A continuación se añade un mix que contiene los primers de PCR, dNTPs y la enzima polimerasa para conseguir la amplificación de los productos de

ligación. Como uno de los primers está marcado con un fluorocromo, se pueden detectar los productos de PCR mediante electroforesis capilar en secuenciador automático. Todas las sondas ligadas tienen idéntica secuencia en sus extremos 5' y 3', lo que permite la amplificación simultánea de las mismas en una PCR que contiene sólo una pareja de primers. Cada sonda da lugar a un producto de amplificación de tamaño único y diferente al de las demás entre 130 y 480 pb. El jugar con el tamaño de estos productos de manera que cada uno de ellos sea distinto y analizable, se consigue gracias a la secuencia de relleno del oligonucleótido largo.



Es importante que en cada experimento se incluya muestras de ADN control que estén perfectamente caracterizadas, es decir, para las que nosotros sepamos exactamente el nº de copias que tiene para la región genómica analizada. Finalmente, los datos se analizan comparando los datos que obtengamos para cada ADN problema con los datos que tenemos para los ADN control, en otras palabras, normalizando. La observación de diferencias en la altura o el área de los picos con respecto a los patrones control, indicaría un nº de copias diferente al normal. Esta técnica es óptima para el diagnóstico molecular de varias de las enfermedades monogénicas incluidas en la cartera de Servicios de PGD de la

UGCGRMF de HUVR, tales como Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB) o Atrofia Medular Espinal (AME) (Fig.M1).

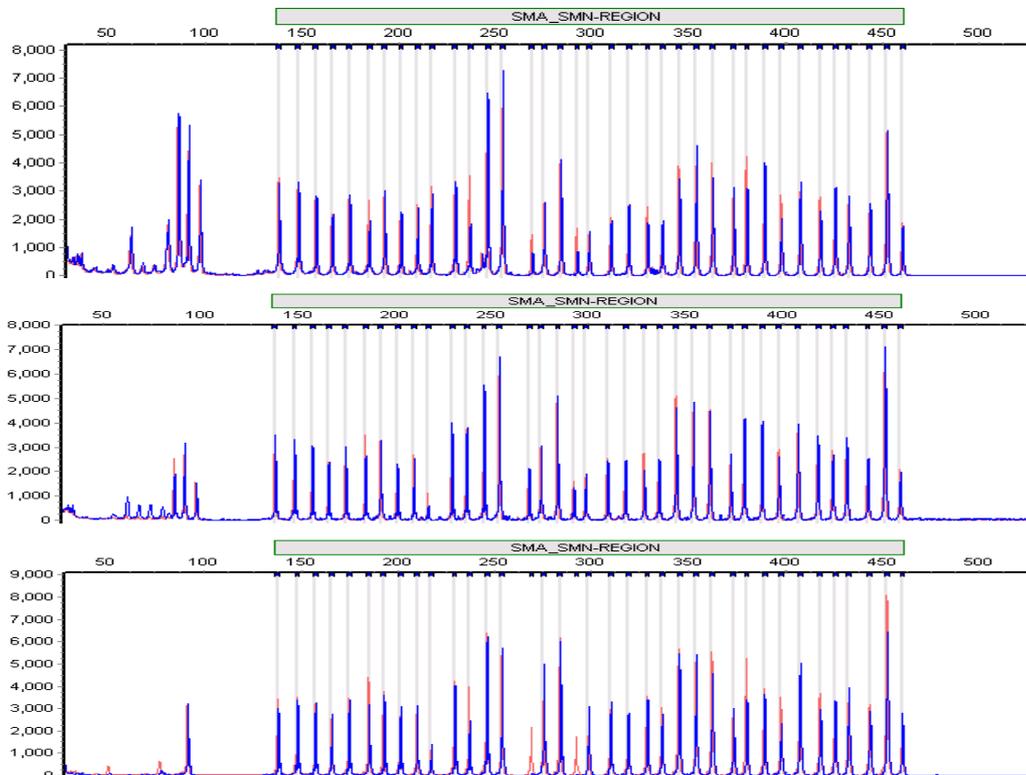


Fig. M1: Plot de MLPA aplicado al diagnóstico molecular de AME. AME es una enfermedad autosómica recesiva y en la mayoría de los casos se debe a una delección en homocigosis de al menos los exones 7 y 8 del gen *SMN1*.

- 1) En el primer plot se observa que para algunas posiciones en concreto, los picos azules (correspondientes a un individuo problema) tienen la mitad de altura que los picos rojos (correspondientes a un control con 2 copias del gen *SMN1*). Esto significa que nuestro individuo a testar tiene una hemidosis de las regiones para las que hibridan esas sondas, lo que concuerda con un diagnóstico de portador asintomático de AME.
- 2) En el segundo plot, no se observan diferencias entre las alturas de los picos azules y los rojos, lo que indica que nuestro individuo problema porta dos copias de *SMN1*, es decir, no es portador de AME.
- 3) Finalmente, en el tercer plot hay posiciones con completa ausencia de señal azul, lo que significa que el individuo problema tiene 0 copias de *SMN1* y es por tanto afecto de AME.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

RESULTADOS

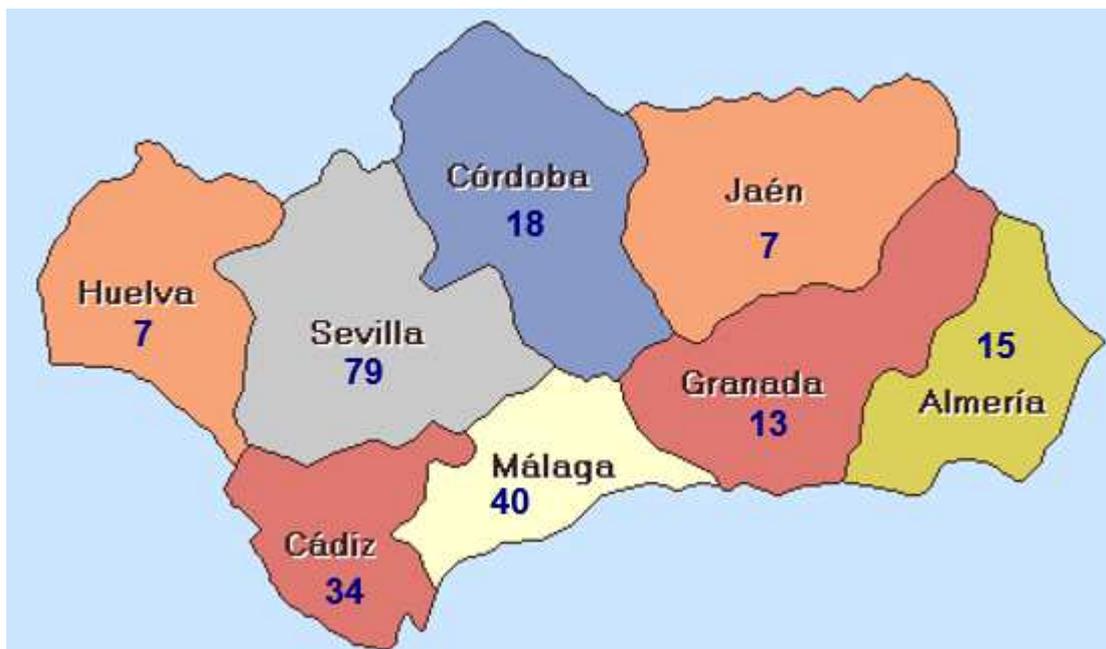
5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS CLÍNICOS DEL PROGRAMA DE PGD

Durante los 10 años de programa de PGD, se han realizado en esta Unidad 390 ciclos para las distintas enfermedades monogénicas incluidas en la cartera de servicios.

Estos ciclos se les han realizado a 216 paciente s procedentes en su mayoría de las distintas provincias andaluzas (Figura R1).

Fig. R1. Distribución de pacientes según provincia de derivación



También hemos realizado ciclos de PGD - HLA a pacientes derivados de otras Comunidades Autónomas, concretamente 2 pacientes de Extremadura y 1 de las Islas Canarias.

La media de edad de las pacientes ha sido de 32 años (rango 20-40).

Se han realizado ciclos de PGD para todas las enfermedades incluidas en el Decreto 156/2005 y su posterior ampliación (Tabla R1). Aún no se ha podido realizar ningún ciclo para las enfermedades incluidas en agosto 2015.

Tabla R1. Distribución de nº de pacientes según las distintas enfermedades.

Enfermedades AD	Nº	Enfermedades ligadas a X R	Nº	
Enfermedad de Steinert	28	Hemofilia A	33	
Corea de Huntington	26	DM Duchenne	21	
Polip. adenomatosa familiar	11	DM Becker	4	
Síndrome de Marfan	3	Hemofilia B	4	
Machado Joseph (SCA3)	2	Síndrome de Morris	3	
Enfermedades AR	Nº	Enfermedad de Bruton	2	
Fibrosis quística	27	Síndrome de Opitz	1	
Atrofia muscular Espinal	14	Hidrocefalia lig.X	1	
Enfermedades Lig X D		Enfermedad de Lowe	1	
Síndrome de X-frágil	12	Enfermedad de Duncan	1	
Síndrome de Alport lig X	4	Retinosis Pigmentaria lig X	1	
PGD + Tipaje HLA		Nº	Agammaglobulinemia lig X	1
Talasemia Mayor + HLA	5	IDSC lig X	1	
Tipaje HLA	2	Alfatasemia lig X	1	
Shwachman Diamond + HLA	1	Enfermedad de Menkes	1	
Déficit de ADA + HLA	1	Wiskott Aldrich	1	
Granulomatosis lig. X + HLA	1	Pellizaeus Merzbacher	1	

Los resultados globales del programa de PGD se detallan en la tabla R2.

Tabla R2. Resultados globales del programa

PROGRAMA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTATORIO Octubre 2005 - Septiembre 2015	
Número de parejas	216
Ciclos iniciados	438
Ciclos puncionados	390
Media de MII recuperados	10.46
Media de ovocitos fecundados	6.4
Ciclos con biopsia	349
Embriones biopsiados	1937
Media de embriones biopsiados	5.1
Embriones con diagnóstico	1751
Tasa de informatividad	90.4%
Ciclos informativos	344
Ciclos con transferencia en fresco	240
Tasa de transferencia en fresco	61.5%
Ciclos de TEC iniciados	56
Ciclos de TEC transferidos	54
Gestaciones bioquímicas totales (fresco + congelado)	107 (83+24)
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	68 (52+16)
Tasa de implantación	17.48%
Tasa de gestación clínica por pareja	31.48%
Partos *(fresco+congelado)	54 (42+12)
Tasa de parto por pareja	25%

*Para esta estadística se han incluido como parto las 6 gestaciones evolutivas pendientes de terminar (todas han superado el primer trimestre).

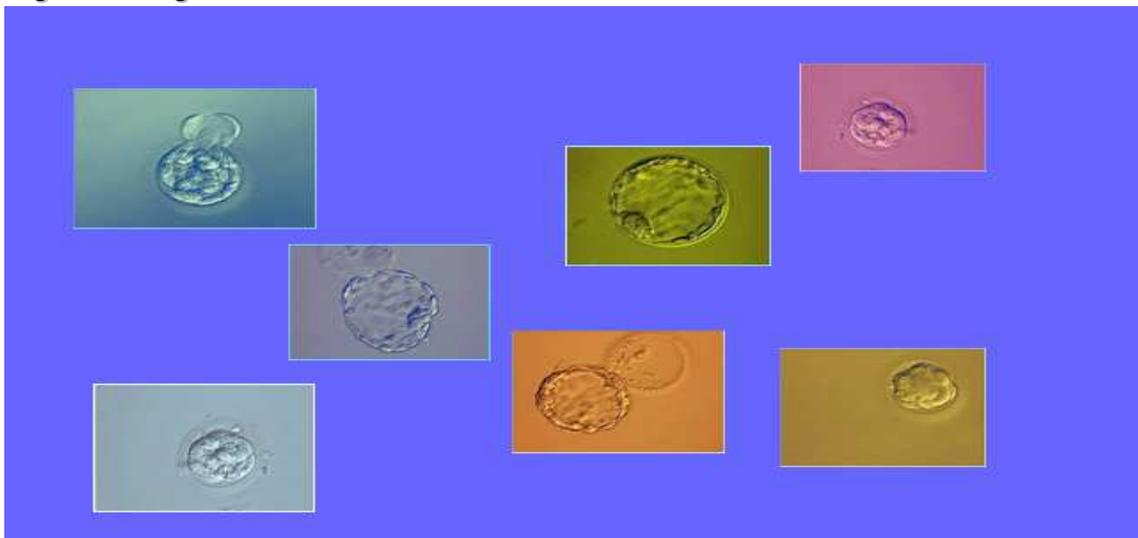
Ha habido 150 ciclos sin transferencia. Las causas principales han sido: 41 ciclos no llegaron a biopsia, 23 ciclos de HLA sin embriones sanos y HLA compatibles, 12 por riesgo de SHO, 5 sin diagnóstico a tiempo que se vitrificaron, y los 69 restantes por no tener embriones sanos para poder transferir. Destacar que de los 12 por riesgo de SHO se han conseguido 7 gestaciones clínicas tras TEC y 5 partos.

El número máximo de embriones transferidos (Figura R2) por ciclo ha sido de dos, con una media de 1.56 y con una tasa de implantación global de 17.48% (16.7% para transferencias en fresco y 20.4% para TEC) (Tabla R3)

Tabla R3. Tasa de implantación global

Ciclos en fresco		Ciclos de congelados	
Embriones biopsiados	1926		
Embriones informativos	1751		
Embriones transferidos	376	Embriones transferidos	93
Sacos gestacionales	63	Sacos gestacionales	19

Fig. R2 Imágenes de blastocistos transferidos en la UGCGRMF



En cuanto a los resultados obstétricos y neonatales, se han producido 48 partos y 6 están aún pendientes.

Han nacido hasta el momento (septiembre 2015) 58 bebés, 33 niñas y 25 niños, y quedan 8 pendientes de nacer en los próximos meses (Tabla R4). La tasa de parto múltiple ha sido del 22.2% (incluidos los pendientes).

De todos los nacimientos uno ha sido de PGD-HLA (Figura R3) y otro de tipaje HLA.

El 44% de los partos ha sido parto vaginal, y el resto cesárea.

Tabla R4. Partos y recién nacidos según ciclos de transferencia en fresco o en congelado

Ciclos en fresco		Ciclos de congelados	
Partos	38 + 4 pendientes	Partos	10 + 2 pendientes
Recién nacidos	45 + 5 pendientes	Recién nacidos	13 + 3 pendientes



Fig R3. Imágenes obtenidas del primer parto conseguido de PGD-HLA

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

A todas las pacientes se les ofreció DP tras el alta. Solo 3 optaron por realizarlo. Hasta el momento no se han detectado errores de diagnóstico ni en los DP realizados ni en ningún recién nacido. Tras el parto los progenitores solos han notificado un caso de hernia umbilical y otro de riñón pélvico.

La distribución de nacidos según las distintas enfermedades para las que se realizó PGD se detalla en la siguiente Tabla R5.

Tabla R5. Partos y recién nacidos por enfermedades

Enfermedades	Partos	Recién nacidos
Hemofilia A y B	13+1 pdte	14+1
Enfermedad de Steinert	8+1 pdte	9+1 pdte
Distrofia Muscular de Duchenne	7	8
Fibrosis Quística	6+1 pdte	9+1 pdte
Corea de Huntington	3	4
Síndrome de X frágil	3	5
Atrofia Medular Espinal	2+1 pdte	2+2 pdte
PGD-HLA y tipaje HLA	2	2
Distrofia Muscular de Becker	2	3
Síndrome de Alport ligado a X	1+1pdte	1+1
Enfermedad de Lowe	1	1
Poliposis Adenomatosa Familiar	1 pdte	2 pdtes

Debido a la experiencia obtenida hasta el año 2011 y basándonos en distintas publicaciones (Goossens V et al., 2008), se decidió a principios de 2011 realizar la biopsia embrionaria extrayendo sistemáticamente solo una célula al

embrión, para evitar posibles efectos negativos en su desarrollo. Esto fue posible también en los casos de PGD-HLA a partir de la introducción de MDA.

5.2. APLICACIÓN DE FISH A LA DETERMINACIÓN DE SEXO EN EMBRIONES PROCEDENTES DE PAREJAS CON ENFERMEDADES LIGADAS AL CROMOSOMA X

Los primeros ciclos llevados a cabo en el programa PGD de nuestra Unidad fueron ciclos aplicados a la determinación de sexo en embriones posiblemente portadores de enfermedades ligadas al cromosoma X. Desde su puesta a punto, este método se ha empleado en un total de 50 ciclos de PGD sobre 27 parejas (a partir del año 2007 se empezó a realizar mediante PCR).

Los resultados clínicos se muestran en la siguiente tabla (Tabla R6).

Tabla R6. Resultados clínicos de PGD para enfermedades ligadas a X mediante FISH

PGD para enfermedades ligadas al cromosoma X mediante FISH	
Número de parejas	27
Edad media (Rango)	31.5 (20-39)
Ciclos puncionados	50
Ovocitos MII recuperados	390
Ovocitos fecundados	354
Ciclos con biopsia	48
Embriones biopsiados	253
Embriones con diagnóstico	211

Ciclos informativos	47
Ciclos con transferencia en fresco	33
Tasa de transferencia en fresco	66%
Ciclos de TEC iniciados	4
Ciclos de TEC transferidos	4
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	10 (9/1)
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	7 (6/1)
Tasa de implantación	14%
Tasa de gestación clínica por pareja	25.9%
Partos Totales (fresco + congelado)	5 (4/1)
Recién nacidos	5
Tasa de parto por pareja	18.5%

5.3. OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DE PROTOCOLOS BASADOS EN PCR MÚLTIPLE PARA PGD DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS.

5.3.1. Optimización del protocolo general para PGD de Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH, OMIM#143100) es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizado por movimientos coreicos involuntarios, trastornos conductuales y psiquiátricos, y demencia. Se estima que la prevalencia en la población caucásica es de 1/10.000-1/20.000. Tiene una herencia autosómica dominante y está causada por una expansión de repeticiones del triplete CAG en el exón 1 del gen *HTT* (OMIM*613004). Los alelos con 6 a 26 repeticiones CAG son considerados normales, mientras que

los alelos con >35 repeticiones son alelos patológicos. El rango entre 27 y 35 repeticiones es considerado un rango intermedio, es decir, existe una probabilidad del 6-10% de que estos alelos se expandan en la siguiente generación.

Hemos optimizado el protocolo de PCR multiplex en nuestra Unidad incluyendo el análisis molecular directo de la expansión responsable de EH, junto con el análisis molecular indirecto de otros 3 marcadores STR (Figuras R4 y R5). Los marcadores *STR* habían sido previamente reportados por Moutou (Moutou *et al.* 2004), y el método completo optimizado por nuestro grupo está publicado (Peciña *et al.*, 2010). Tras aplicación del protocolo de lisis alcalina sobre las blastómeras, se sigue el protocolo de PCR multiplex cuyas condiciones se especifican a continuación:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	12.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	5 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	2.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	2.5 µL
H2O csp	25 µL

PGD-EH file:

95°C-15' → [(96°C-30'') → (63°C-1') → (72°C-1'30'')]x10 → [(94°C-30'') → (63°C-1') → (72°C-1'30'')]x30 → (60°C-15') → 4°C-∞

Los resultados clínicos de PGD para EH se detallan a continuación (Tabla R7).

Tabla R7: Datos clínicos de los ciclos de PGD-EH en HUVR

PGD para Enfermedad de Huntington	
Número de parejas	26
Edad media (Rango)	32.3 (26-39)
Ciclos puncionados	51
Ovocitos MII recuperados	486
Ovocitos fecundados	302
Ciclos con biopsia	45
Embriones biopsiados	242
Embriones con diagnóstico	225
Ciclos informativos	44
Ciclos con transferencia en fresco	29
Tasa de transferencia en fresco	56.8%
Ciclos de TEC iniciados	3
Ciclos de TEC transferidos	3
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	7 (6/1)
Gestaciones clínicas totales (fresco / congelado)	4 (3/1)
Tasa de implantación	12%
Tasa de gestación clínica por pareja	15.3%
Partos totales (fresco / congelado)	3 (2/1)
Recién nacidos (fresco / congelado)	4 (3/1)
Tasa de parto por pareja	11.5%

Figura R4

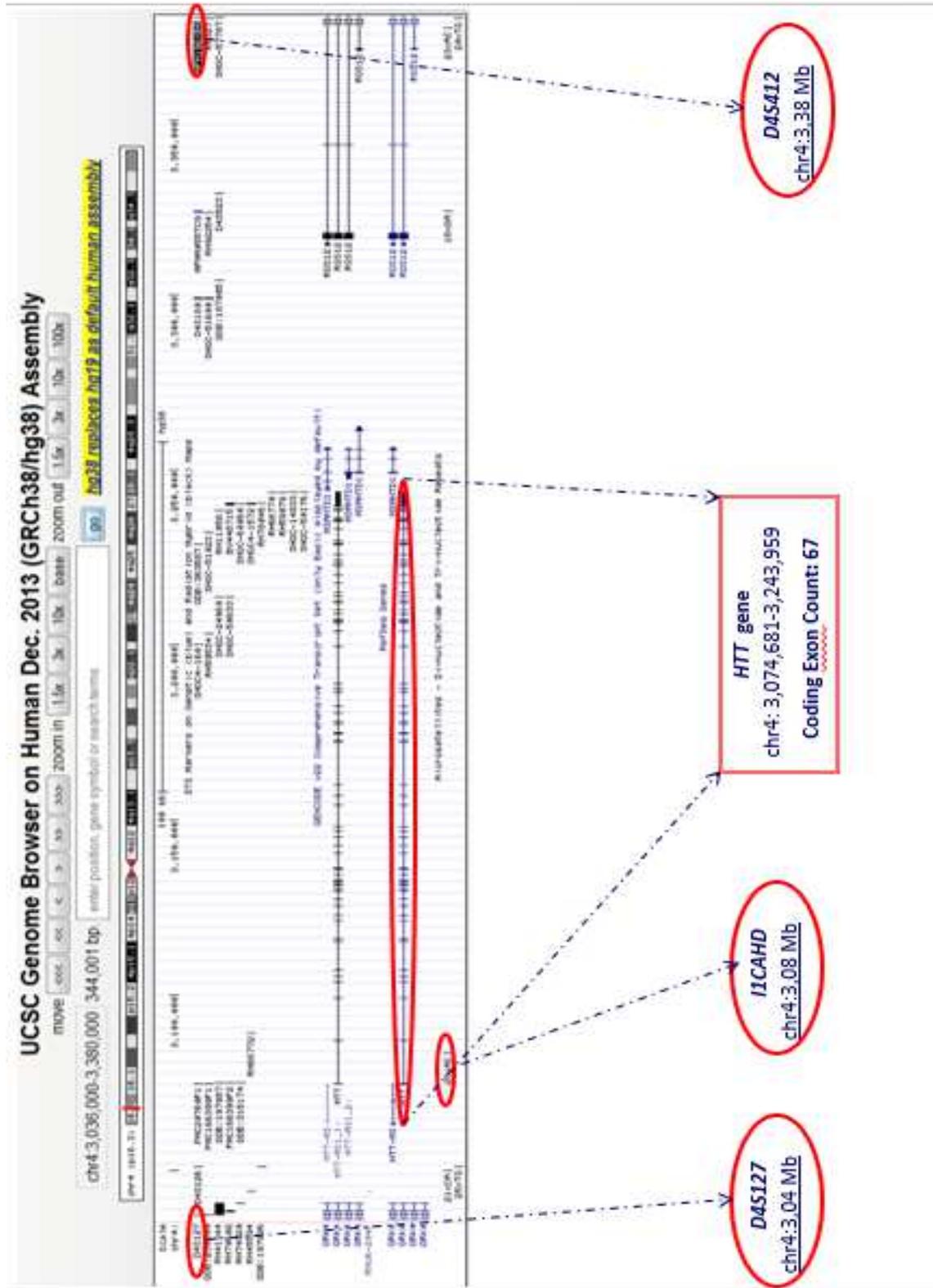
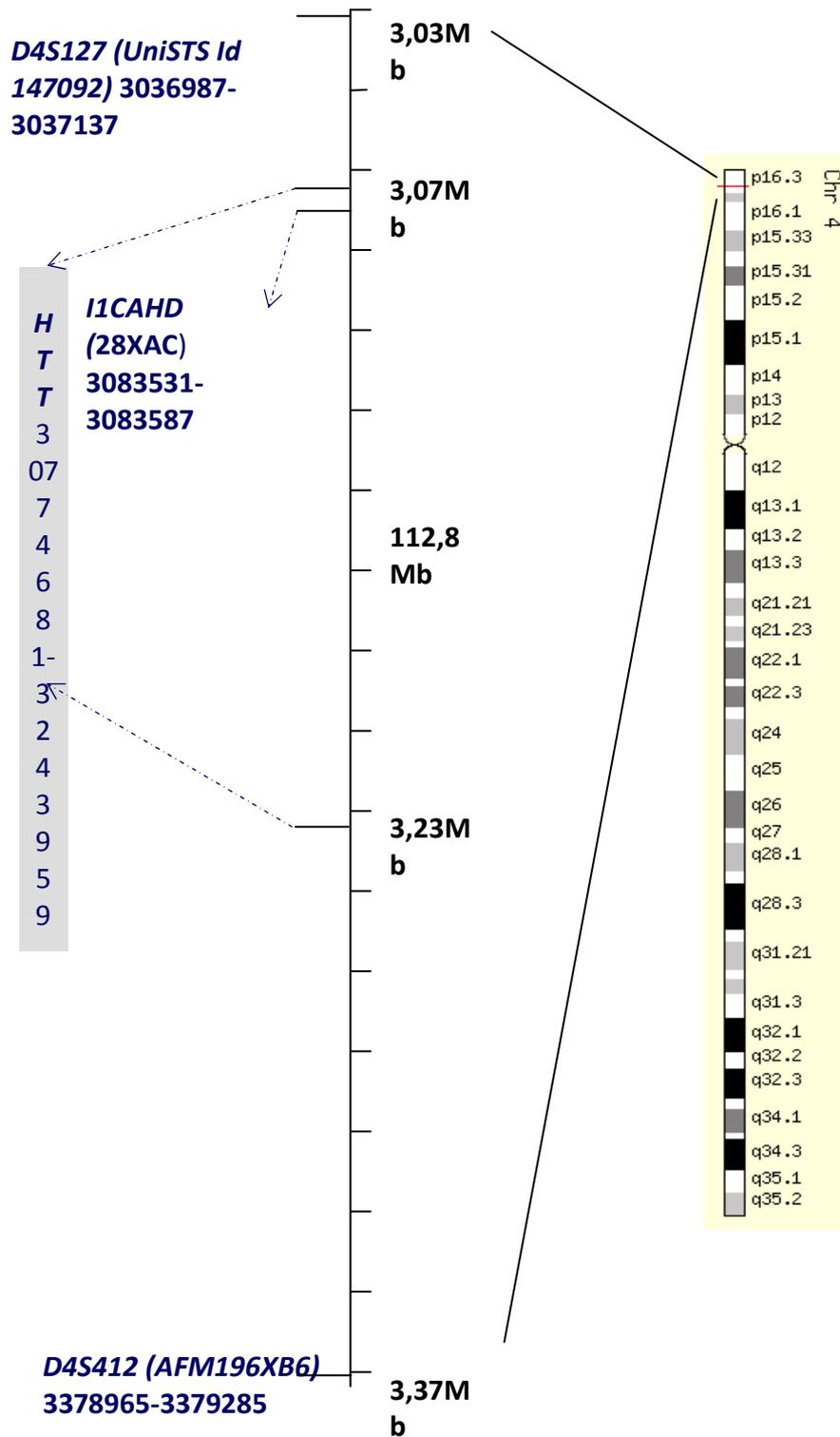


Figura R5



5.3.2. Optimización del protocolo general para PGD de Fibrosis Quística

La fibrosis quística (FQ, OMIM#219700) es un trastorno genético caracterizado por la producción de sudor con un alto contenido en sales y de secreciones mucosas con una viscosidad anormal. Es el trastorno genético más común entre los niños caucásicos. Se desconoce la prevalencia exacta en Europa, pero se estima que se sitúa entre 1/8.000 y 1/10.000 individuos. Es una enfermedad crónica y generalmente progresiva, que suele aparecer durante la infancia temprana o, más raramente, en el nacimiento (íleo meconial). La FQ es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *CFTR* (OMIM*602421). Se han identificado más de 1250 mutaciones. Un 70% de los casos están causados por la mutación $\Delta F508$, mientras que otras 30 mutaciones explicarían otro 20% más.

Dado que la mutación $\Delta F508$ es con diferencia la más prevalente en nuestra población, y un altísimo porcentaje de las parejas incluidas en el programa la portan, hemos adaptado el protocolo de PCR multiplex de Moutou (Moutou *et al.*, 2002), incluyendo el análisis molecular directo de esta mutación, junto con el análisis molecular indirecto de otros 3 marcadores STR intragénicos (Figuras R6 y R7). Tras aplicación del protocolo de lisis enzimática sobre las blastómeras, se sigue el protocolo de PCR multiplex como se explica a continuación:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 μ L
Solución Q 5x (QIAGEN)	-
Solución de primers (2 μ M de cada uno)	1.5 μ L
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 μ L
H2O csp	15 μ L

PGD-FQ file:

95°C-15' → [(96°C-30') → (61.5°C-1') → (72°C-1')]x10 → [(94°C-30') → (61.5°C-1') → (72°C-1')]x30 → (60°C-15') → 4°C-∞

No obstante encontramos que había un número considerable de parejas cuyos marcadores STRs incluidos en este método no eran informativos. Por ello también optimizamos un protocolo de PCR multiplex empleando marcadores extragenéticos (*D7S523*, *D7S486*, *D7S480* y *D7S490*, (Dreesen *et al.*, 2000), (Figuras R6 y R7), con lisis alcalina y bajo las siguientes condiciones:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	3 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	1.5 µL
H2O csp	15 µL

PGD-FQb file:

95°C-15' → [(96°C-1') → (55°C-1') → (68°C-1')]x10 → [(94°C-1') → (55°C-1') → (68°C-1')]x30 → (60°C-15') → 4°C-∞

A continuación se detallan los resultados clínicos de PGD para FQ (Tabla R8).

Tabla R8. Datos clínicos de los ciclos de PGD-FQ en HUVR

PGD para Fibrosis Quística	
Número de parejas	25
Edad media (Rango)	33 (22-40)
Ciclos puncionados	44
Ovocitos MII recuperados	373
Ovocitos fecundados	249
Ciclos con biopsia	40
Embriones biopsiados	197
Embriones con diagnóstico	189
Ciclos informativos	40
Ciclos con transferencia en fresco	34
Tasa de transferencia en fresco	77.3%
Ciclos de TEC iniciados	6
Ciclos de TEC transferidos	6
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	12 (9/3)
Gestaciones clínicas totales (fresco / congelado)	8 (5/3)
Tasa de implantación	16.6%
Tasa de gestación clínica por pareja	32%
Partos totales (fresco / congelado)	6 (4/2)
Recién nacidos (fresco / congelado)	9 (6/3)
Tasa de parto por pareja	24%

FIGURA R6

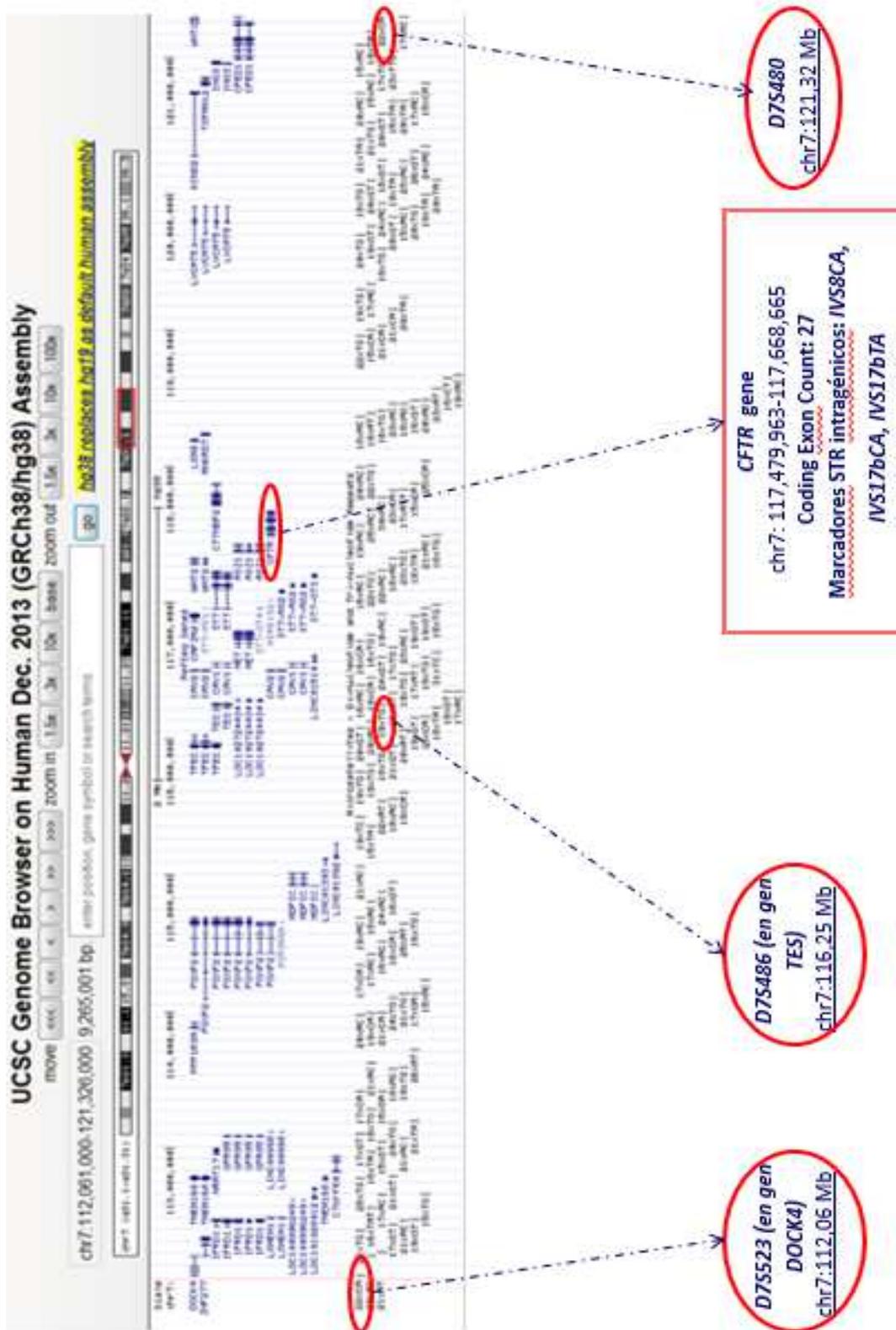
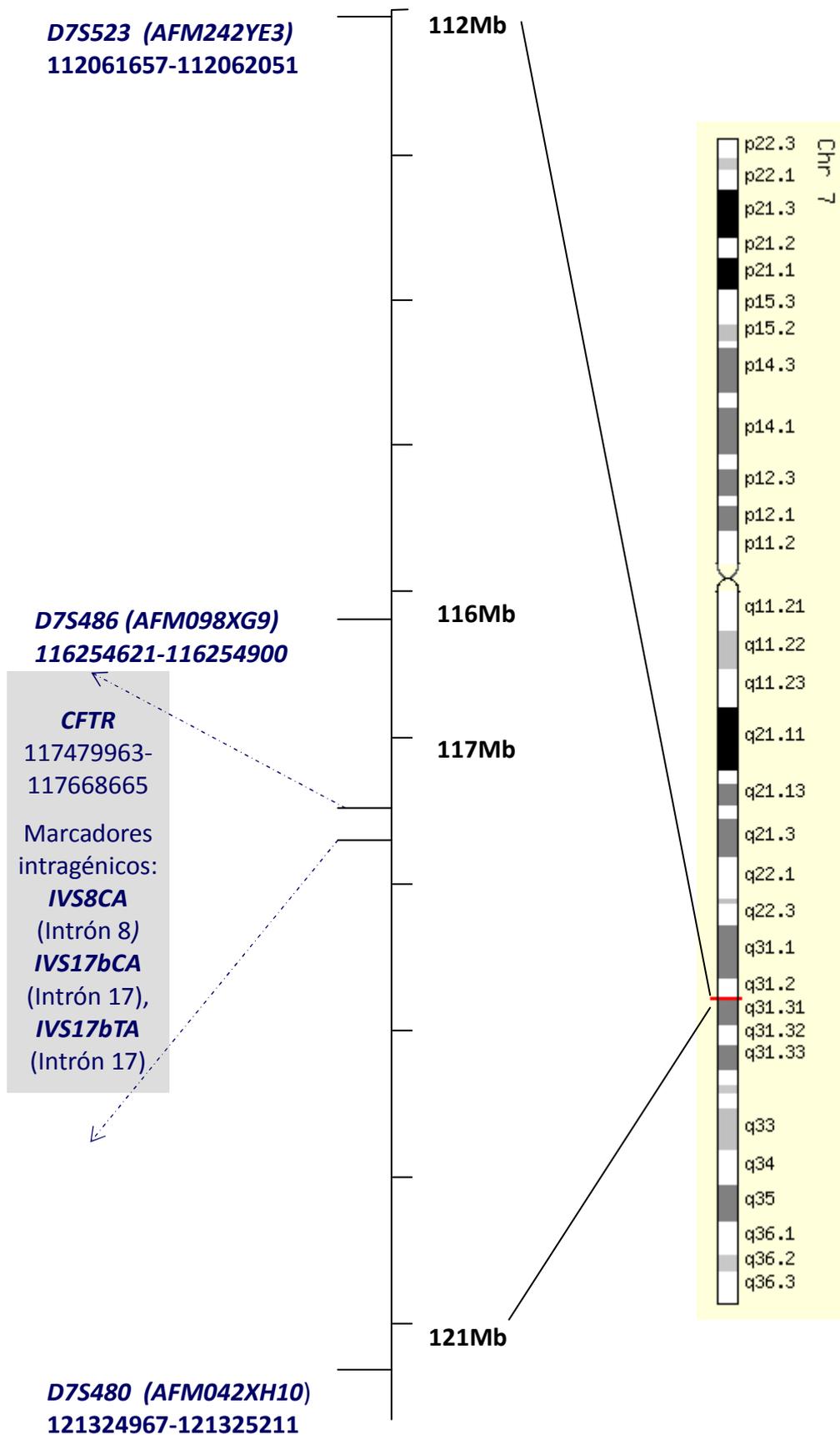


FIGURA R7



5.3.3. Optimización del protocolo general para PGD de enfermedades ligadas al cromosoma X

A partir del año 2007 se empezó a realizar sexado para las enfermedades ligadas al cromosoma X mediante PCR. Para la DMD/DMB y para la Hemofilia A se diseñó un protocolo de diagnóstico específico.

5.3.3.1. Optimización del protocolo general de determinación de sexo de embriones para PGD de enfermedades ligadas al cromosoma X

Dado que existe un altísimo número de patologías de herencia recesiva ligada al cromosoma X, en los comienzos del programa PGD por razones costo-efectivas se decidió optimizar un método basado en PCR para la determinación de sexo de los embriones, aplicable al PGD de este tipo de patologías. Este método de sexado mediante PCR sustituyó al FISH que se utilizaba inicialmente. Consiste en la utilización de marcadores específicos de ciertas regiones de los cromosomas X e Y (SRY, ZFY, AMELX y AMELY) (Handyside *et al.*, 1990; Sullivan *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Francès *et al.*, 2007).

Las condiciones de amplificación de esos marcadores se detallan a continuación.

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	3 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	-
H2O csp	15 µL

PGD-SEXO file:

95°C-15 →[(94°C-30´)→(58°C-1´)→(72°C-1´)]x40→ (60°C-15´)→4°C-∞

Este protocolo actualmente se emplea para ciclos de PGD de distintas enfermedades ligadas a X poco frecuentes, tales como el síndrome de Alport ligado a X (OMIM#301050), retinosis pigmentaria ligada a X (varios OMIM), o hemofilia B (OMIM#306900) (Fernández *et al.*, 2015) entre otras (Tabla R1).

Posteriormente, cuando se optimizó el método multiplex para el PGD de las distrofinopatías (apartado 5.3.3.2), se combinó el uso de los STRs de dicho método con el sexado como método de control, puesto que la temperatura de hibridación de todos los primers es la misma.

En la tabla Tabla R9 se especifican los resultados clínicos.

Tabla R9. Resultados clínicos de PGD para enfermedades ligadas a X mediante sexado por PCR

PGD para enfermedades ligadas al cromosoma X mediante sexado por PCR	
Número de parejas	15
Edad media (Rango)	32.5 (23-40)
Ciclos puncionados	22
Ovocitos MII recuperados	260
Ovocitos fecundados	150
Ciclos con biopsia	22
Embriones biopsiados	113

Embriones con diagnóstico	103
Ciclos informativos	22
Ciclos con transferencia en fresco	10
Tasa de transferencia en fresco	45.4%
Ciclos de TEC iniciados	6
Ciclos de TEC transferidos	6
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	9 (5+4)
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	5 (3+2)
Tasa de implantación	22.2%
Tasa de gestación clínica por pareja	33.3%
Partos Totales (fresco + congelado)	4 (3+1)
Recién nacidos	5 (4+1)
Tasa de parto por pareja	26.6%

5.3.3.2. Optimización del protocolo general para PGD de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker

Las distrofinopatías o distrofias musculares de Duchenne y Becker (DMD, OMIM#310200 y DMB, OMIM#300376) son enfermedades neuromusculares caracterizadas por atrofia y debilidad musculares progresivas, como consecuencia de la degeneración de los músculos esqueléticos, lisos y cardíacos. La DMD es más frecuente, temprana y grave que la DMB. La incidencia de la DMD es de 1 por cada 3.300 nacimientos de varones. La incidencia de la DMB varía entre 1 por cada 18.000 y 1 por cada 31.000 nacimientos de varones. Estas enfermedades, de herencia recesiva ligada al X,

están provocadas por un déficit de distrofina en el músculo esquelético y cardíaco, que conduce a una necrosis progresiva. En alrededor del 75% de los casos las mutaciones que conducen a DMD/DMB son deleciones o duplicaciones de 1 o varios exones del gen de la distrofina (OMIM*300377), mientras que el resto de los casos son debidos a mutaciones puntuales en su secuencia codificante.

El PGD de DMD/DMB ha sido llevado a cabo en nuestra Unidad por distintas estrategias a lo largo de estos años. Inicialmente se llevaba a cabo una identificación del sexo de los embriones mediante FISH, seleccionándose consiguientemente los embriones hembras para transferencia. Después, dada la alta demanda de parejas para PGD-DMD/DMB, se optó por optimizar un protocolo multiplex para la amplificación simultánea de 4 marcadores intragénicos del gen de la distrofina, con un alto índice de heterocigosidad (Figuras R8 y R9). Los primers utilizados fueron diseñados para conseguir la amplificación simultánea de los 4 marcadores, y se detallan a continuación:

Locus	Secuencia de los primers de PCR (5´-3´)	Pb
STR44	STR44F: FAM -TCCAACATTGGAAATCACATTTCAA STR44R:TCATCACAAATAGATGTTTCACAG	~190
STR45	STR45F: VIC -GAGGCTATAATTCTTTAACTTTGGC STR45R:CTCTTCCCTCTTTATTCATGTTAC	~170
STR49	STR49F: FAM -CGTTTACCAGCTCAAAATCTCAAC STR49R: CATATGATACGATTTCGTGTTTTGC	~250
STR50	STR50F: PET -AAGGTTCCCTCCAGTAACAGATTTG STR50R:TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC	~240

Este protocolo se lleva a cabo tras lisis enzimática de las blastómeras, y las condiciones de PCR son las siguientes:

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	3 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	-
H2O csp	15 µL

PGD-DMD file:

95°C-15' → [(96°C-30'') → (58°C-1') → (72°C-1')]x10 → [(94°C-30'') → (58°C-1') → (72°C-1')]x30 → (60°C-15') → 4°C-∞

Los resultados clínicos del programa PGD para las distrofinopatías se muestran en tabla R10.

Tabla R10: Datos clínicos de los ciclos de PGD-DMD/DMB según metodología utilizada, FISH para sexado o PCR específica

PGD para DMD/DMB		
	FISH	PCR Multiplex
Número de parejas	6	21
Edad media (Rango)	29.6 (26-33)	30.6 (21-38)
Ciclos puncionados	8	30
Ovocitos MII recuperados	61	316
Ovocitos fecundados	44	184
Ciclos con biopsia	8	29
Embriones biopsiados	38	137
Embriones con diagnóstico	36	116

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Ciclos informativos	8	29
Ciclos con transferencia en fresco	4	22
Tasa de transferencia en fresco	50%	66.6%
Ciclos de TEC iniciados	1	6
Ciclos de TEC transferidos	1	6
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	3 (3+0)	11 (9+2)
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	3	10 (8+2)
Tasa de implantación	42.8%	25%
Tasa de gestación clínica por pareja	50%	47.6%
Partos Totales (fresco + congelado)	2	7 (5+2)
Recién nacidos	2	9 (7+2)
Tasa de parto por pareja	33.3%	33.3%

FIGURA R8

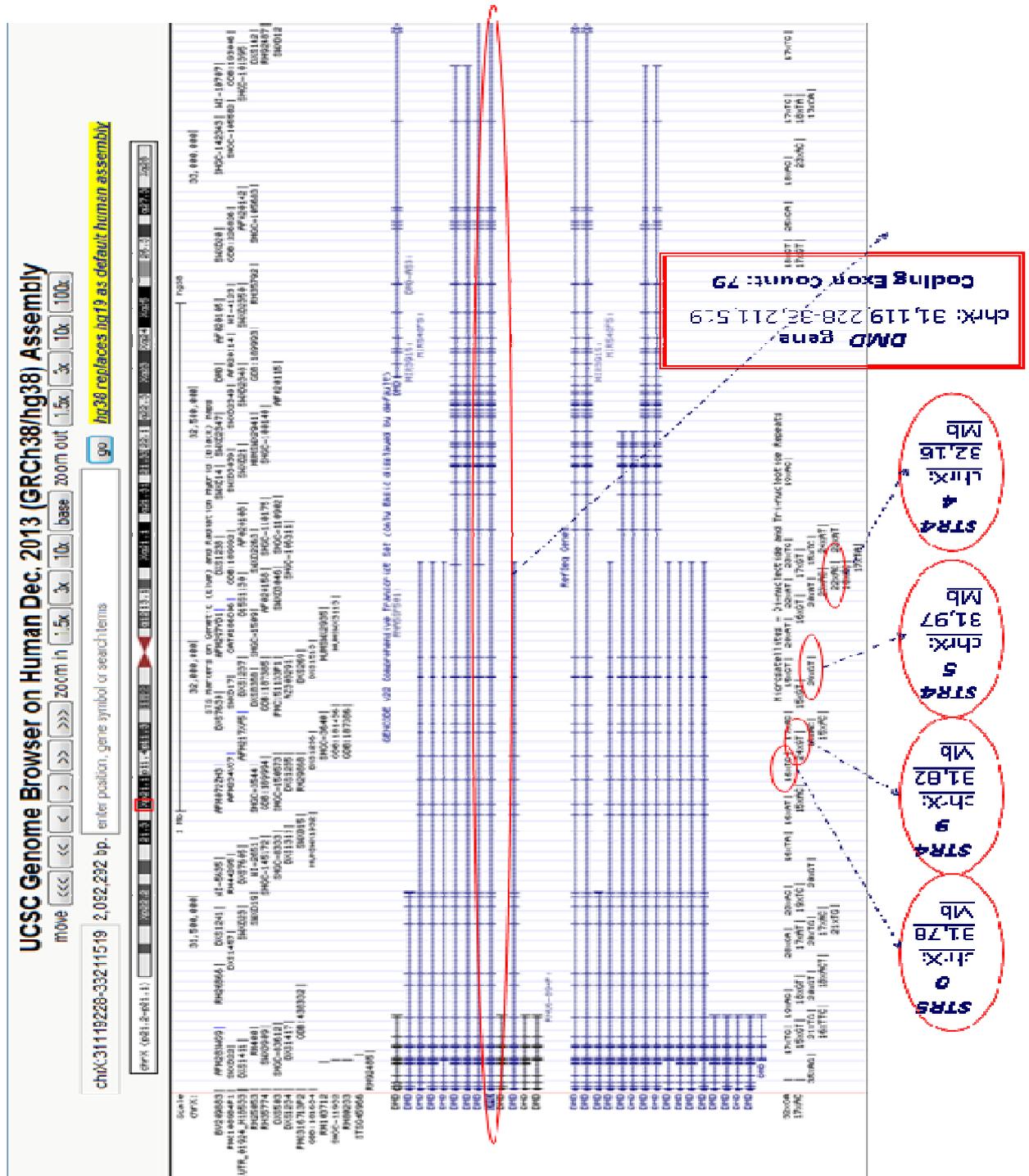
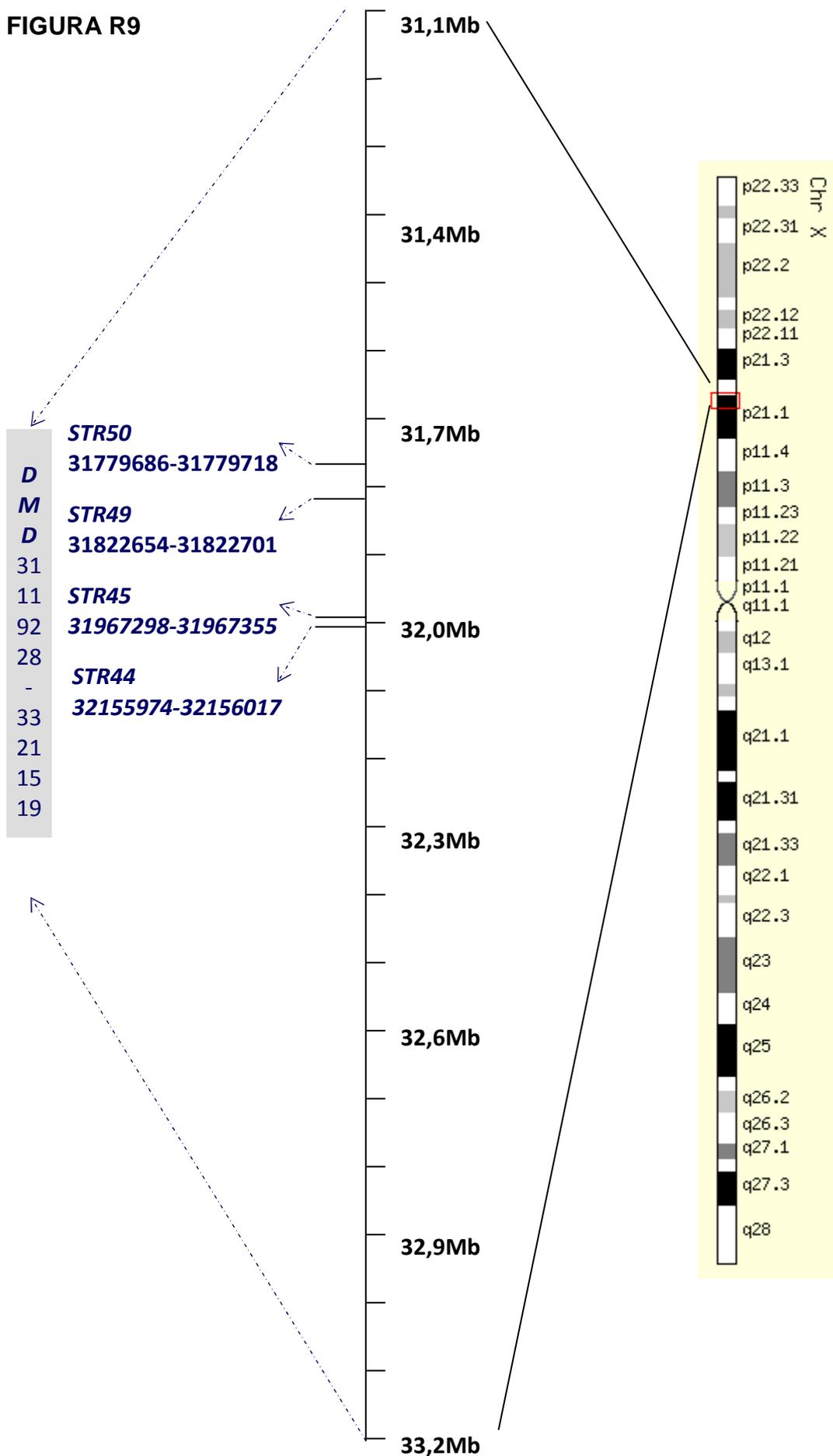


FIGURA R9



5.3.3.3. Optimización del protocolo general para PGD de Hemofilia A

La hemofilia A (OMIM# 306700) es la forma más frecuente de hemofilia caracterizada por hemorragias espontáneas o prolongadas, debidas a la deficiencia del factor VIII. La prevalencia se estima en alrededor de 1 de cada 6.000 individuos de sexo masculino. La hemofilia afecta principalmente a los varones, pero se ha descrito una forma sintomática de hemofilia A en mujeres portadoras con, generalmente, un cuadro clínico leve. La hemofilia A se transmite de manera recesiva ligada al X y está causada por mutaciones en el gen *F8* (Xq28, OMIM*300841), que codifica para el factor de coagulación VIII. Alrededor del 50% de los casos se deben a una inversión en el intrón 22 del gen, y el 5% son consecuencia de una inversión en el intrón 1. En el resto de los casos la enfermedad se debe a mutaciones puntuales a lo largo del gen.

También en PGD de HA se han utilizado diferentes estrategias metodológicas a lo largo de estos años en nuestra Unidad, como FISH o PCR para selección de embriones hembras para transferencia (sección 5.3.3.1). Desde 2009 y hasta la actualidad se viene empleando un protocolo multiplex para la amplificación simultánea de hasta 7 marcadores STRs intragénicos o flanqueantes del gen *F8* (Figuras R10 y R11), (Fernández *et al.*, 2015). Los marcadores habían sido previamente publicados por Gigarel *et al.*, 2004 y Sánchez-García *et al.*, 2005, pero fue necesario el rediseño de algunos de los primers para que todos los marcadores pudieran ser amplificados bajo las mismas condiciones (Fernández *et al.*, 2015).

Este protocolo se lleva a cabo tras lisis alcalina de las blastómeras, y las condiciones de PCR son las siguientes:

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	3 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	1.5 µL
H2O csp	15 µL

PGD-HEMOA file:

94°C-15' → [(96°C-30'') → (55°C-30'') → (72°C-1')]x10 → [(94°C-30'') → (55°C-30'') → (72°C-1')]x35 → (60°C-15') → 4°C-∞

En la figura R12 se puede visualizar el electroferograma típico tras aplicación de este protocolo en un ciclo real de PGD-HEMOA.

Tabla R11: Datos clínicos de los ciclos de PGD-HEMOA comparando FISH y el método multiplex en HUVR

PGD para Hemofilia A		
	FISH	Multiplex
Número de parejas	12	21
Edad media (Rango)	31.4(25-38)	33.3(27-40)
Ciclos puncionados	22	34
Ovocitos MII recuperados	280	436
Ovocitos fecundados	187	279
Ciclos con biopsia	22	32
Embriones biopsiados	132	216
Embriones con diagnóstico	104	190

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Ciclos informativos	22	31
Ciclos con transferencia en fresco	17	28
Tasa de transferencia en fresco	77.2%	82.3%
Ciclos de TEC iniciados	1	10
Ciclos de TEC transferidos	1	10
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	7 (6+1)	19(13+6)
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	4 (3+1)	10(7+3)
Tasa de implantación	16%	15.1%
Tasa de gestación clínica por pareja	33.3%	47.6%
Partos Totales (fresco + congelado)	3 (2+1)	8+1pdte(6+1pdte/2)
Recién nacidos	3 (2+1)	9+1pdte(7+1pdte/2)
Tasa de parto por pareja	25%	42.8%

FIGURA 10

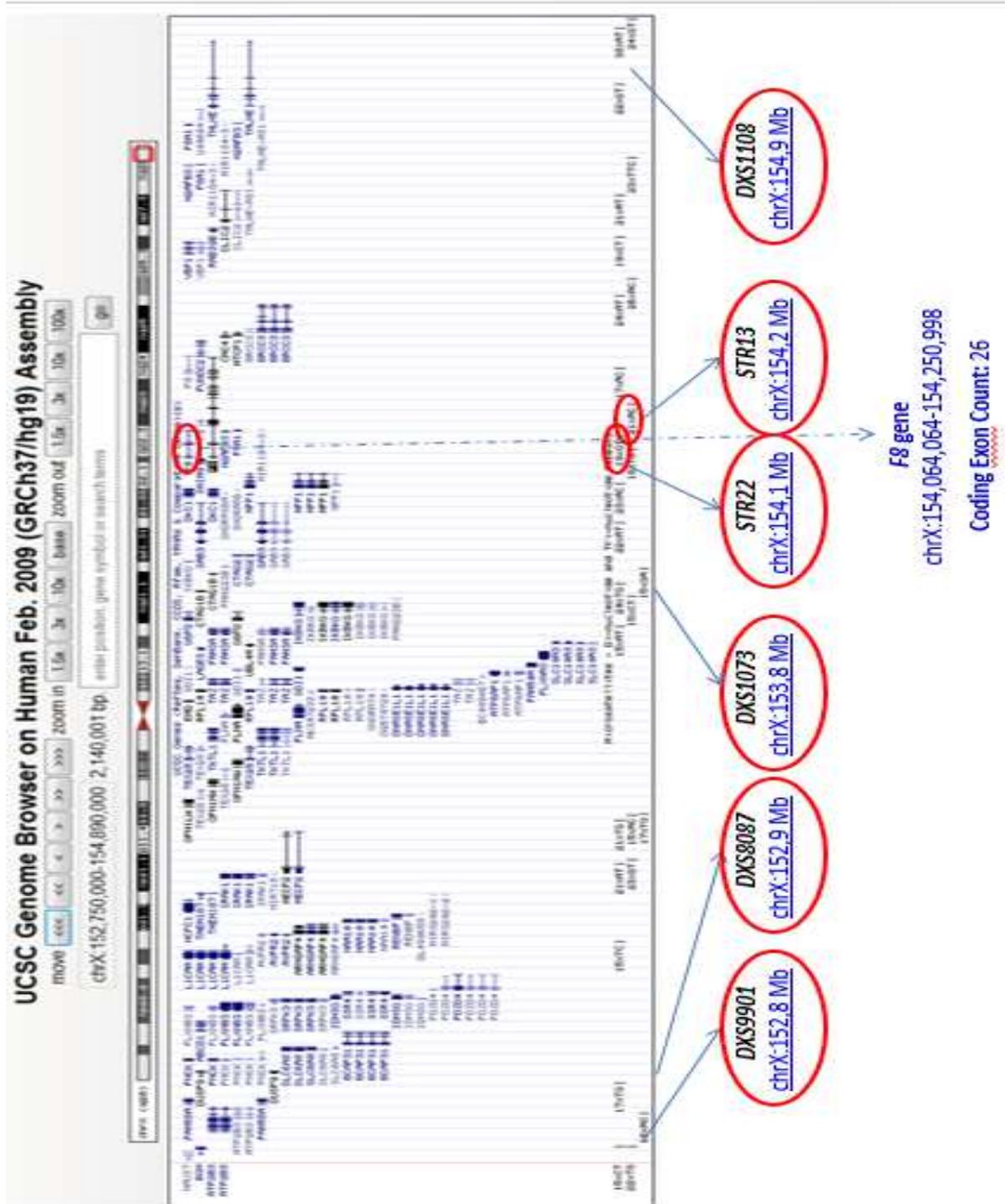


FIGURA R11

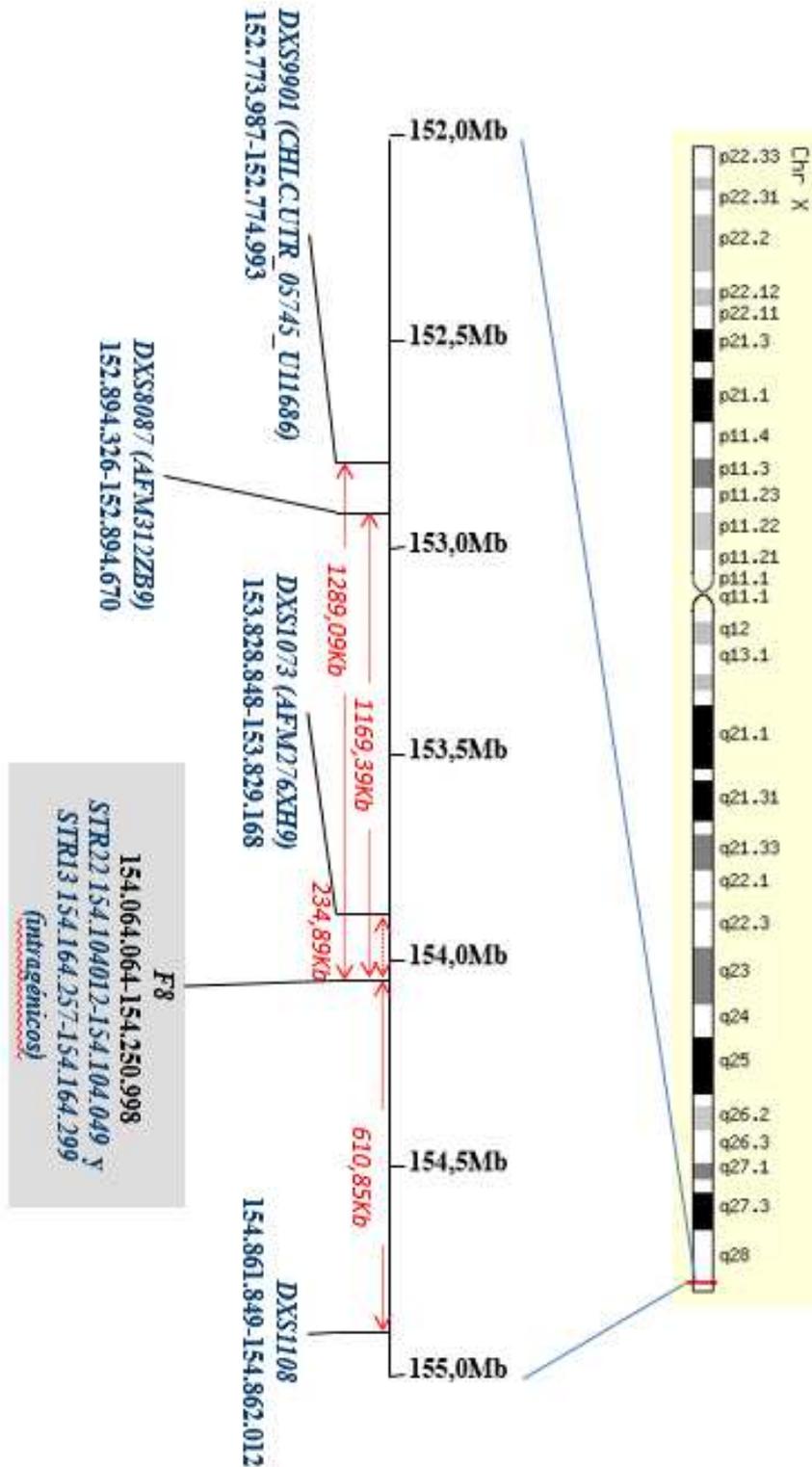
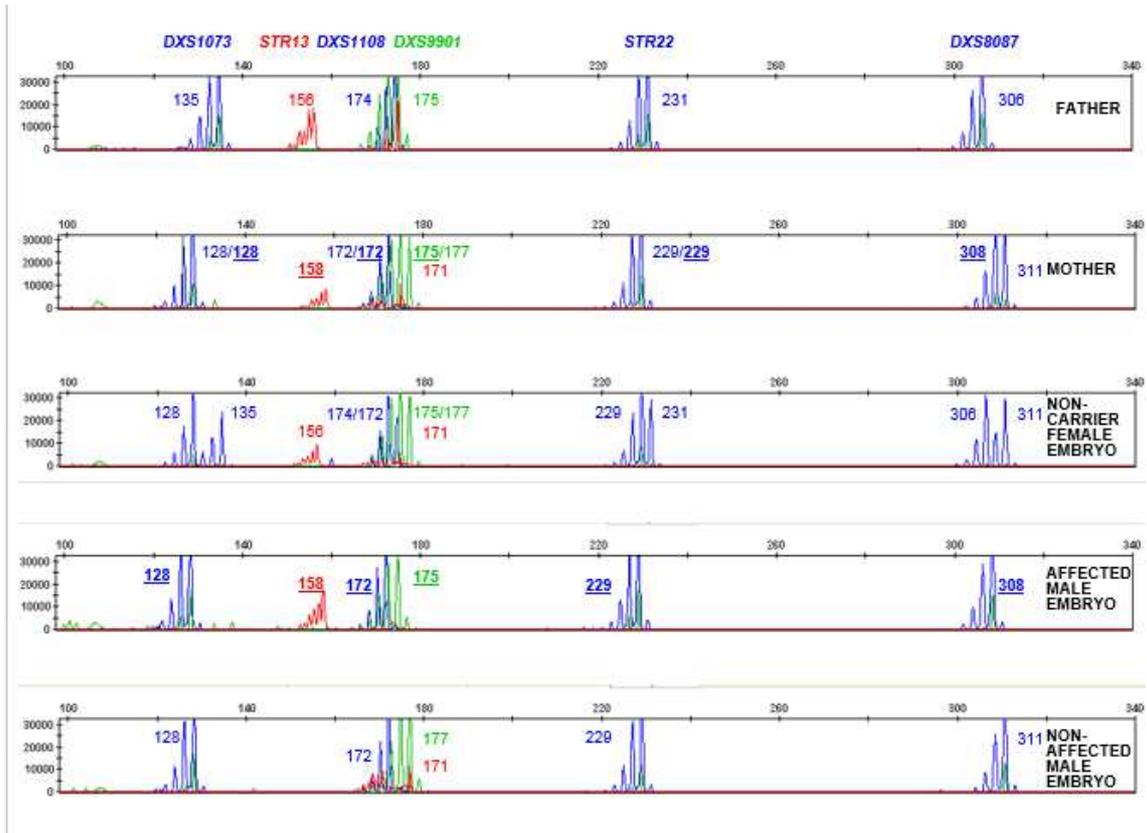


FIGURA R12



5.3.4. Optimización del protocolo de tipaje HLA y PGD-HLA mediante PCR multiplex

El PGD de enfermedades monogénicas combinado con tipaje HLA (PGD-HLA), ha emergido como una herramienta muy útil dirigida a parejas en riesgo de transmitir una enfermedad genética para seleccionar embriones no afectados y con un tipo HLA compatible con el de un hijo anterior enfermo. El estudio de los antígenos HLA en blastómeros permite la detección de embriones histocompatibles para futuros trasplantes, y esto se puede hacer de forma indirecta mediante análisis de marcadores STRs distribuidos por toda la región de histocompatibilidad. No obstante, el tipaje HLA en una única célula es muy complejo dado que el locus HLA es altamente polimórfico, grande (4 Mb) y recombinogénico. Nuestro equipo ha optimizado un método que permite la amplificación simultánea de distintas combinaciones de marcadores STRs distribuidos por todo el locus HLA (Figura R13, Fernández *et al.* 2013). Siguiendo las recomendaciones sobre PGD-HLA de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (Harton *et al.*, 2011), debe incluirse al menos un marcador en 5' de la región HLA-A, otro entre HLA-A y HLA-B, otro más entre HLA-B y HLA-DRA, otro entre HLA-DRA y HLA-DQB1 y al menos otro marcador más en 3' de la región HLA-DQB1.

Los primers diseñados para la amplificación de todos los marcadores con las mismas condiciones de PCR se detallan en la siguiente tabla:

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Marker	Primer	Fluorocromo 5'	Secuencia	Pb
D6S1571	D6S1571F	PET	GGACCTACGCATCTGGTG	160-180
	D6S1571R		TGGCTCTAATGGTTACTTTTTACA	
D6S1260	D6S1260F	NED	ACTGCTCCTGGGCATGGTTG	130-160
	D6S1260R		GTACATGCCTTTGTAAACATC	
D6S1624	D6S1624F	FAM	GGAAGTCTTCAGTGGAGAGAGT	200-200
	D6S1624R		ACTCCAGGTGTTTGTGGTTT	
MOG-CA	MGCAF	VIC	TCACCTCGAGTGAGTCTCTTT	205-235
	MOGCAR		ACCATGGGTAACCTGAAGCAT	
MOG-TAAA	MOG3F	FAM	GAAATGTGAGAATAAAGGAGA	125-150
	MOG3R		GATAAAGGGGAACACTACA	
D6S265	D6S265F	FAM	ACGTTTCGTACCCATTAACCT	110-125
	D6S265R		CGAGGTAAACAGCAGAAAGA	
HLAC-CA	HLACCAF	VIC	TCCCTAGTAGCTGGGATTACA	155-175
	HLACCAR		CGGCAAGAGACTCTGATGA	
MIB	MIBF	FAM	CCACAGTCTCTATCAGTCCAGA	155-185
	MIBR		TCAGCCTGCTAGCTTATCCT	
D6S273	D6S273F	FAM	GGCCAAAGTTAAAACCAAAC	135-145
	D6S273R		GCAACTTTTCTGTCAATCCA	
DRA-CA	DRACAF	VIC	GATACTTTCCTAATTCTCCTCCTTC	120-140
	DRACAR		ATGGAATCTCATCAAGGTCAG	
D6S2443	D6S2443F	FAM	CCATACCAAAGTAAAACCCAG	150-200
	D6S2443R		GAGGATGAAGGGAAATTAGAG	
DQCAR	DQCARF	PET	CTTGGCCAATCAGAATCTTT	150-175
	DQCARR		CTGCATTTCTCTTCCTTATCAC	
TAP1-CA	TAP1CAF	PET	GGACAATATTTTGCTCCTGA	195-215
	TAP1CAR		TCATACATCTGCTTTGATCTCC	
RING3-CA	RING3CAF	FAM	GGGCCGCAGTTTAAGTAAC	125-135
	RING3CAR		TGTTAGGTCAGAACCACAGAA	
D6S1560	D6S1560F	FAM	CTCCAGTCCCCTACTGC	225-250
	D6S1560R		CCCAAGGCCACATAGC	
D6S1583	D6S1583F	VIC	GCCCCTAACCTGCTTCTACTGA	150-200
	D6S1583R		GCAGATGGCCCCACTGAC	
D6S1618	D6S1618F	NED	GGCCTGAGCAGTGCAT	130-170
	D6S1618R		TGATTCTAATCTGCGGG	
D6S1611	D6S1611F	PET	GAGCAAGACTCCATCTCAA	225-250
	D6S1611R		ACCTAAGTTCTCTGAAGGGC	
D6S1610	D6S1610F	PET	CCTGGTGAGATAGATGCTTG	100-140
	D6S1610R		ATTTCCAGCAGAGCCTTG	
D6S1552	D6S1552F	VIC	AGCCTGAACGACAGAACAAG	160-200
	D6S1552R		CTGCTTAACCTTAGATCTTTGGTAT	

Este protocolo se lleva a cabo tras lisis enzimática de las blastómeras, y las condiciones de PCR son las siguientes:

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	12.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	5 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	2.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	-
H2O csp	25 µL

PGD-HLA file:

95°C-15' → [(96°C-30'') → (55°C-30'') → (72°C-30'')]x10 → [(94°C-30'') → (55°C-30'') → (72°C-30'')]x30 → (60°C-15') → 4°C-∞

Una de las ventajas de este protocolo es su versatilidad, ya que permite incluir nuevos marcadores para su amplificación simultánea con los ya descritos. De hecho, el método de tipaje HLA sobre célula única es frecuentemente combinado con el método de PGD de enfermedades como la beta-talasemia (sección 5.3.5).

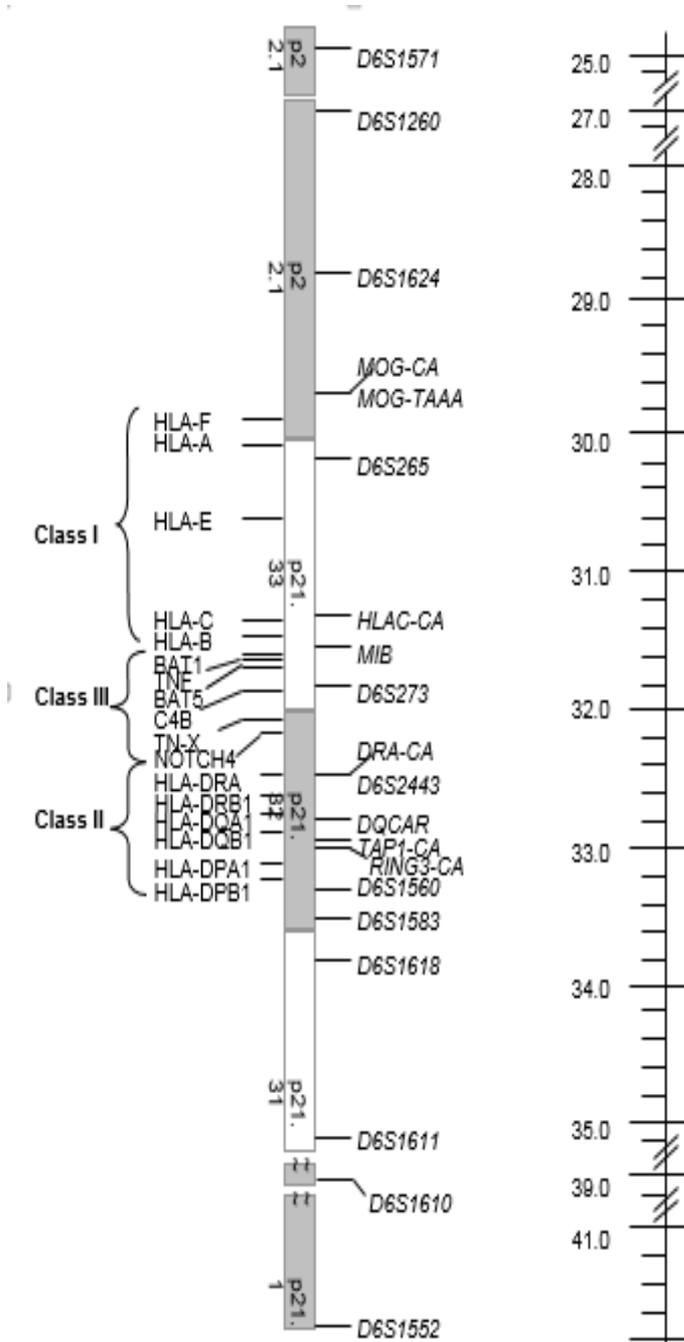
Se han solicitado 14 autorizaciones a las autoridades sanitarias y han sido autorizados 13 de ellos. Tres casos finalmente no se han realizado porque en dos se encontró donante en REDMO y en el tercero la mujer tuvo una gestación espontánea. La media de espera desde que se solicitó hasta disponer del informe favorable ha sido de 3.6 meses (2-9 meses). Una vez ya autorizados el inicio de ciclo no ha sufrido demora. En la siguiente tabla (R11) se presentan los datos principales, distinguiendo entre PGD-HLA y tipaje HLA.

Tabla R11. Datos clínicos de los ciclos de PGD-HLA o HLA en HUVR

	PGD-HLA	Tipaje HLA	Total
Parejas	8	2	10
Ciclos puncionados	26	5	31
Embriones biopsiados	179	42	221
Embriones informativos	173	40	213
Embriones sanos/HLA compatibles	7	4	11
Ciclos con transferencia	6	2	8
Parejas con transferencia	3	1	4
Gestaciones	2	1	3
Partos y recién nacidos	1	1	2
Trasplantes de cordón umbilical	1	1	2

Dos casos han terminado con éxito, consiguiendo realizar en ambos trasplante de precursores hematopoyéticos a partir de cordón umbilical (Fig R3)

FIGURA 13



5.3.5. Optimización del protocolo general para PGD de Beta-talasemia

La beta-talasemia mayor (BTM, OMIM#613985) es una forma grave de talasemia por déficit de cadenas beta de globina y se caracteriza por una anemia intensa que requiere transfusiones periódicas de glóbulos rojos. En pacientes transfundidos regularmente, el desarrollo tiende a la normalidad, pero se suelen producir complicaciones debidas a la sobrecarga de hierro por efecto transfusional como es el retraso de la maduración sexual. Complicaciones más tardías ligadas a sobrecarga de hierro son la miocardiopatía dilatada, arritmias, fibrosis hepática y cirrosis, diabetes mellitus e insuficiencia de paratiroides, tiroides, hipófisis y, con menor frecuencia, de glándulas suprarrenales. El trasplante de médula ósea es actualmente el único tratamiento curativo de la enfermedad. La BTM obedece a mutaciones puntuales o, más raramente, a deleciones en el gen *HBB* (11p15.5, OMIM+141900), lo que lleva a la disminución o ausencia de síntesis de las cadenas beta de la hemoglobina (Hb). Las mutaciones que causan BTM son homocigotas para un mismo alelo mutado o doble heterocigotas para dos alelos mutados diferentes. Es decir, el modo de herencia es autosómico recesivo.

El método para análisis molecular indirecto mediante PCR múltiple de BTM para PGD, fue inicialmente optimizado en nuestra Unidad únicamente en combinación con el tipaje HLA, con el objetivo de transferir embriones no afectados de la enfermedad y con un complejo HLA compatible con el de un hermano anterior afecto. La finalidad consiste en, además de proporcionar a la pareja la posibilidad de tener un hijo sano, dar la opción de curación al

hermano mediante un trasplante de células madres eritropoyéticas de cordón umbilical, extraídas y cultivadas justo en el momento del nacimiento.

El método combinado de PGD para BTM y tipaje HLA fue publicado por nuestro grupo (Fernández *et al.* 2013).

Los primers para la PCR de los marcadores STRs utilizados para el análisis indirecto de BTM (figuras R14 y R15) se muestran en la siguiente tabla.

Marker	Primer	Fluorocromo 5'	Secuencia	Pb
D11S4181	D11S4181F	FAM	AAGCTTCCTTCACATTCTTACAG	200-225
	D11S4181R		GAAGTGGAGACCAAGAACATTATTCC	
D11S2351	D11S2351F	FAM	GGGCACCTGTAATCCCA	150-180
	D11S2351R		AGGAGTCACTGGATCTACTC	
D11S1871	D11S1871F	PET	AAGAAGTTGCCCTGATGTCT	160-200
	D11S1871R		TAAAAGGAGCTGAATGCACA	
D11S4891	D11S4891F	FAM	GGAAATGGACCTCTGTCTC	75-100
	D11S4891R		CTTTTATTCCAGCCCCAC	
D11S1760	D11S1760F	PET	GATCTCAAGTGTTCCTCCAC	75-100
	D11S1760R		AAACGATGTCTGTCCACTCA	
D11S1338	D11S1338F	FAM	GACGGTTTAACTGTATATCTAAGAC	250-280
	D11S1338R		TAATGCTACTTATTTGGAGTGTG	

Las condiciones de PCR (química y programa) son las mismas que las del tipaje HLA. En la figura R16 se muestra el plot de los marcadores BTM y HLA combinados correspondientes al primer ciclo de PGD-HLA realizado íntegramente en España, y en un centro público, que dio lugar al nacimiento de un niño libre de BTM y HLA-compatible con su hermano afecto (Fernández *et al.* 2013).

FIGURA R15

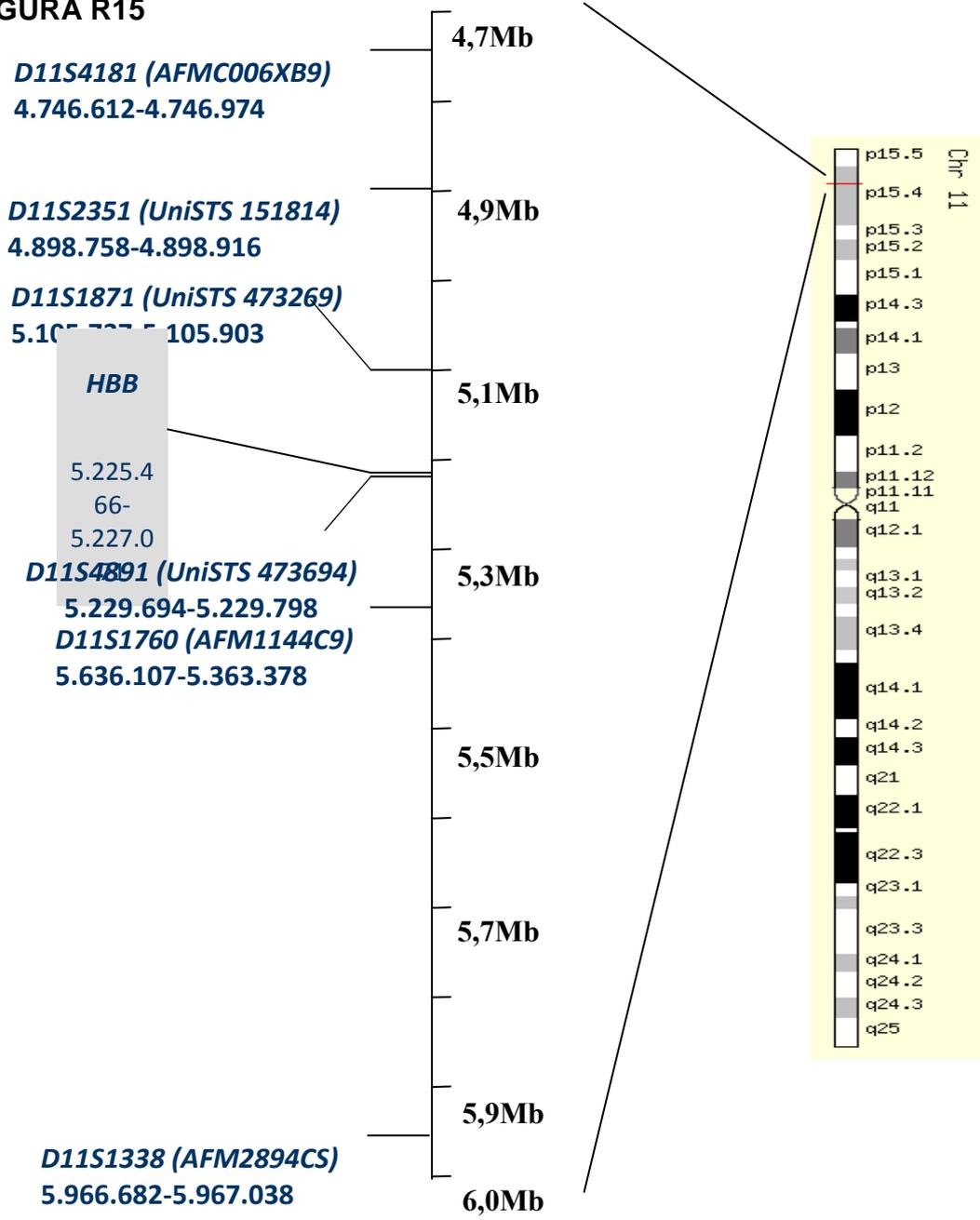
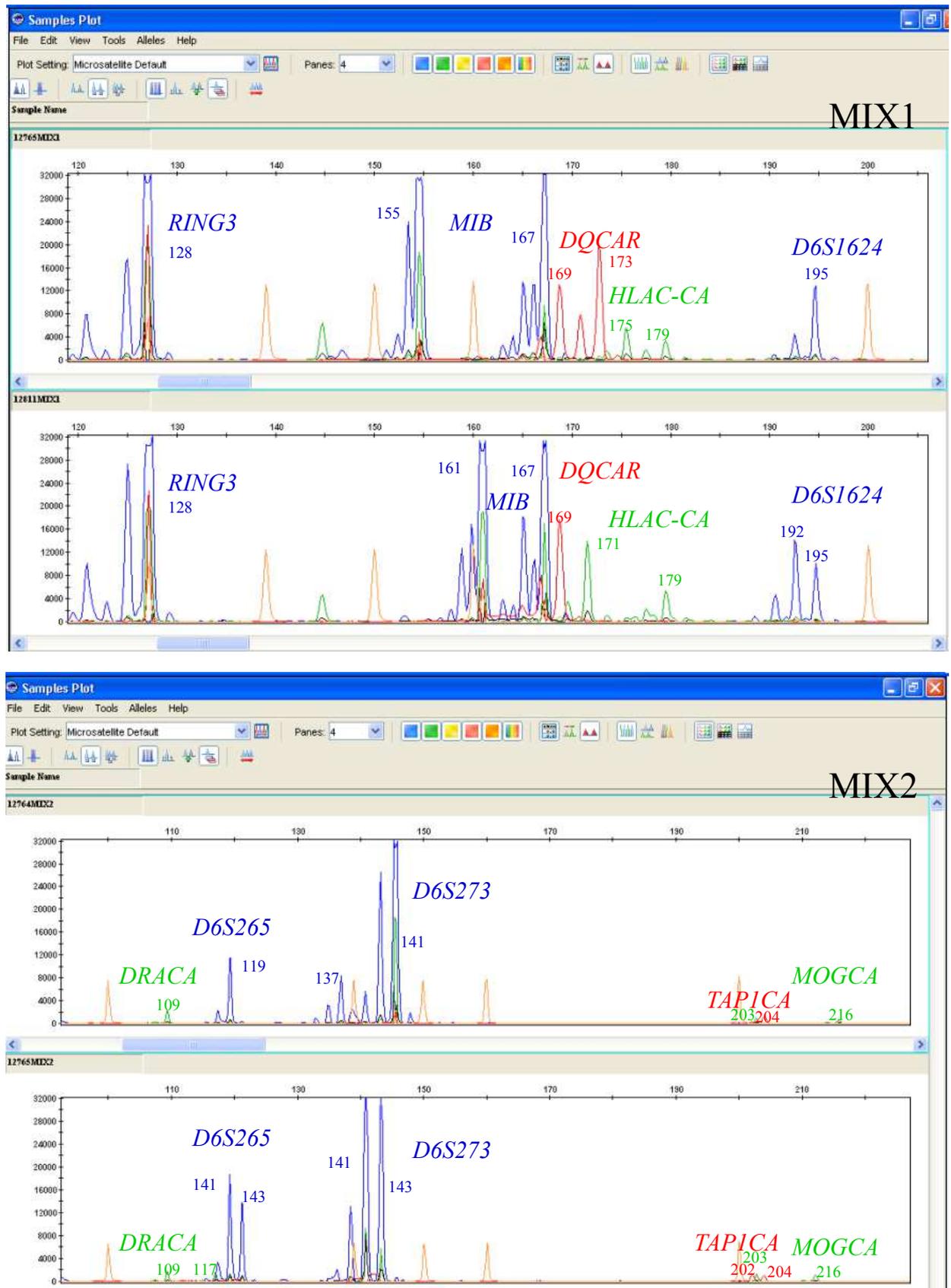


FIGURA R16



5.3.6. Optimización del protocolo general para PGD de Atrofia Muscular espinal

Las atrofas musculares espinales (AME, OMIM#253300, 253400, 253550 y 271150) son un grupo de trastornos musculares caracterizados por una debilidad muscular progresiva resultado de una degeneración y pérdida de las neuronas motoras inferiores en la médula espinal y en los núcleos del tronco encefálico. Se estima una prevalencia de 1/30.000 aproximadamente. Se han definido 4 subtipos en función de la edad de aparición y de la gravedad de la enfermedad. Alrededor de un 95% de los casos de AME están causados por delecciones homocigóticas (del exón 7 o de los exones 7 y 8) en el gen *SMN1* (5q12.2-q13.3, OMIM*600354) que codifica para la proteína SMN (neurona motora superviviente). Se ha identificado un segundo gen SMN (*SMN2*; 5q13.2, OMIM*601627) que contribuye a la producción de sólo el 10% de la totalidad de la proteína SMN, y cuyo nº de copias es inversamente proporcional a la gravedad de la enfermedad.

El protocolo de PCR multiplex optimizado en nuestra Unidad, incluye el análisis molecular directo de la delección del exón 7 de *SMN1* responsable de AME, junto con el análisis molecular indirecto de otros 3 marcadores STR extragénicos (Figuras R17 y R18). Los primers diseñados por nuestra Unidad se describen a continuación:

Locus	Secuencia de los primers de PCR (5´-3´)	Pb
D5S1417	D5S1417F: FAM - TTTTCAACCCTGAGACATTCAAC D5S1417R: TCCCCATCAGATCAATTAATA	100-120
Exón 7 <i>SMN1</i>	R111(7F): VIC -AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA SMN1 (7R): TCCTTCTTTTTGATTTTGTCTG	185
D5S637	D5S637F: TGAATCTCAGGGAGTGTGAA D5S637R: FAM -CTGCATTTAATACTGCAATGAA	~250

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

D5S641	D5S641F: NED-AGGGACAGTCCACTTCCAGT D5S641R: AGTTGTGTATTGGAGAATGTTATCA	250-280
---------------	--	---------

Tras aplicación del protocolo de lisis enzimática sobre las blastómeras, se sigue el protocolo de PCR multiplex cuyas condiciones se especifican a continuación:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	-
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	-
H2O csp	15 µL

PGD-AME file:

95°C-15' → [(96°C-10'') → (59°C-1') → (72°C-30'')]x10 → [(94°C-10'') → (59°C-1') → (72°C-30'')]x30 → (60°C-15') → 4°C-∞

Los resultados clínicos de PGD para AME se detallan a continuación.

Tabla R13: Datos clínicos de los ciclos de PGD-AME en HUVR

PGD para Atrofia Muscular Espinal	
Número de parejas	13
Edad media	34.4(29-40)
Ciclos puncionados	20
Ovocitos MII recuperados	216
Ovocitos fecundados	133

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Ciclos con biopsia	19
Embriones biopsiados	102
Embriones con diagnóstico	89
Ciclos informativos	19
Ciclos con transferencia en fresco	14
Tasa de transferencia en fresco	70%
Ciclos de TEC iniciados	4
Ciclos de TEC transferidos	4
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	6 (6/0)
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	3 (3/0)
Tasa de implantación	11.5%
Tasa de gestación clínica por pareja	23%
Partos Totales (fresco + congelado)	1+1 (pdte)/0
Recién nacidos	1+1 pdte
Tasa de parto por pareja	15.4%

FIGURA R17

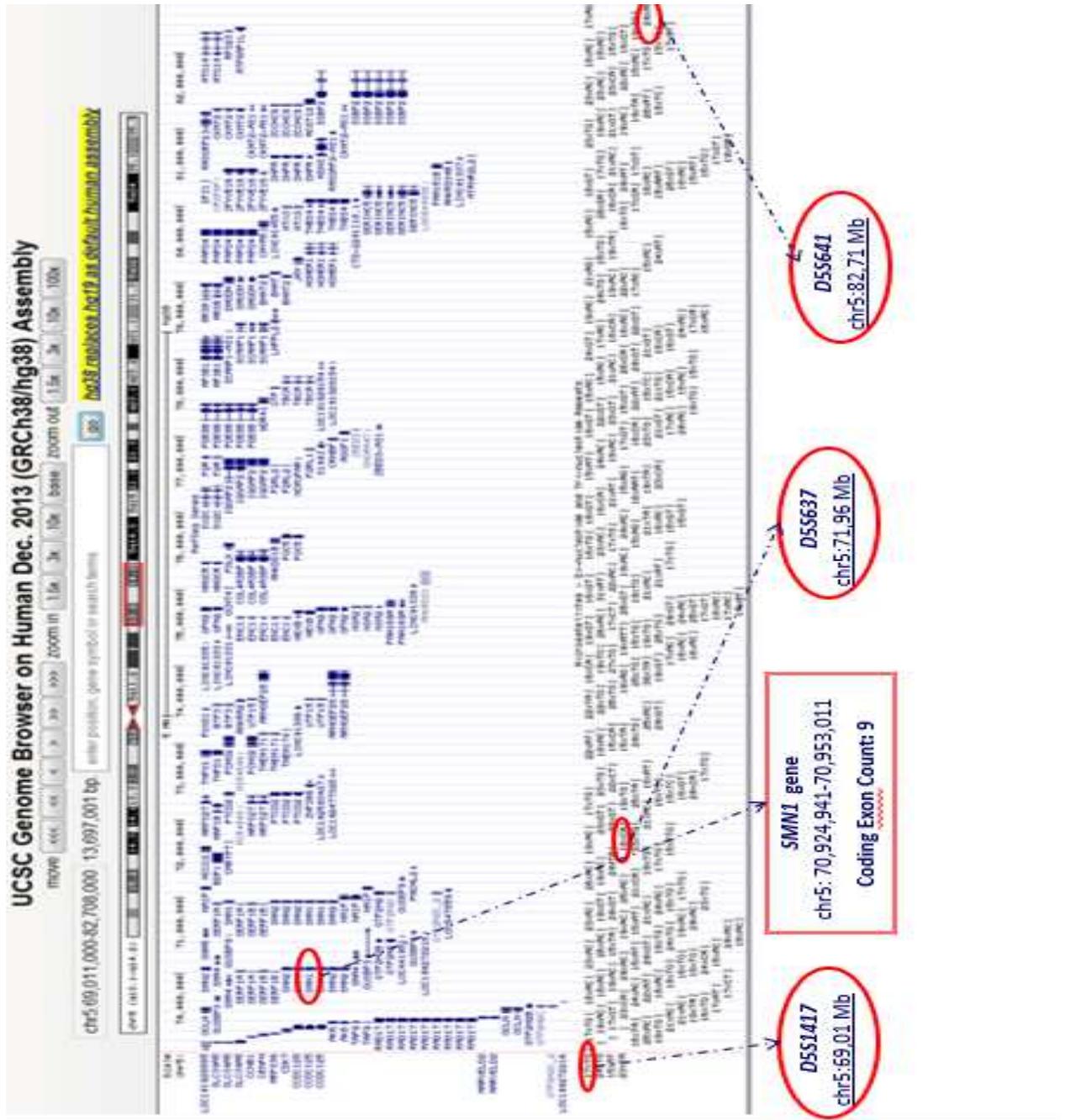
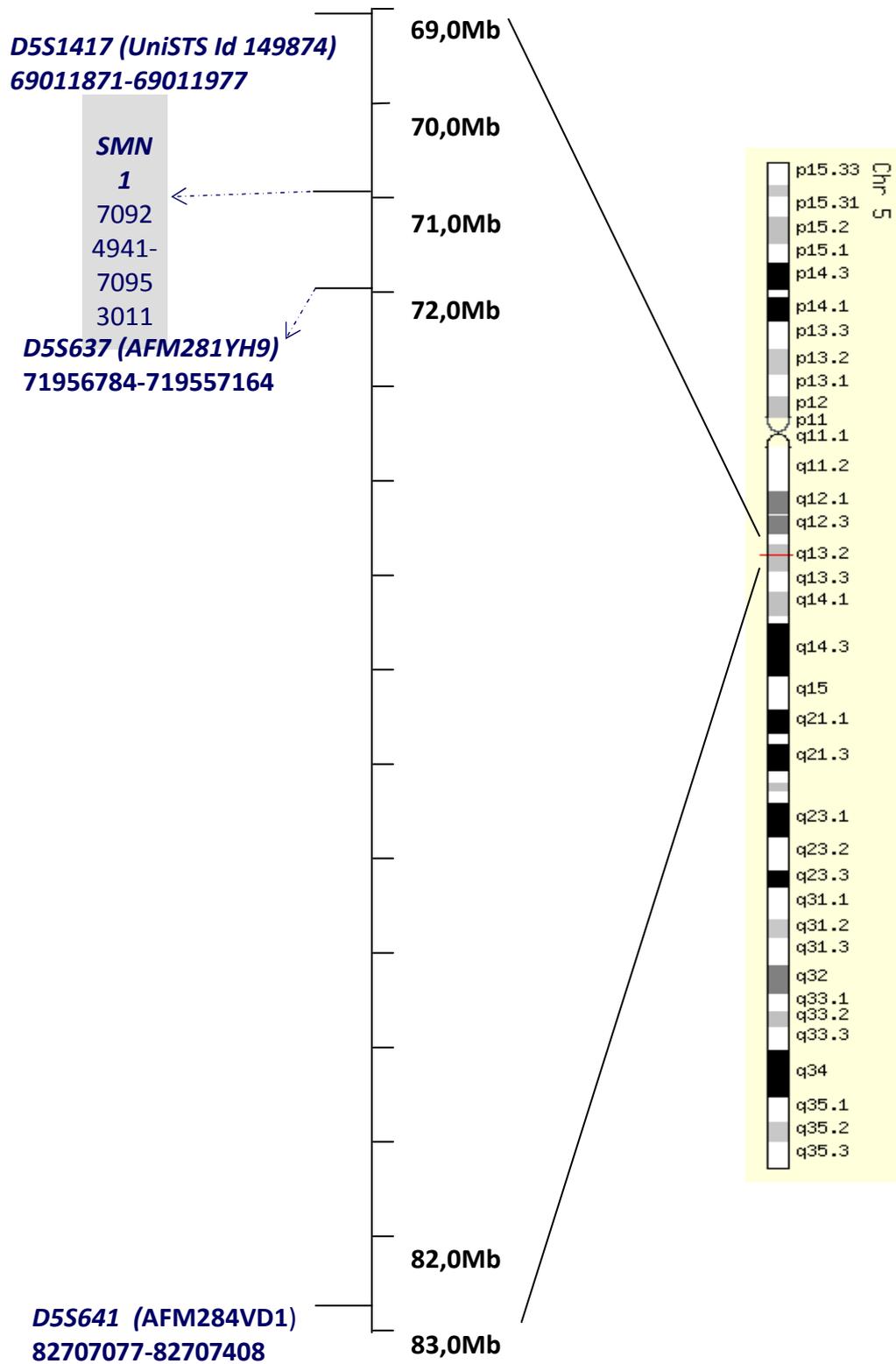


FIGURA R18



5.3.7. Optimización del protocolo general para PGD de la enfermedad de Steinert

La distrofia miotónica tipo 1 o enfermedad de Steinert (DMS, OMIM#160900) es la distrofia muscular más frecuente en el adulto (prevalencia entre 1/8.000 y 1/20.000 en Europa) y su transmisión es autosómica dominante. Se caracteriza por atrofia muscular predominante de los músculos distales, axiales, faciales, faríngeos y respiratorios, miotonía en las manos y afección multisistémica con cataratas, bloqueos de la conducción cardíaca y arritmia, diabetes y somnolencia. La causa molecular que conduce a la aparición de la enfermedad es una expansión del trinucleótido CTG en la región 3'UTR del gen *DMPK* (OMIM *605377). Los alelos con 5 a 34 repeticiones son considerados normales, mientras que los alelos con >50 repeticiones son alelos patológicos y darán lugar a la aparición de la enfermedad tanto más temprano cuanto más expandidos estén. El rango entre 35 y 49 repeticiones es considerado de premutación, es decir, si bien no son patológicos en sí mismos, existe una alta probabilidad de que en sucesivas generaciones incrementen su número dando lugar a alelos patológicos.

Hemos optimizado el protocolo de PCR multiplex en nuestra Unidad incluyendo el análisis molecular directo de la expansión responsable de DMS, junto con el análisis molecular indirecto de otros 3 marcadores STR cuya localización se muestra en las Figuras R19 y R20. Los marcadores *APOC2* y *D19S112* habían sido previamente publicados por Kakourou *et al.*, 2008, mientras que el marcador *D19S219* fue previamente reportado por Dean *et al.*, 2001.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Los primers para la amplificación simultánea de todos los loci fueron diseñados en nuestra Unidad, y su secuencia es la siguiente:

Locus (het %)	Secuencia de los primers de PCR (5´-3´)	Pb
APOC2-5´UTR (87%)	APOC2F: PET -GGCTACATAGCGAGACTCCATCTCC APOC2R:GGGAGAGGGCAAAGATCGATAAAGC	130-160
D19S219 (77%)	D19S219F: VIC -CAGGAAGCGGAGGTTGCAGTGAG D19S219R:TCCTAACCCCTTCACCGCAAGC	240-270
(CTG)_n DMPK (85%)	DMF: FAM -CTTCCCAGGCCTGCAGTTTGCCCATC DMR: GAACGGGGCTCGAAGGGTCTTGTAGC	>121
D19S112 (90%)	D19S112F: FAM -GGACCCACAGAAACTGAAAGACAC D19S112R:CTTACCTGTCATCTGCCTTTCCTG	200-240

Tras varias pruebas, se consiguió optimizar el método multiplex sobre célula única tras lisis alcalina, siendo estas las condiciones:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	3 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	1.5 µL
H2O csp	15 µL

PGD-DMS file:

96°C-15´→[(96°C-30´´)→(61°C-1´)→(72°C-1´)]x10→[(94°C-30´´)→(61°C-1´)→(72°C-1´)]x30→(60°C-10´)→4°C-∞

Desde su puesta a punto, este método se ha empleado en un total de 50 ciclos de PGD sobre 28 parejas. Los resultados clínicos se muestran en la tabla R14.

Tabla R14: Datos clínicos de los ciclos de PGD-DMS en HUVR

PGD para Enfermedad de Steinert	
Número de parejas	28
Edad media (Rango)	32.6 (26-39)
Ciclos puncionados	50
Ovocitos MII recuperados	487
Ovocitos fecundados	250
Ciclos con biopsia	41
Embriones biopsiados	191
Embriones con diagnóstico	176
Ciclos informativos	41
Ciclos con transferencia en fresco	32
Tasa de transferencia en fresco	64%
Ciclos de TEC iniciados	3
Ciclos de TEC transferidos	3
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	15 (14/1)
Gestaciones clínicas totales (fresco / congelado)	10 (9/1)
Tasa de implantación	20%
Tasa de gestación clínica por pareja	35.7%
Partos totales (fresco / congelado)	8+1 pdte(7+1 pdte/1)
Recién nacidos (fresco / congelado)	9+1 pdte (7+1pdte/2)
Tasa de parto por pareja	32.1%

FIGURA R19

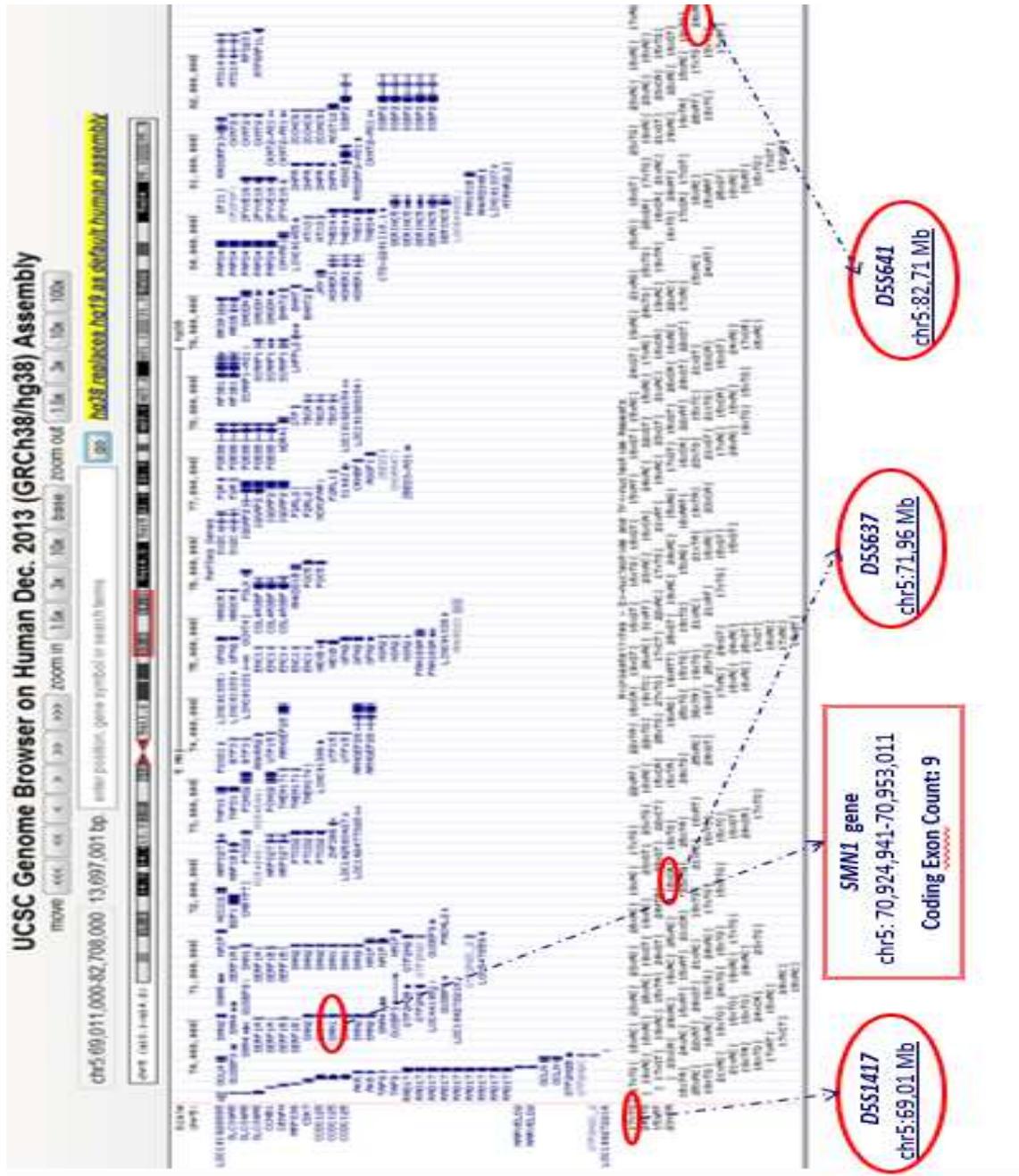
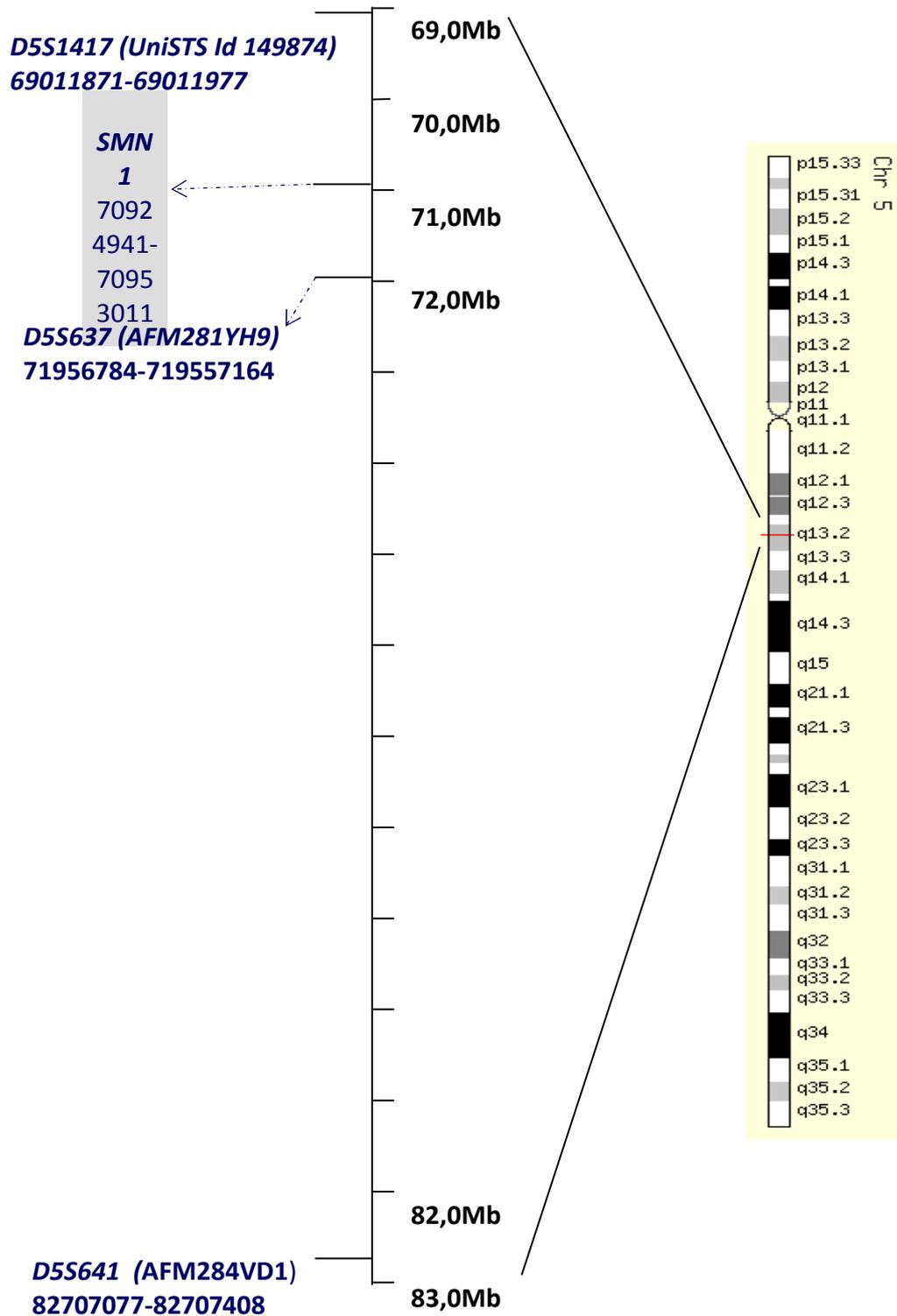


FIGURA R20



5.3.8. Optimización del protocolo general para PGD de Fragilidad del cromosoma X

El síndrome de fragilidad del cromosoma X (FRAX, OMIM#300624) es una rara enfermedad genética caracterizada por un déficit intelectual entre leve y grave, que puede estar asociado a trastornos del comportamiento y a rasgos físicos característicos. Se estima una prevalencia aproximada de entre 1/2.500 (mutación completa) y 1/4.000 (prevalencia de casos sintomáticos) para ambos sexos. FRAX se presenta con un fenotipo clínico variable. En los hombres, la enfermedad aparece en la infancia con retraso en el desarrollo (retraso motor y/o del lenguaje). En los hombres y en un 50% de las mujeres, el trastorno intelectual se da asociado a problemas de comportamiento y/o a rasgos dismórficos. También pueden observarse: otitis recurrente, sinusitis y convulsiones. FRAX está causado en la inmensa mayoría de los casos por el silenciamiento transcripcional del gen *FMR1* (Xq27.3, OMIM*309550) por una expansión progresiva y la subsecuente metilación de la repetición del trinucleótido CGG en la región 5' no traducida del gen. Estas mutaciones completas se originan de alelos inestables llamados premutaciones (de 55 a 200 CGG repetidos). Las premutaciones están asociadas con fenotipos distintos del FRAX, como el riesgo de fallo ovárico prematuro en mujeres, y el síndrome de ataxia/temblor asociado a X frágil o FRAXTAS (OMIM#300623).

Nuestro grupo ha seleccionado una batería completa de 7 marcadores STRs (2 intragénicos y 5 extragénicos) para optimizar un único método multiplex que permita la amplificación simultánea de distintas combinaciones de los mismos en función de la informatividad de las familias (Fernández *et al.*, en prensa).

Los marcadores fueron seleccionados de las publicaciones de Apeessos *et al.*, 2001, Platteau *et al.*, 2002 y Malcov *et al.*, 2007 (Figuras R21 y R22). No obstante, con el fin de que todos los marcadores pudieran amplificar simultáneamente a la misma temperatura de hibridación en la PCR, y dando lugar a productos de diferentes tamaños y marcajes, nuestro grupo tuvo que rediseñar los primers de amplificación, que se muestran en la siguiente tabla:

Locus	Secuencia de los primers de PCR (5´-3´)	Pb
<i>DXS998</i>	DXS998F: FAM -CATCACAGCAATTTTTCAAAGGCAAAG DXS998R:CTTTTGTAGGTATTAAGATCATTTCATATAACC	~135
<i>DXS548</i>	DXS548F: FAM -AGAGCTTCACTATGCAATGGAATC DXS548R:GTACATTAGAGTCACCTGTGGTGC	~194
<i>FRAXAC1</i>	FRAXAC1F: VIC -TGGAGACTTCAACACCTCTCTG FRAXAC1R: TGATGAGAGTCACCTTGAAGCTG	~170
<i>FRAXAC2</i>	FRAXAC2F: FAM -TATCTGCTGATGAAGAACACCA FRAXAC2R:AATTAGGTGCAGTGGTATGTGC	~307
<i>DXS1215</i>	DXS1215F: PET -GGGCAAAACATTAACCTCTC DXS1215R:GCCCTCTAAGTCATTACGCT	~248
<i>DXS6687</i>	DXS6687F: FAM -ACCATTTGTGTGGAGGCTCTGATAAT DXS6687R:AGGCAAAGTCTCAGTGAGTGTGTGT	~250
<i>DXS1193</i>	DXS1193F: FAM -GAATTGTTTCATGCAACTCTCCTCTCC DXS1193R:CATCCAAGCTACTTATTTTAAGGTGAGTATGG	~133

Tras aplicación del protocolo de lisis alcalina sobre las blastómeras, las condiciones del protocolo de PCR multiplex se detallan a continuación:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	3 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	1.5 µL
H2O csp	15 µL

PGD-FRAX file:

94°C-15'→[(96°C-30'')→(61.5°C-30'')→(72°C-30'')]x10→[(94°C-30'')→(61.5°C-30'')→(72°C-30'')]x35→(60°C-15')→4°C-∞

En la Figura R23 se muestra el plot obtenido tras electroforesis capilar de los productos de PCR con la aplicación de este protocolo en un ciclo real de PGD-FRAX, para el que se utilizaron los 3 marcadores informativos en esa familia.

Desde su puesta a punto, este método se ha empleado en un total de 15 ciclos de PGD sobre 10 parejas. Los resultados clínicos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla R15: Datos clínicos de los ciclos de PGD-FRAX en HUVR

PGD para Síndrome de X Frágil		
	PCR	WGA+PCR
Número de parejas	10	2
Edad media	32 (28-40)	31.5 (29-34)
Ciclos puncionados	15	2
Ovocitos MII recuperados	94	26
Ovocitos fecundados	58	20
Ciclos con biopsia	10	2
Embriones biopsiados	48	17
Embriones con diagnóstico	47	11
Ciclos informativos	10	2
Ciclos con transferencia en fresco	6	2

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Tasa de transferencia en fresco	60%	100%
Ciclos de TEC iniciados	2	0
Ciclos de TEC transferidos	2	0
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	2(1/1)	1
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	2 (1/1)	1
Tasa de implantación	30.7%	50%
Tasa de gestación clínica por pareja	20%	50%
Partos Totales (fresco + congelado)	2(1/1)	1
Recién nacidos	3 (1/2)	2
Tasa de parto por pareja	20%	50%

FIGURA 22

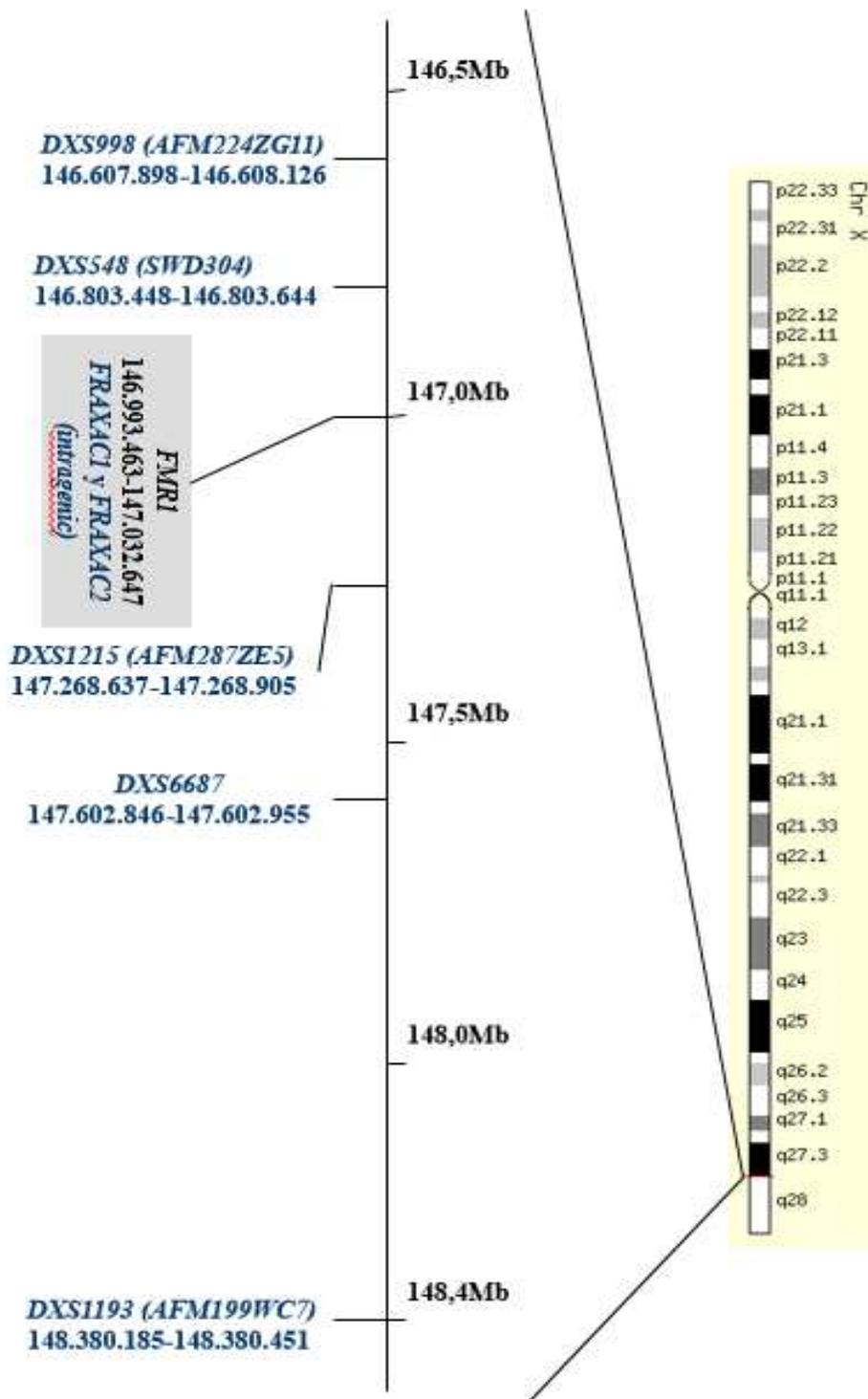
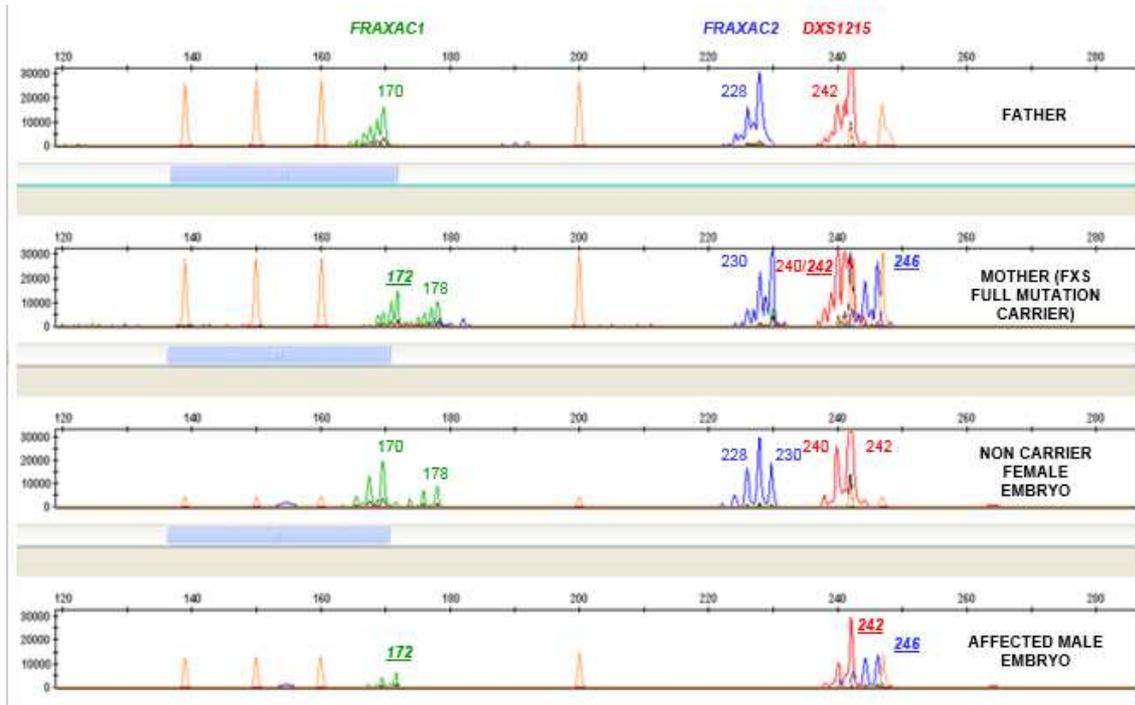


FIGURA 23



5.3.9. Optimización del protocolo general para PGD de Poliposis Adenomatosa Familiar

La poliposis adenomatosa familiar (PAF, OMIM#175100) se caracteriza por la aparición, en la segunda década de vida, de cientos o miles de adenomas en la zona del recto y del colon. La PAF representa menos del 1% de los casos de cáncer colorrectal (CCR). La prevalencia en la Unión Europea se estima en 1/11.300-37.600. La mayoría de pacientes son asintomáticos durante años, hasta que los adenomas son grandes y numerosos, y causan sangrado rectal o incluso anemia, o se desarrolla cáncer. Se hereda de modo autosómico dominante y es resultado de una mutación en la línea germinal en el gen *APC* (OMIM*611731). En ~ 90% de los casos se trata de mutaciones puntuales del tipo de sustituciones *missense* o *nonsense*, o bien de pequeñas deleciones o inserciones que alteran la pauta de lectura proteica. Esas mutaciones son detectables mediante secuenciación automática. En el 10% de los casos restantes, la causa molecular de PAF son grandes deleciones o duplicaciones de uno o varios exones del gen, detectables por MLPA entre otras técnicas.

Nuestra Unidad ha optimizado un protocolo general de PCR múltiple para análisis molecular exclusivamente indirecto mediante STRs. Este protocolo ha podido ser aplicado para la mayoría de las parejas, pero no se pudo llevar a cabo en 4 de ellas debido a que las correspondientes mutaciones causantes del cuadro eran eventos *de novo*.

Los marcadores utilizados para el método indirecto, así como la secuencia de los primers de amplificación, habían sido previamente publicados por Moutou *et*

al., 2007. La localización respectiva de estos marcadores se muestra en las Figuras R24 y R25.

El método multiplex, aplicado tras lisis alcalina de las blastómeras, se optimizó con las siguientes condiciones:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	3 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	1.5 µL
H2O csp	15 µL

PGD-APC file:

96°C-15' → [(96°C-30'') → (56°C-1') → (72°C-1')] × 10 → [(94°C-30'') → (56°C-1') → (72°C-1')] × 30 → (60°C-10') → 4°C-∞

Los resultados clínicos de PGD para esta patología se muestran en la siguiente tabla, haciéndose distinción entre los resultados obtenidos para parejas en las que ha sido posible el análisis indirecto, y parejas a las que se ha tenido que recurrir a WGA como paso previo para estudio molecular directo de las mutaciones responsables.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Tabla R16: Datos clínicos de los ciclos de PGD-PAF en HUVR

PGD para Poliposis Adenomatosa Familiar	
Número de parejas	7
Edad media	30.3 (25-37)
Ciclos puncionados	11
Ovocitos MII recuperados	164
Ovocitos fecundados	106
Ciclos con biopsia	9
Embriones biopsiados	86
Embriones con diagnóstico	83
Ciclos informativos	9
Ciclos con transferencia en fresco	8
Tasa de transferencia en fresco	72.7%
Ciclos de TEC iniciados	3
Ciclos de TEC transferidos	3
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	4 (2/2)
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	3 (1/2)
Tasa de implantación	15%
Tasa de gestación clínica por pareja	27.2%
Partos Totales (fresco + congelado)	1 pdte (0/1pdte)
Recién nacidos	2 pdtes (0/2 pdtes)
Tasa de parto por pareja	14.3%

FIGURA 24

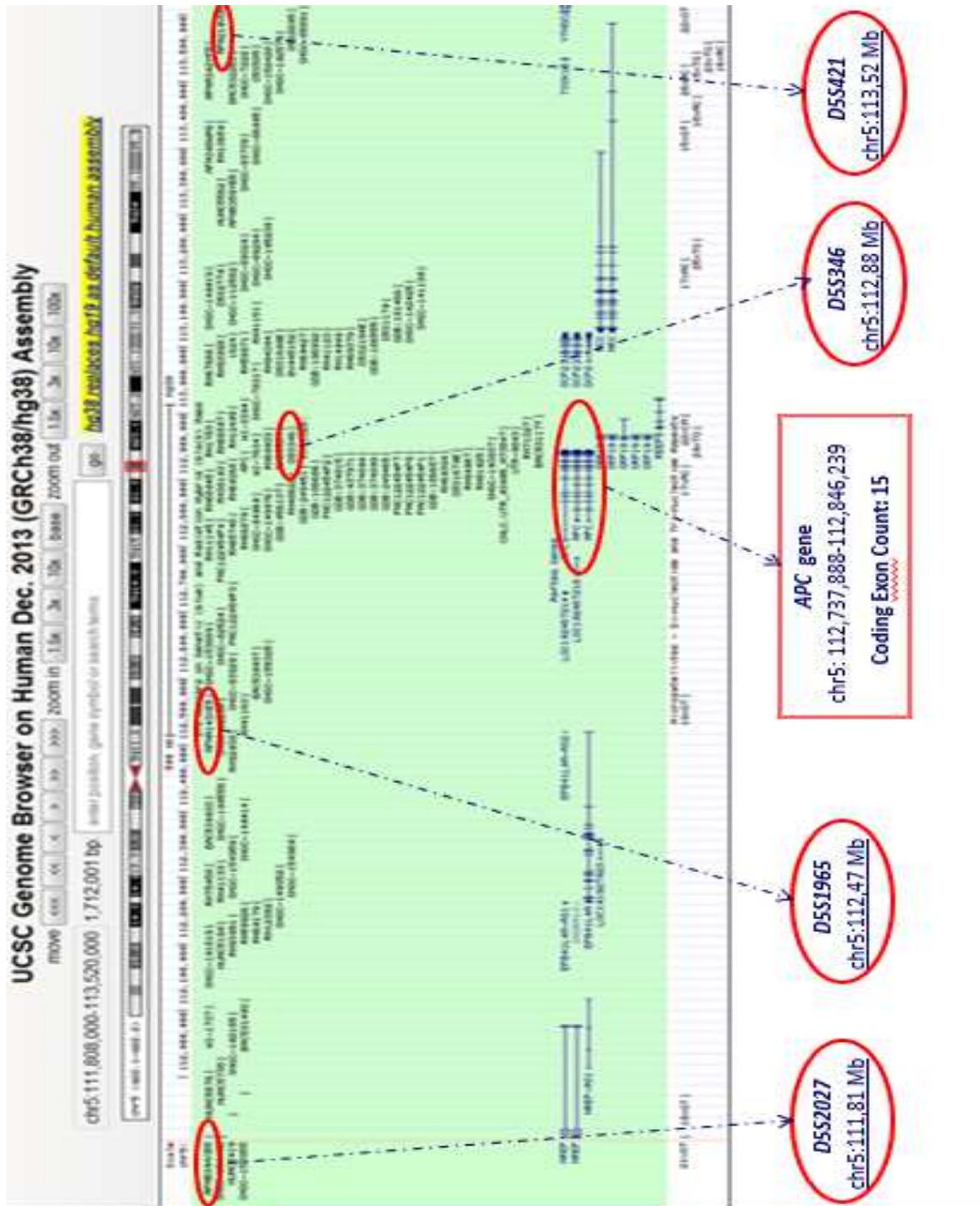


FIGURA 25

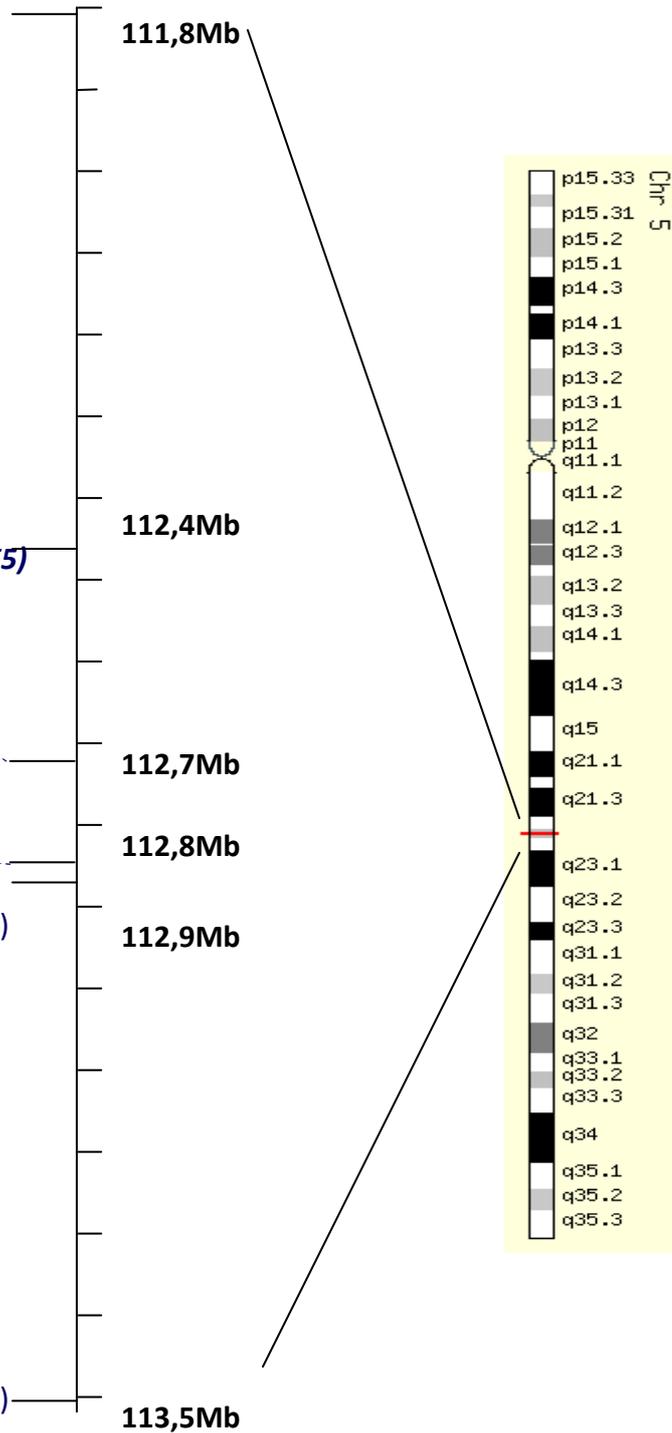
D5S2027 (AFMB304XB5)
111809722-111810017

D5S1965 (AFMA143XE5)
45993577-45993967

APC
1127
3788
8-
1128
4623

D5S346 (UniSTS id:146926)
112877927-112878051

D5S346 (UniSTS id:146926)
112877927-112878051



5.3.10. Optimización del protocolo general para PGD de Síndrome de Marfan

El síndrome de Marfan (OMIM#154700) es una enfermedad sistémica del tejido conectivo, caracterizada por una combinación variable de manifestaciones cardiovasculares, músculo-esqueléticas, oftalmológicas y pulmonares. La prevalencia se estima en 1/5.000. En la inmensa mayoría de los casos, el síndrome de Marfan se debe a mutaciones en el gen *FBN1*, (15q21, OMIM*134797), el cual codifica para la fibrilina-1, una proteína esencial del tejido conectivo. La transmisión es autosómica dominante, si bien en el 25% de los casos las mutaciones son *de novo*. Esas mutaciones son mayoritariamente mutaciones puntuales.

El protocolo general para análisis molecular indirecto mediante STRs se optimizó basándonos en 8 marcadores descritos por Spits *et al.*, 2006. Igualmente utilizamos los primers descritos en este artículo para la amplificación de cada uno de esos marcadores. Decidimos seleccionar una amplia batería de marcadores (figura R26 y R27) para tener opción a emplear distintas combinaciones de los mismos dependiendo de la informatividad de las familias. Este protocolo ha podido ser aplicado para 2 de las parejas, mientras que para una pareja se tuvo que recurrir a análisis molecular directo tras WGA porque la mutación responsable en el varón no había sido heredada de ninguno de sus padres. Se ha optimizado el método para combinaciones de hasta 4 marcadores diferentes en una misma PCR multiplex, cumpliendo siempre la premisa de incluir marcadores flanqueantes de la posición donde se

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

ubica la mutación por ambos extremos en cada caso. La lisis celular previa se realiza con el protocolo de lisis alcalina.

Las condiciones del método multiplex son las siguientes:

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	7.5 µL
Solución Q 5x (QIAGEN)	1.5 µL
Solución de primers (2 µM de cada uno)	1.5 µL
Solución de lisis con ADN de la blastómera	2.5 µL
Tricina	1.5 µL
H2O csp	15 µL

PGD-MARFAN file:

94°C-15' → [(96°C-30'') → (58°C-1') → (72°C-1')]x10 → [(94°C-30'') → (58°C-1') → (72°C-1')]x30 → (60°C-10') → 4°C-∞

En la Tabla R17 se muestran los resultados clínicos de PGD para Marfan.

Tabla R17: Datos clínicos de los ciclos de PGD-MARFAN en HUVR

PGD para enfermedades Síndrome de Marfan	
Número de parejas	2
Edad media	31.8 (28-38)
Ciclos puncionados	8
Ovocitos MII recuperados	66
Ovocitos fecundados	30
Ciclos con biopsia	6
Embriones biopsiados	26
Embriones con diagnóstico	21

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Ciclos informativos	6
Ciclos con transferencia en fresco	4
Tasa de transferencia en fresco	50%
Ciclos de TEC iniciados	1
Ciclos de TEC transferidos	0
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	0
Gestaciones clínicas totales (fresco + congelado)	0
Tasa de implantación	0
Tasa de gestación clínica por pareja	0
Partos Totales (fresco + congelado)	0
Recién nacidos	0
Tasa de parto por pareja	0

FIGURA 26

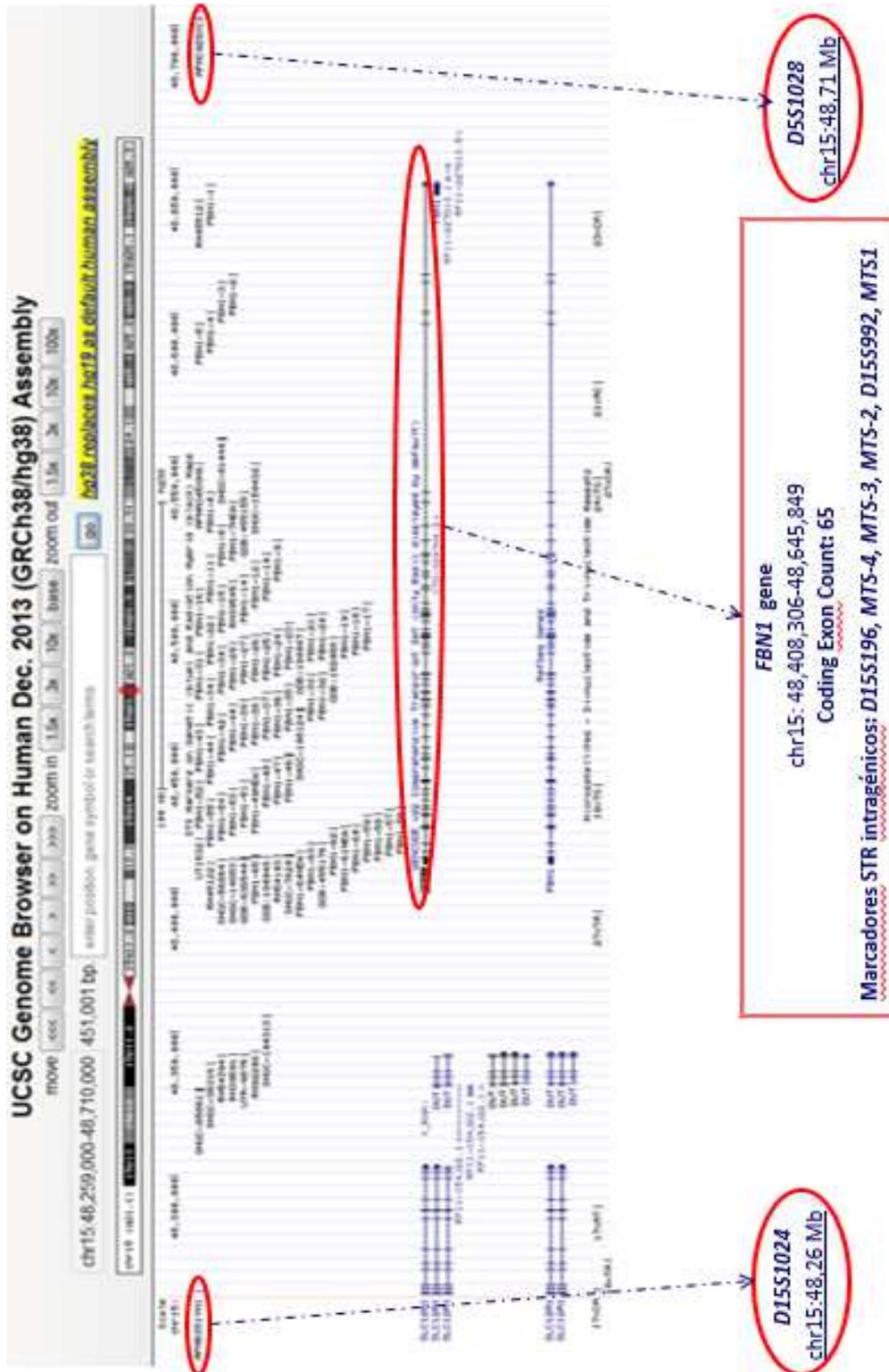
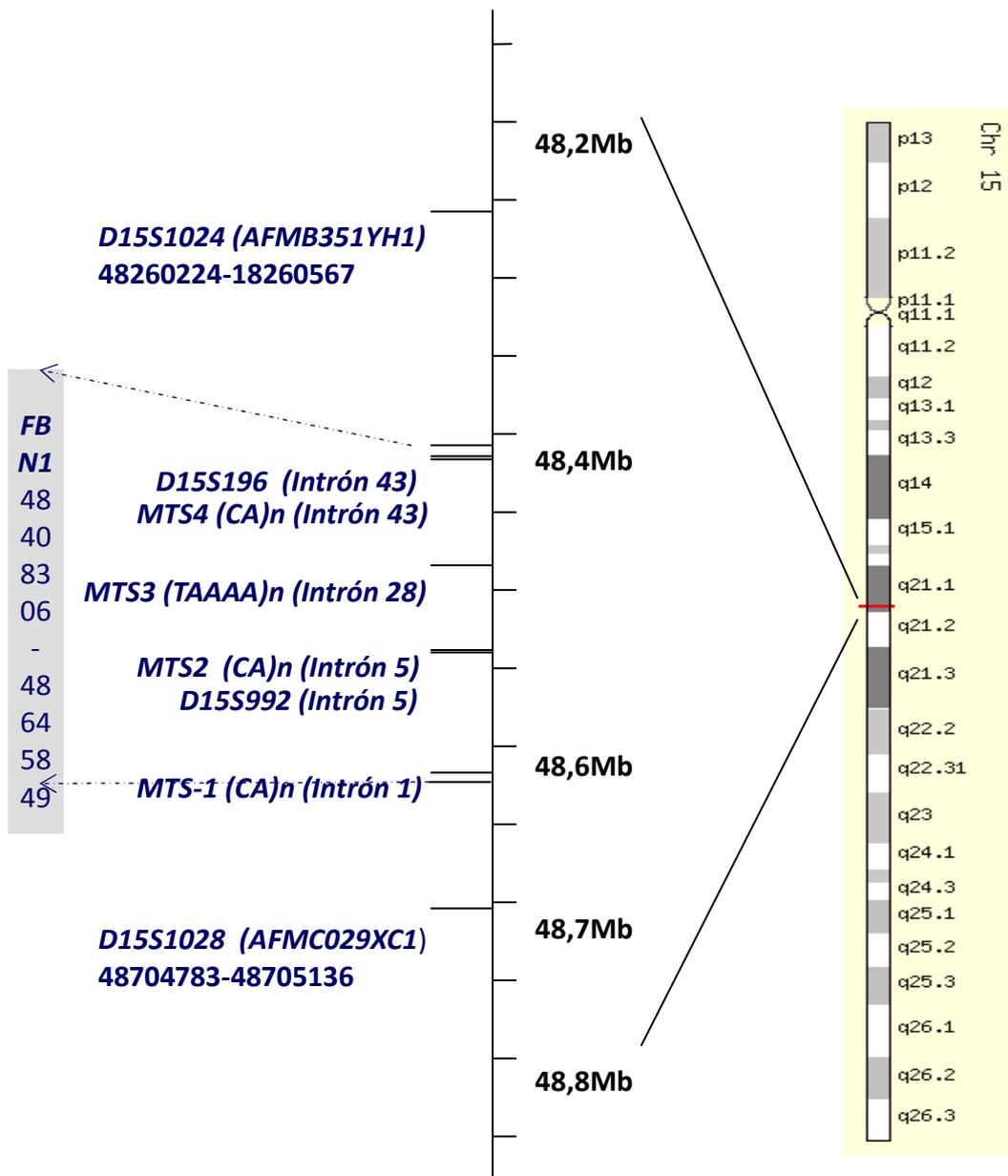


FIGURA 27



5.4. OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DEL PROTOCOLO DE WGA DE BLASTÓMERAS MEDIANTE MDA Y POSTERIORES APLICACIONES SOBRE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS.

Hemos optimizado y adaptado el método de Kumar (Kumar *et al.*, 2008) para la aplicación de MDA sobre ADN de blastómera. El protocolo se realiza con el kit Genomiphi (GE Healthcare), siguiendo los siguientes pasos:

1. Realizar el *tubing* de la forma habitual en tampón de lisis alcalina.
2. Guardar las muestras a -80°C durante al menos 30 min.
3. Realizar la lisis alcalina a 65°C durante 15 min. Dejar las muestras a 30°C mientras se preparan los siguientes reactivos.
4. Añadir 1,5 µL de neutralization buffer (Tricina)
5. Añadir 14 µL de mix de amplificación:
 - 4 µL sample buffer
 - 9 µL reaction buffer
 - 1µL enzyme mix
6. Incubar durante 4h a 30°C
7. Incubar durante 10 min a 65°C para la inactivación de la enzima.
8. Preservar a -20°C

Como mecanismo de control de calidad, en todas las reacciones que se llevan a cabo se incluyen 2 controles de contaminación, consistentes en un microtubo con tampón de lisis exclusivamente, y otro microtubo con el tampón de lavado de las blastómeras. De esta forma se puede tener el control de posibles

contaminaciones con otras fuentes de ADN ajenas al propio contenido celular de las blastómeras. Una vez finalizadas las reacciones de MDA, como aproximación rápida, se procede a visualizar parte del producto de MDA (2 μ L) mediante electroforesis en gel de agarosa. Esto nos permite conocer si el MDA ha sido eficiente, así como tener conocimiento de posibles fenómenos de contaminación. Así mismo procedemos a cuantificar el rendimiento de la reacción mediante medición de los valores de absorbancia a $\lambda=260\text{nm}$ en el espectrofotómetro Nanodrop, que permite realizar dichas mediciones con una sola microgota del producto (alrededor de 1 μ L). Una vez calculados los valores de concentración de cada uno de los productos MDA generados, se preparan las diluciones oportunas para obtener alícuotas de trabajo usando buffer TE estándar (10 mM Tris-HCl and 0.1 mM EDTA, pH 7.5 - 8.0). Los stocks se conservan a -20°C .

Desde noviembre de 2011, hemos realizado 31 ciclos de PGD con la aplicación de MDA a 22 pacientes. Los resultados iniciales se presentaron en el VII Congreso Asebir, Sevilla 2013 (Lozano *et al.*, 2013).

Las indicaciones han sido:

- Un caso de HA que se eligió para poner en marcha la técnica MDA en ciclos reales de PGD, que además terminó en embarazo.
- Tres casos de FQ en el que los marcadores STRs no eran suficientemente informativos, por lo que se hubo de proceder a análisis molecular directo de las mutaciones responsables del cuadro.
- Dos casos de FRAX. En uno de ellos la mujer era portadora de un alelo *FMR1* con premutación, y se realizó con semen de donante (por lo que a

priori se desconocía la informatividad de los marcadores STRs habitualmente empleados para el análisis indirecto). En el otro caso de FRAX, en los estudios de informatividad previos se había observado la existencia de posibles eventos de recombinación entre los marcadores empleados.

- Cuatro casos de PAF causados por una mutación *de novo* en el gen *APC*.
- Dos casos de Enfermedad de Machado-Joseph (OMIM#109150), causados por una expansión de tripletes CAG en el gen *ATXN3* (OMIM*607047) demasiado grande para poder amplificarse mediante PCR convencional, y sin STRs vecinos informativos.
- Siete casos de PGD en combinación con la determinación de antígenos HLA (PGD-HLA). Al requerirse la genotipación de un alto nº de STRs, es preferible optar por la posibilidad de contar con ADN de partida suficiente para poder repetir PCRs de marcadores independientes en caso de que fuera necesario.
- Dos casos de Atrofia Muscular Espinal
- Un caso de Marfan

De los 31 ciclos se biopsiaron un total de 164 embriones. De las 164 blastómeras se obtuvo diagnóstico en 149 (90.8%), siendo la tasa de ADO < 5%. De los 31 ciclos, 14 tuvieron transferencia (media: 1.5 embriones transferidos). Se han logrado 4 gestaciones clínicas (HA, X-frágil, FQ, AME), con una tasa de implantación del 28.5%. Dos ha terminado en parto (uno único (HA) y el otro doble (X-Frágil)), la tercera es una gestación única (FQ) en su 3º trimestre y la cuarta es doble en su 2º trimestre (AME). No se han encontrado discordancias

entre el diagnóstico genético preimplantatorio y el diagnóstico postnatal de los niños nacidos.

Se han realizado 7 ciclos de TEC resultando 3 gestaciones bioquímicas que no han evolucionado.

Nos centraremos en explicar en detalle alguno de estos casos más interesantes.

5.4.1. Secuenciación sobre productos de MDA de ADN de blastómeras: Secuenciación de un fragmento del exón 15 del gen APC

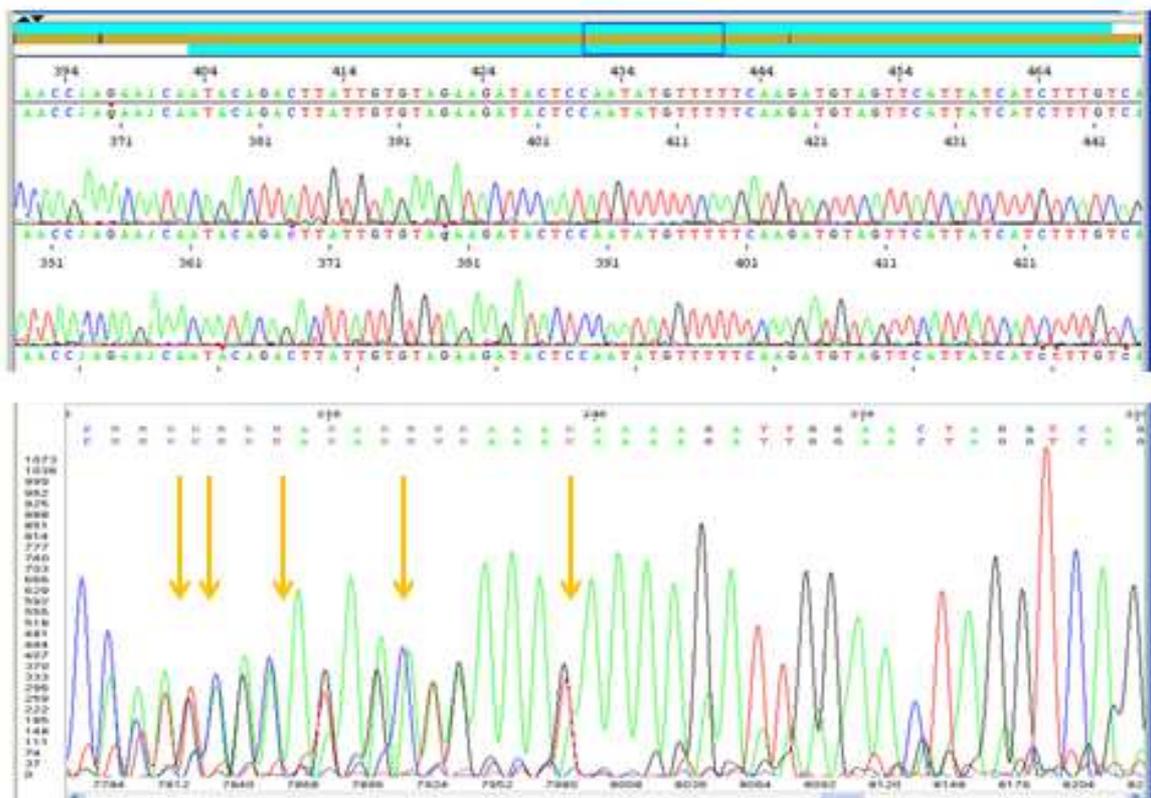
Una de las parejas solicitantes de nuestro Programa PGD solicitaba la inclusión en dicho programa por ser la mujer portadora de una mutación *de novo* en el exón 15 del gen APC. La mutación en concreto portada por esta paciente, es una de las mutaciones más deletéreas descritas en el gen hasta la fecha, y una de las más comunes asociadas a la enfermedad. Se trata de una delección de 2 pares de bases que genera una alteración en la pauta de lectura de la proteína, dando lugar a un codón de stop prematuro y por tanto una proteína defectuosa más corta: c.3378-3379delCA (p.Glu1260Aspfs*15). El diagnóstico molecular de esta mutación se lleva a cabo mediante secuenciación automática de un fragmento del exón 15 que incluye la posición donde se ubica dicha mutación.

Dado que la paciente era el único miembro de su familia que portaba esta mutación, no era posible inferir qué combinación específica de marcadores STRs estaba ligada a la enfermedad. Por consiguiente, en el primer ciclo de PGD realizado a la pareja, se procedió a realizar WGA sobre el ADN de las blastómeras biopsiadas de cada uno de los 11 embriones resultantes. Tras la obtención de los productos de MDA, y preparación de las alícuotas de trabajo a 25ng/μL, se procedió a realizar la PCR específica para amplificación del

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

fragmento del exón 15 de *APC*, usando los primers APC15EF-F (GTAAGCCAGTCTTTGTGTCAAGAAGAT) y APC15EF-R (CGACTCTCAAAC TATCAAGTGAAGT), y el siguiente programa de PCR (94°C-9´)→[(94°C-30´)→(65°C-1´)→(72°C-1´)]x25→(72°C-10´)→(4°C-∞). Los productos obtenidos fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones, siguiendo el protocolo descrito en la sección de métodos. El análisis de los resultados de secuenciación reveló la presencia de la mutación estudiada en 6 de los embriones, mientras que los otros 5 no la portaban. En la siguiente figura (Figura R28) se muestra el electroferograma de la secuenciación bidireccional obtenido para un producto de MDA procedente de un embrión no portador de la mutación (arriba), y de un embrión portador (abajo). En presencia de la delección se observa una alteración de la pauta de lectura (dobles picos), que el software de análisis sólo puede procesar en una dirección.

Fig. R28



Por otra parte, una vez catalogados los embriones como portadores o no de la mutación responsable de PAF, se procedió al análisis molecular indirecto para verificar que todos los embriones portadores compartían la misma combinación de marcadores STRs heredados por vía materna. Esto permitió inferir el haplotipo asociado a la enfermedad, para poder realizar el PGD mediante estudio indirecto (mucho más simple y rápido) en futuros ciclos de la pareja. Asimismo se pudo confirmar la ausencia de contaminación y de ADO en todos los productos de MDA correspondientes a cada embrión.

5.4.2. PCR fluorescente para testar grandes expansiones sobre productos de MDA de ADN de blastómeras: Análisis de la expansión responsable de enfermedad de Machado-Joseph.

La enfermedad de Machado Joseph o ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por la expansión del triplete CAG del gen *ATXN3*. Los alelos normales tienen entre 12 y 44 repeticiones CAG, los alelos intermedios presentan entre 45 y ~60, y los alelos con mutación completa tienen entre >60 repeticiones, aunque estos límites no están muy bien definidos. La amplificación por PCR convencional de alelos con alto nº de repeticiones no es fácil y la PCR requiere bastante ADN de partida para minimizar la amplificación preferencial de alelos no expandidos. Por ello, no se puede garantizar que por PCR directa sobre el ADN de una blastómera se vaya a lograr la amplificación de alelos con expansión. La dificultad añadida está en que en las proximidades del locus donde se ubica esta expansión no hay marcadores STRs altamente informativos, por lo que el estudio indirecto no es fácil tampoco. Así pues, se procedió a realizar MDA sobre las blastómeras

biopsiadas de los embriones resultantes de los ciclos de PGD de dos parejas con uno de los dos miembros afectados de la enfermedad. Sobre esos productos de MDA se procedió a realizar la PCR específica para amplificación del fragmento que contiene el tracto de tripletes CAG en *ATXN3*, utilizando para ello los primers MJD25 (FAM-TGGCCTTTCACATGGATGTG) y MJD52 (CCAGTGACTACTTTG ATTCG), y el siguiente programa de PCR: (95°C-5')→[(95°C-1')→(60°C-1')→(72°C-2')]x35→(72°C-7')→(4°C-∞).

Mediante el análisis de resultados, observamos que la expansión era detectable sobre los productos de MDA, permitiendo así la identificación de los embriones portadores de la enfermedad.

Tabla R18: Datos clínicos de los ciclos de PGD-SCA3 en HUVR

PGD para Ataxia Espinocerebelosa (SCA3)	
Número de parejas	2
Edad media (Rango)	34.8 (31-38)
Ciclos puncionados	6
Ovocitos MII recuperados	29
Ovocitos fecundados	14
Ciclos con biopsia	4
Embriones biopsiados	11
Embriones con diagnóstico	8
Ciclos informativos	4
Ciclos con transferencia en fresco	2

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Tasa de transferencia en fresco	33.3%
Ciclos de TEC iniciados	0
Ciclos de TEC transferidos	0
Gestaciones bioquímicas totales (fresco / congelado)	1
Gestaciones clínicas totales (fresco / congelado)	0
Tasa de implantación	0
Tasa de gestación clínica por pareja	0
Partos totales (fresco / congelado)	0
Recién nacidos (fresco / congelado)	0
Tasa de parto por pareja	0

5.4.3. MLPA sobre productos de MDA de ADN de células únicas

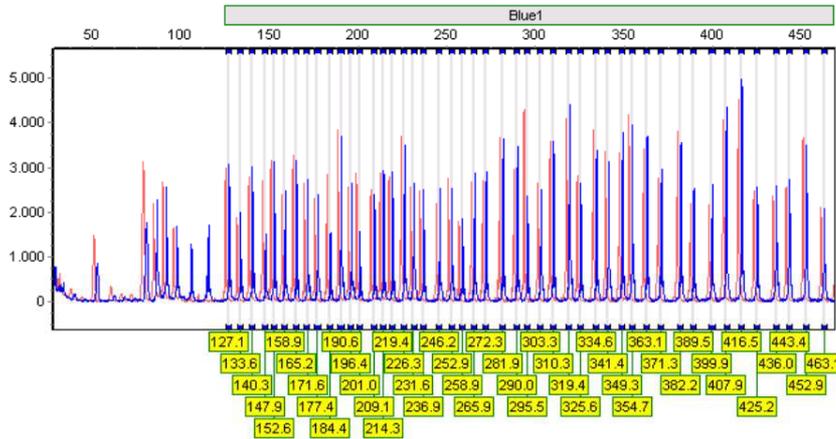
Existe un nº considerable de patologías producidas por deleciones o duplicaciones de tamaño medio, tales como AME, DMD/DMB, CMT1A, etc... Aunque para muchas de ellas nuestra Unidad dispone de métodos de PCR multiplex para análisis molecular indirecto con STRs, es cierto que podría darse la circunstancia de que para alguna familia en particular los marcadores no fueran suficientemente informativos. Por ello, aunque no se ha aplicado a ningún ciclo real de PGD, sí que se ha intentado optimizar la técnica MLPA sobre productos MDA de ADN de ovocitos o blastómeras de embriones no viables cedidos por las parejas para fines de investigación. Elegimos un kit de MLPA para testar los síndromes microdeleccionales descritos más frecuentes, dado que dicho kit contiene sondas que hibridan por diversas regiones del genoma. Se trata del *SALSA MLPA KIT P245-A2 Microdeletion Syndromes*

(MRC Holland) que incluye los tests de: delección 1p36, microdelección 2p16, microdelección 3q29, microdelección 9q22.3, delección 15q24, microdelección 17q21, síndrome 22q13/Phelan-Mcdermid, Cri du Chat (5p15), DiGeorge (regiones 22q11 y 10p15), Langer-Giedion (8q), Miller-Dieker (17p), microdelección NF1, Prader-Willi / Angelman o de duplicación en 15q11, síndrome de Rett o de duplicación en Xq28, Rubinstein-Taybi (16p13.3), Smith-Magenis/Potocki-Lupski (17p11.2), Soto (5q35.3), Wagr (11p13), Williams (7q11.23) o de Wolf-Hirschhorn (4p16.3). Aplicamos el protocolo general de MLPA, descrito en la sección de metodología, partiendo de alícuotas de trabajo de los productos de MDA preparadas a diferentes concentraciones. Los resultados más uniformes se obtuvieron para concentraciones de productos de MDA a 100ng/μL, aunque será necesario hacer futuras optimizaciones de los métodos de MLPA para las patologías en cuestión para las que se realice PGD en futuros ciclos. El plot de MLPA utilizando el kit P245 sobre el producto de MDA obtenido a partir de una de las blastómeras biopsiadas de embriones no transferibles se puede observar en la figura R29.

Fig. R29

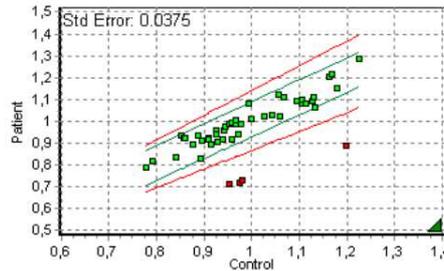
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.60	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Regression T-Dist
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 9/24/2008 - 13:49:11	Quantification By: Peak Height
Panel: RM_P245	Classification: Confidence Limit: 99.00 (Population)
Control: 10486_G09_034.fsa	Report Value Type: Peak Ratio

8375_D05_021.fsa



Sample Name: 8375
Machine: ABI3730-17121-029
Run Time: 7/9/2008 - 10:44:2 -> 7/9/2008 - 11:26:19

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



	Probe Name	Bin Size	8375_D05_021
1	15q24 del syndr	190.6	96%
2	15q24 deletion	325.4	94%
3	17q21 mdeletion	471.3	86%
4	17q21 microd 2	341.3	93%
5	17q21 microdel	226.4	94%
6	1p36 del synd a	127.2	103%
7	1p36 del synd b	165.2	97%
8	1p36 del synd c	177.4	104%
9	22q13/ Phelan M	253.0	92%
10	2p16.1 delet sy	481.6	95%
11	2p16.1 deletion	285.8	107%
12	3q29 deletion	354.7	95%
13	3q29 deletion b	416.6	110%
14	9q22.3 deletion	408.2	107%
15	9q22.3 syndrom	319.2	108%
16	Cri du Chat	281.8	99%
17	Cri du chat b	436.4	110%
18	DiGeorge 10p	133.7	107%
19	DiGeorge 22q	196.3	103%
20	DiGeorge 22q b	209.2	95%
21	DiGeorge syndr	371.3	108%
22	DiGeorge(10p) 2	349.3	113%
23	Langer-Giedionf	400.0	120%
24	Langer-Giedionc	425.5	103%
25	MECP2/Xq28dup	148.0	55%
26	MECP2/Xq28dup	184.3	54%
27	MECP2/Xq28dup	201.1	55%
28	Miller Dieker	236.8	101%
29	Miller-Dieker	140.4	107%
30	NF1 microdelet	258.8	103%
31	NF1 microdelet2	334.5	88%
32	PW/Angelman	158.9	104%
33	PW/Angelman b	214.4	102%
34	PW/Angelman c	246.2	115%
35	PW/Angelman d	289.9	118%
36	Phelan-McDermi	382.3	93%
37	Rubinstein Tayb	171.5	104%
38	Smith Magenis	272.3	107%
39	Smith Magenis b	303.2	95%
40	Smith-Magenis s	463.2	98%
41	Sotos syndrome	453.0	96%
42	Sotos syndrome	152.7	99%
43	Wagr syndrome	219.6	104%
44	Williams synd b	363.1	108%
45	Williams synd c	389.6	116%
46	Williams syndr	310.1	100%
47	Wolf-Hirschhorn	231.7	103%
48	Wolf-hirschhorn	443.5	107%
49	X control probe	295.4	55%

5.5. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA CGH PARA LA DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS Y OTROS REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS DESEQUILIBRADOS EN BLASTÓMERAS

La aplicación de CGH para detección de aneuploidías combinada con el análisis genético de la enfermedad monogénica en riesgo, sería una solución ideal para las parejas de PGD. Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral era la valoración de la técnica CGH para la detección de reordenamientos en los embriones de los ciclos de PGD, objetivo enmarcado dentro del proyecto de investigación 2012PI/097 de la Junta de Andalucía. Para dicho objetivo se contaba con la plataforma de arrays CGH de NimbleGen-Roche, que lamentablemente en 2013 la empresa decidió discontinuar, así como los arrays y reactivos necesarios para su uso. Por ello se decidió, como paso inicial para la valoración de la idoneidad de la técnica y de la adquisición de otra plataforma, externalizar los experimentos de aCGH. Consideramos que podría resultar muy interesante analizar blastómeras de embriones resultantes de ciclos PGD que hubieran quedado bloqueados tras la biopsia, para analizar si había alteraciones cromosómicas recurrentes responsables de la no progresión de dichos embriones. Con este fin se realizó la biopsia de un total de 17 blastómeras a partir de 17 embriones obtenidos de 4 ciclos de PGD en 4 parejas, que previamente habían cedido mediante consentimiento informado este material para este objetivo de investigación en particular.

Las 17 blastómeras fueron entubadas en microtubos de 0,2 mL con 2.5 μ L de tampón de lavado PBS 1X + 0.1% PVA, y preservadas a -80°C hasta el

momento del envío (< 1 semana). El análisis mediante aCGH de cada una de esas blastómeras fue realizado por la empresa Bioarray S.L., tras una WGA con la técnica SurePlex DNA Amplification System y el protocolo de aCGH 24Sure (Illumina). Los resultados se muestran en la figura R34, destacando el alto nº de embriones con tan alto nº de alteraciones detectadas que fueron catalogados como caóticos.

Embrión ID	Resultado	Resumen
#C1	Caótico	Alterado, Varón
#C2	Caótico	Alterado, Varón
#C3	Caótico	Alterado, Varón
#C4	45, XY, -2, dup(7p) dup(Xp)	Alterado, Varón
#C5	44, XY, -2, -15	Alterado, Varón
#C6	44, XX, -2, -9	Alterado, Varón
#C7	Caótico	Alterado, Mujer
#C9	43, X0, -4, -12	Alterado, Mujer
#V2	46, XY, del(7p)	Alterado, Varón
#V6	46, XY, +8, -13	Alterado, Varón
#E1	44, XX, -16, -19	Alterado, Mujer
#E6	46, XX	Normal, Mujer
#E10	Caótico	Alterado, Varón
#E11	Caótico	Alterado, Mujer
#E13	Caótico	Alterado, Varón
#E11'	Caótico	Alterado, Varón
#E5	Fallo de Amplificación	-

Las alteraciones encontradas en cada célula se puede visualizar en el apartado de Anexos (Anexo c).

DISCUSION

6. DISCUSION

En esta tesis doctoral se recogen 10 años de experiencia de un programa de PGD en un sistema sanitario público español, desde su inicio en el año 2005.

Su puesta en funcionamiento no fue sencilla. El PGD se realizaba en Europa y EEUU pero no era una práctica habitual en los centros de reproducción asistida españoles. De hecho, en ese momento, solo se realizaba en nuestro país en algunos centros privados de reconocido prestigio y en una fundación madrileña, pero en ningún centro público.

A esto hay que añadir la falta de estandarización de todo el proceso de PGD. Las tres sociedades científicas relacionadas con este campo, ASRM, Consorcio para PGD de la ESHRE y PGDIS acababan de publicar sus respectivas Guías para la correcta aplicación del PGD, pero la rapidez en la evolución de nuevas tecnologías y nuevas indicaciones del PGD hacían necesaria su continua actualización, algo difícil de realizar. No es hasta el año 2011 cuando el Consorcio de la ESHRE publica 4 Guías de práctica clínica, estandarizando el PGD en Europa.

Para realizar un programa de PGD íntegro en un centro es necesario un Laboratorio de FIV y un equipo clínico con amplia experiencia en Técnicas de Reproducción Asistida, capaces de obtener altas tasas de gestación en los programas de FIV, además de un Laboratorio de Genética con amplia experiencia en técnicas de citogenética y biología molecular capaces de adaptar los análisis genéticos a niveles de célula única. La UGCGRMF reunía esos requisitos, de forma que en octubre de 2005 se realizan los 3 primeros

ciclos de PGD para enfermedades ligadas a X mediante FISH (Enfermedad de Duncan, Distrofia Muscular de Duchenne y Hemofilia B), consiguiéndose la primera gestación del programa en el caso de Duchenne que culminó con el nacimiento de una niña.

Inicialmente para la determinación de sexado se empleó FISH, utilizándose protocolos ya publicados (Velilla et al., 2002). Si bien la metodología más generalizada para la fijación de blastómeras era la de Tarkowski, las dificultades para conseguir condiciones de temperatura y humedad estables en nuestras instalaciones nos llevaron a adaptar el método de Dozortsev con algunas modificaciones. Con esta metodología se consiguió diagnosticar el 83,39% de los embriones analizados, consiguiéndose unas tasas de gestación clínica del 14% por punción y del 25.9% por pareja (las tasas de parto del 10% y 18.5% respectivamente).

Por otra parte, en octubre de 2006 se realizó en esta Unidad el primer caso de PGD para enfermedad monogénica (Corea de Huntington) mediante metodología basada en PCR múltiple fluorescente y con un protocolo original publicado años más tarde (Peciña *et al.*,2010).

En noviembre de ese mismo año se realizó un segundo ciclo para enfermedad monogénica basado también en PCR, concretamente para Fibrosis Quística, con otro protocolo original consiguiéndose la primera gestación y posterior nacimiento de dos bebés, un niño y una niña libres de enfermedad, con esta metodología.

Tras el éxito conseguido se opta por seguir desarrollando nuevos protocolos basados en PCR y a lo largo del año 2007 se pone a punto un protocolo

original para la determinación de sexo en enfermedades ligadas al cromosoma X mediante PCR. De esta forma se dejó de realizar FISH para sexado, con la ventaja del ahorro de tiempo en los ciclos y la simplificación del proceso, puesto que la fijación de las blastómeras no dejaba de ser un proceso muy engorroso. También repercutió en los resultados clínicos. Se pasó de una tasa de informatividad (embrión con diagnóstico) de un 83.3% con FISH a un 91.1% con PCR, y unas tasas de gestación clínica y de parto por pareja de un 25.9% y 18.5% con FISH a un 33.3% y 26.6% con PCR (Tablas R6 y R9).

De forma paralela se ponen a punto los protocolos específicos para DMD/DMB y al año siguiente para HA. Esta incorporación supuso una importante novedad con gran trascendencia clínica, pues permitía discernir entre estado de sano, portador o afecto en las enfermedades ligadas a X (en nuestro caso para DMD/DMB y HA) y por lo tanto no descartar el 50% de embriones varones sanos que inevitablemente ocurría con las metodologías de sexado. A principios de 2008 se consigue la primera gestación y posterior nacimiento de una niña con esta metodología.

Hay que recordar que las primeras gestaciones conseguidas en los años 90 fueron en ciclos PGD para enfermedades ligadas al cromosoma X utilizando PCR. En aquella época el método era realizar sexado amplificando una región del cromosoma Y (altamente repetitiva), de forma que si se observaba una banda en el gel de PCR, el diagnóstico era sexo masculino, y si no se observaba banda era sexo femenino y por lo tanto transferible. De los 21 ciclos que se realizaron hubo un error de diagnóstico y nació un niño afecto. El problema es que la ausencia de banda podía ser también debido a un fallo en

la entubación de la blastómera, a la ausencia de núcleo en la misma, a un fallo de amplificación de PCR o al ADO (desconocido en aquella época) por lo que esta metodología fue denostada durante mucho tiempo y sustituida por la FISH (Griffin *et al.*, 1992).

Con el protocolo introducido en 2007 para pacientes portadores de DMD/DMB y en el 2008 para HA, conseguimos aumentar el pool teórico de embriones transferibles a un 75% (con metodologías de sexado un 50%), evitando el descarte de preembriones sanos varones, consiguiendo aumentar las tasa de transferencia en fresco y en el caso de HA aumentar las tasas de gestación clínica y de parto por pareja de forma considerable (del 33.3% al 47.6% y del 25 al 42.8%) (Tablas R10 y R11).

Esta metodología y la mejora en los resultados obtenidos para la Hemofilia han sido comunicados en el Congreso europeo de Hemofilia 2014 (Lozano *et al.*, 2014) y recientemente publicados (Fernández *et al.*, 2015).

En el año 2008, tras la ampliación de indicaciones del Decreto 156/2005, se vuelve a dar otro importante paso, al autorizarnos realizar un caso de PGD-HLA en una pareja con un hijo afecto de Beta talasemia mayor. Desarrollando de nuevo otro protocolo original (no es hasta 2011 cuando el Consorcio europeo de la ESHRE publica unos estándares mínimos para PGD-HLA mediante PCR), nace el primer niño de un ciclo PGD-HLA realizado íntegramente en España y en un centro público. Se trató de un caso de especial relevancia pues tras el nacimiento de este niño libre de enfermedad (BTM) y HLA compatible con su hermano afecto, el Servicio de Hematología de Virgen del Rocío de Sevilla conseguía realizar con éxito el trasplante de

precursores hematopoyéticos a partir del cordón umbilical previamente congelado por un banco público de cordón de Málaga, todo un ejemplo de colaboración interdisciplinar (Fernández *et al.*, 2013). Este caso supuso el primero realizado íntegramente en España y además en un centro público.

También se introduce en el 2008 otro protocolo original para Atrofia Muscular Espinal, en 2009 para Enfermedad de Steinert cuyos resultados han sido comunicados en el Congreso de la SEF 2012 (Lozano *et al.*, 2012), en 2010 para Síndrome de X Frágil (Fernández *et al.*, 2015 en prensa) y en 2011 para Poliposis Adenomatosa Familiar y Síndrome de Marfan.

De esta forma quedaban cubiertas la mayoría de las indicaciones recogidas en el Decreto 156/2005 y su ampliación, menos la Ataxia Espino cerebelosa tipo 3 (SCA 3), algunos casos de mutaciones puntuales *de novo* (PAF) y otros casos con marcadores no informativos o complejos. Para estos casos se necesitaba mayor cantidad de ADN de partida para la aplicación de las técnicas diagnósticas apropiadas. Esto implicaba que familias en estas circunstancias no eran susceptibles de beneficiarse de esta opción reproductiva, ya que el diagnóstico no era seguro ni fiable, primera premisa del PGD. A finales de 2011 se pone a punto en nuestra Unidad la técnica MDA que ha permitido realizar con éxito los ciclos de PGD en estos casos. Estos datos han sido comunicados en el VII Congreso Asebir 2013 (Lozano *et al.*, 2013).

En cuanto a los resultados generales del programa detallados en la tabla R2, quisiera destacar la tasa de informatividad del programa global, del 90.4%. Aunque los resultados clínicos se pueden expresar de muchas maneras, he querido reflejar en esta tesis la tasa de parto para cada una de las

enfermedades, dato difícil de encontrar en los registros tanto de la SEF o de la ESHRE pues no todos los centros ni todos los países reportan este dato, que considero de gran valor pues refleja la realidad para los usuarios de estas técnicas.

La tasa de parto por ciclo puncionado del programa global ha sido de 13.8%, por transferencia del 18,3% y por pareja que inicia el programa ha sido del 25%. Hay que tener en cuenta que aquí está representado el programa global, incluido el PGD-HLA, y con la particularidad de que durante los 10 años de recogida de datos, nunca se han hecho transferencias de 3 embriones para evitar las grandes gestaciones múltiples. Desglosado hay grupos más favorables como la HA, pero al haber grupos con número muy pequeño de pacientes no encuentro valor ninguno el hacer una comparativa entre ellos.

En el de la SEF se estima una tasa de parto por punción de alrededor del 13% y en la ESHRE (Montou *et al.*, 2014) en sus últimos registros del 18%, pero no son datos definitivos por lo comentado anteriormente, y por lo tanto no comparables.

Destacar también que no se ha constatado ningún error de diagnóstico en los nacidos hasta el momento.

Por otra parte, como indican nuestros resultados (Tabla R3) y lo avalan los datos recogidos en los distintos registros de la ESHRE, la tasa de implantación de los programas de FIV y de PGD no es alta. Varía según la bibliografía consultada (Montou *et al.*, 2014, Sermon KD *et al.*, 2007) desde un 15 a un 22% aproximadamente en el caso del PGD. La puesta a punto de la MDA como método de amplificación de genoma completo, las mejoras en las técnicas de

biopsia y los métodos de diagnóstico que permiten la biopsia de sólo una célula y los avances experimentados en el campo del PGS, también nos ha llevado a plantearnos la posibilidad de realizar en célula única el diagnóstico de una enfermedad monogénica y el *screening* de todo el complemento cromosómico. Sin embargo, la literatura actual está poniendo de manifiesto que la MDA no es el mejor método de WGA para este propósito (de Bourcy *et al.*, 2014). Ante esta realidad y la imposibilidad de realizar el análisis de CGH en nuestra Unidad por las razones previamente comentadas, se decidió hacer una valoración previa de las ventajas de esta estrategia para considerar su implementación en nuestro servicio, externalizando un estudio a un laboratorio externo. Dentro del proyecto de investigación 2012PI/097 se han analizado 17 blastómeras de 17 preembriones bloqueados posteriores a la biopsia. De ellos uno quedó sin diagnóstico, otro fue euploide y 15 presentaron alguna alteración cromosómica (siendo la mayoría caóticos), probablemente responsables del bloqueo en su desarrollo.

Como consecuencia de este estudio, determinar el diagnóstico de una enfermedad monogénica y el *screening* de todo el complemento cromosómico a partir de la biopsia de solo una blastómera, se nos presenta para el futuro como un objetivo de trascendencia clínica, pues evitará transferencias innecesarias acortando el tiempo para conseguir una gestación y permitirá la transferencia electiva de embrión único en el programa de PGD, disminuyendo la tasa de múltiples.

El programa de PGD se ha desarrollado con éxito en la UGCGRMF, como lo avalan los resultados. Esto ha sido motivo de los diversos premios que ha

recibido la UGCGRMF, entre ellos el Premio CANF de Oro “Por los éxitos conseguidos en la rama de las enfermedades hereditarias gracias al desarrollo del Diagnóstico Genético Preimplantatorio”.

Un total de 48 mujeres han tenido hijos sanos a través de este programa y 6 están a punto. Hay que destacar que el centro de este programa siempre han sido sus usuarios. Desde el principio se optó por reducir al mínimo las consultas necesarias en beneficio de los pacientes, al tener éstos que desplazarse desde las distintas provincias andaluzas. En cuanto a las listas de espera podemos destacar que desde un punto de vista realista, teniendo en cuenta la demora de los ciclos FIV y del entorno en que nos movemos (sistema público), éstas no han sido significativas (3-6 meses para un primer ciclo). No obstante sí que se ha observado a lo largo de estos años una mayor derivación de pacientes desde las provincias más cercanas.

En el año 2013 se consultó telefónicamente a las parejas que no habían quedado gestantes después de entrar en nuestro programa, sobre sus opciones reproductivas. El 57% ha preferido no tener hijos biológicos, y de las que sí han querido, el 76% ha elegido el DP, el 10% el PGD en centros privados, el 8 % la donación de gametos y el 6% la concepción natural (datos comunicados en el Congreso de la ESHRE 2014 (Laura Buil *et al.*, 2014).

Según un informe editado en 2012 por la Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (López-Pedraza *et al.*, 2012), la implantación de un programa de PGD supone una inversión inicial de aproximadamente 152.000 €, y cada uno de los ciclos unos 5300 € (incluyendo todos los costes). Si bien es cierto que una interrupción voluntaria del embarazo (IVE) es estimada en 1270 €, se

podría pensar que el PGD es muy caro. Sin embargo no podemos cuantificar el daño moral para las parejas ante una IVE, y tampoco el coste emocional y también social del nacimiento de un niño/a con una Enfermedad Rara.

En la nueva edición de la Guía sobre TRA del SSPA, se sigue designando a esta Unidad como centro de referencia, y se abre el abanico de indicaciones a las alteraciones cromosómicas estructurales y aunque no queda suficientemente claro en esta Guía, es posible que entremos en una nueva era de “PGD a la carta en el SSPA”.

CONCLUSIONES

7.CONCLUSIONES

1. Los 10 años de experiencia desde la incorporación del PGD en el SSPA avalan que este programa está consolidado como una opción reproductiva para aquellas parejas que presentan un alto riesgo de transmitir una enfermedad genética a su descendencia.
Contribuye a la interrupción de la transmisión familiar de las enfermedades hereditarias, lo que a corto plazo supone un alivio del sufrimiento familiar, mientras que a largo plazo puede tener gran importancia social y sanitaria al reducir el número de pacientes afectados de estas dolencias.
2. Los resultados obtenidos en cuanto a tasas de parto para cada una de las distintas enfermedades, reflejan la realidad en nuestro entorno para los usuarios de esta opción reproductiva. La tasa de parto por pareja del programa global es del 25%.
3. La PCR múltiple fluorescente se considera el método “gold standard” para la práctica del PGD de enfermedades monogénicas. El protocolo original para sexado por PCR ha mejorado los resultados en las enfermedades ligadas a X y simplificado el trabajo al relegar la FISH.
4. Con el protocolo específico para la HA y DMD/DMB se consiguen aumentar las tasas de gestación en estas pacientes de una forma considerable respecto a la metodología FISH. De relevante importancia es que ya no se descartan varones sanos en estos grupos.

5. Con la aplicación de la técnica MDA se obtiene de forma eficiente gran cantidad de ADN a partir del material genómico de partida de una blastómera, para aplicar a posteriori una amplia variedad de técnicas como las descritas en esta tesis, ampliando las posibilidades de realizar PGD en un mayor número de familias. Además permite analizar un alto número de loci aumentando la fiabilidad del diagnóstico genético, de gran importancia en el PGD-HLA. También se evitan las rebiopsias al poder realizar repeticiones.
6. Las técnicas de WGA permiten realizar análisis de alteraciones cromosómicas de todo el complemento, sin necesidad de extraer una segunda célula al preembrión. Su puesta a punto permitirá realizar las transferencias de embriones sanos y euploides, acortando el tiempo para conseguir embarazo en las mujeres y facilitando la incorporación de las transferencias de embrión único en el programa.
7. El programa de PGD en la UGCGRMF es un programa eficiente orientado hacia un “PGD a la carta”, en beneficio de los usuarios afectados por las distintas Enfermedades Raras.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

REFERENCIAS

8.REFERENCIAS

1. Alikani M, Cohen J, Tomkin G et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy implantation. *Fertil Steril* 71: 836-842, 1999.
2. Alikani M, Calderón G, Tomkin G et al. Cleavage anomalies in human embryos and survival after prolonged cultura in-vitro. *Human Reproduction*, 15: 2634-2643.
3. Apeiros A, Abou-Sleiman PM, Harper JC, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of the fragile X syndrome by use of linked polymorphic markers. *Prenat Diagn.* 2001, 21:504-511.
4. Buil L, Garcia Lozano JC, Lozano MD, Sánchez B, Peciña A, Borrego S, Antiñolo G. Preimplantation genetic diagnosis and other reproductive options for couple carriers of genetic diseases: comparison of the efficacy and acceptance. Congreso ESHRE 2014.
5. Carrillo-Vadillo R, García-Lozano JC, Lozano Arana MD, Moliní Rivera, JL, Sanchez Martín P, Antiñolo G. Two sets of monozygotic twins after intracytoplasmic sperm injection and transfer of two embryos on day 2. *Fertil Steril* 88:1676.e3–5, 2007.
6. Coskun S, Alsmadi O. Whole genome amplification from a single cell: a new era for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*, 27:297-302, 2007.
7. Dean NL, Tan SL, Ao A. The development of preimplantation genetic diagnosis for myotonic dystrophy using multiplex fluorescent polymerase chain reaction and its clinical application. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:895-

- 901.
8. De Bourcy CFA, De Vlaminkl, Kanbar JN, Wang J, Gawad G, et al. (2014). A quantitative Comparison of Single-Cell Whole Genome Amplification Methods. *PLoS ONE* 9(8):e105585.
 9. Dreesen JC, Jacobs LJ, Bras M, Herbergs J, Dumoulin JC, Geraedts JP, Evers JL, Smeets HJ. Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene; a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod.* 2000, 6:391-396.
 10. Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Laila JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J. PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update*, 7:591-602, 2001.
 11. El-Hashemite N, Delhanty JD. A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod*, 3 (11): 975-978, 1997.
 12. Fernández RM, Peciña A, Lozano-Arana MD, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. Novel One-Step Multiplex PCR-Based Method for HLA Typing and Preimplantational Genetic Diagnosis of α -Thalassemia. *Biomed Res Int* 2013; 2013:585106.
 13. Fernández RM, Peciña A, Sánchez B, Lozano-Arana MD, García-Lozano JC, Pérez-Garrido R, Núñez R, Borrego S, Antiñolo G. Experience of Preimplantation Genetic Diagnosis for Hemophilia at the University Hospital Virgen Del Rocío in Spain: Technical and Clinical Overview. *Biomed Res Int.* 2015;2015:406096

14. Fernández RM, Peciña A, Lozano-Arana MD, Sánchez B, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. Clinical and technical overview of Preimplantation Genetic Diagnosis for Fragile X Syndrome: Experience at the University Hospital Virgen del Rocio in Spain. *Biomed Res Int*, en prensa.
15. Forman EJ, Tao X, Ferry KM, Taylor D, Treff NR and Scott Jr RT. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Human Reproduction*, Vol.27, No.4 pp. 1217–1222, 2012.
16. Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, Tormasi S, Gutierrez-Mateo C, Prates R, Schoolcraft WB, Munne S, Wells D. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril*, 94:875-887, 2010.
17. Francès F, Portolés O, González JI, Coltell O, Verdú F, Castelló A, Corella D (2007). Amelogenin test: From forensics to quality control in clinical and biochemical genomics. *Clin Chim Acta*. 386 (1-2): 53–56.
18. Gianaroli L, Magli MC, Ferrareti AP. The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol Cell Endocrinol*, 183: S13-8, 2001.
19. Gigarel N, Frydman N, Burlet P, Kerbrat V, Steffann J, Frydman R, Munnich A, Ray PF. Single cell co-amplification of polymorphic markers for the indirect preimplantation genetic diagnosis of hemophilia A, X-linked adrenoleukodystrophy, X-linked hydrocephalus and incontinentia pigmenti loci on Xq28. *Hum Genet* 2004;114:298-305.

20. Goossens V, De Rycke M, De Vos A *et al.* Diagnosis efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* Vol.23, No.3 pp. 481-492, 2008.
21. Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod*, 24:1786-1810, 2009.
22. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston RML and Delhanty JDA. Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosomespecific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Human Genetics* 1992; 89: 18–22.
23. Handyside *et al.* Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70
24. Harton G, Braude P, Lashwood A, Schmutzler A, Traeger-Synodinos J, Wilton L and Harper J.C. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Human Reproduction*, Vol.26, No.1 pp. 14–24, 2011.
25. Harton G, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K and Wilton L. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Human Reproduction*, Vol.26, No.1 pp. 25–32, 2011.
26. Harton G, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta C, Traeger-Synodinos J and Harper JC. ESHRE PGD consortium best practice

- guidelines for amplification-based PGD. *Human Reproduction*, Vol.26, No.1 pp. 33–40, 2011.
27. Harton G, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J and Harper JC. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human Reproduction*, Vol.26, No.1 pp. 41–46, 2011.
28. Kakourou G, Dhanjal S, Mamas T, Gotts S, Doshi A, Fordham K, Serhal P, Ranieri DM, Delhanty JD, Harper JC, SenGupta SB. Preimplantation genetic diagnosis for myotonic dystrophy type 1 in the UK. *Neuromuscul Disord*. 2008; 18:131-136.
29. Kumar G, Garnova E, Reagin M, Vidali A . Improved multiple displacement amplification with phi29 DNA polymerase for genotyping of single human cells. *Biotechniques*. 2008, 44:879-890.
30. Liu J, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (1994). Amplification of X- and Y-chromosome-specific regions from single human blastomeres by polymerase chain reaction for sexing of preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 9(4):716-720.
31. López-Pedraza MJ, Hernández MT, Guerra M y Blasco JA. Eficacia, efectividad, seguridad y costes del Diagnóstico Genético Preimplantacional. Madrid: Plan de calidad para el SNS del MSSSI. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, Agencia Laín Intralgo; 2012. Informes de evaluación de Tecnologías Sanitarias: UETS 201/04.
32. Lozano MD, García Lozano JC, Guardiola J, Sánchez B, Fernández R,

- Moliní JL, Borrego S, Antiñolo G. Resultados en el diagnóstico genético preimplantatorio en mujeres afectas de distrofia miotónica de Steinert. 29 congreso nacional de la Sociedad Española de Fertilidad 2012.
33. Lozano MD, Guardiola J, Sánchez B, Fernández R, García Lozano JC, Moliní JL, Borrego S, Antiñolo G. Resultados en el diagnóstico genético preimplantatorio en varones afectos de distrofia miotónica de Steinert. 29 congreso nacional de la Sociedad Española de Fertilidad 2012.
34. Lozano MD, Fernández R, Sánchez B, García Lozano JC, Peciña A, Guardiola J, Moliní JL, Borrego S, Antiñolo G. Aplicación de MDA en PGD de enfermedades monogénicas. VII Congreso Asebir 2013.
35. Lozano MD, Pérez R, Núñez R, Fernández R, Antiñolo G. "Preimplantation genetic diagnosis for haemophilia: clinical results". EAHAD 2014.
36. Malcov M, Naiman T, Yosef DB, Carmon A, Mey-Raz N, Amit A, Vagman I, Yaron Y. Preimplantation genetic diagnosis for fragile X syndrome using multiplex nested PCR. *Reprod Biomed Online*. 2007, 14:515-521.
37. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC *et al*. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *Engl J Med*. 5; 357(1): 9-17, 2007.
38. Monk M, Handyside AH. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J Reprod Fertil*, 82:365-368, 1988.
39. Moutou C, Gardes N, Viville S. New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. *Eur J*

- Hum Genet. 2004, 12:1007-1014.
40. Moutou C, Gardes N, Viville S. Multiplex PCR combining deltaF508 mutation and intragenic microsatellites of the CFTR gene for pre-implantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2002, 10:231-238.
41. Moutou C1, Gardes N, Nicod JC, Viville S. Strategies and outcomes of PGD of familial adenomatous polyposis. *Mol Hum Reprod.* 2007, 13:95-101.
42. Moutou C, Goossens V, Coonen E, De Rycke M, Kokkali G, Renwick P, SenGupta S.B, Vesela K and Traeger-Synodinos J. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Human Reproduction*, Vol.29, No.5 pp. 880–903, 2014.
43. Munne S, Weier H-UG, Grifo J and Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biology of Reproduction* 51: 373–9, 1994.
44. Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowi S, Gianaroli L, Tucker M, Márquez C, Sable D, Ferrareti AP, Massey JB, Scott R. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod*, 14:2191-9, 1999.
45. Obradors A, Fernández E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D, Benet J, Navarro J. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. *Hum Reprod* 23:1949-56, 2008.
46. Obradors A, Fernández E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martínez-Fresno M,

- Benet J, Navarro J. Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril*, 91:933.e1-7, 2009.
47. Obradors A, Rius M, Cuzzi J, Daina G, Gutiérrez-Mateo C, Pujol A, Marina F, Márquez C, Benet J, Navarro J. Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril*, 93:675-679, 2010.
48. Peciña A, Lozano Arana MD, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. One-step multiplex polymerase chain reaction for preimplantation genetic diagnosis of Huntington disease. *Fertil Steril*, 93: 2411-2412, 2010.
49. Platteau P, Sermon K, Seneca S, Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis for fragile Xa syndrome: difficult but not impossible. *Hum Reprod*. 2002, 17:2807-2812.
50. Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marquès L, Calderón G, Velilla E, Martínez-Passarell O, Oliver-Bonet M, Benet J, Navarro J. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod*, 25:1824-35, 2010.
51. 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*, 95:413-416, 2011.

52. Sánchez-García JF, Gallardo D, Ramírez L, Vidal F. Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid hemophilia A molecular diagnosis. *Thromb Haemost* 2005;94:1099-1103.
53. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *Biotechnology*. 1992;24:104-8.
54. Sermon KD, Michiels A, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synodinos S, Vesela K, Viville S, Wilton L and Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Human Reproduction* Vol.22, No.2 pp. 323–336, 2007.
55. 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*, 87:1033-40, 2007.
56. Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Maassarani G, Tortoriello D, Brody S. Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril* 92:1886-1894, 2009.
57. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril*, 94:1700-1706, 2010.
58. Spits C1, De Rycke M, Verpoest W, Lissens W, Van Steirteghem A,

- Liebaers I, Sermon K. Preimplantation genetic diagnosis for Marfan syndrome. *Fertil Steril*. 2006 86:310-20
59. Spits C, Sermon K. PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat Diagn*, 29:50-56, 2009.
60. Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I and Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Human Reproduction* Vol.23, No.12 pp. 2818–2825, 2008.
61. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P (1993). A rapid and quantitative DNA sex test-fluorescence-based PCR analysis X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 15: 636-642.
62. Veiga A, Santaló J, Vidal F, Calderón G, Giménez C, Boada M, Egozcue J, Barri PN. Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection: case report. *Human Reproduction*, 9: 2156-2159, 1994.
63. Velilla E, Escudero T, Munné S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *RBM online*, Vol 4. No 3. 106-115, 2002.
64. Verlinsky Y. Preimplantation diagnosis: An alternative to prenatal diagnosis of genetic and chromosomal disorders. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 16, No. 4, 1999.
65. Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn*, 19:846-851, 1999.
66. Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. Chromosome

abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod*, 8:1035-41, 2002.

67. 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*; 78:543-549, 2002.

68. 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*, 345:1537-1541, 2001.

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

ANEXOS



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

**INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO H.U.
VIRGEN DEL ROCIO**

El Comité de Ética de la Investigación de centro H.U. Virgen del Rocío de Sevilla, reunido en la Sesión Extraordinaria celebrada el día veintiseis de marzo de dos mil doce y según consta en el acta 03/12, ha valorado el estudio presentado por la **Dra. Dña. Raquel María Fernández García**, titulado:

2012PI/097 “Aplicación de técnicas de amplificaciones de genoma completo y de la tecnología de arrays CGH al Diagnóstico Genético preimplantatorio (PGD)”.

Se emite **INFORME FAVORABLE**

En Sevilla, a veintiseis de marzo de dos mil doce



Fdo.: Javier Bautista Paloma
Presidente

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTATORIO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

D^a.
(nombre y dos apellidos de la paciente)
con domicilio en:
y DNI:

Fecha de nacimiento

y D.
(nombre y apellidos del paciente)
con domicilio en:
y DNI:

Fecha de nacimiento

Hemos sido informados de la posibilidad de llevar a cabo el diagnóstico genético preimplantatorio de nuestros embriones obtenidos tras un ciclo de fecundación «*in vitro*». Se nos ha informado sobre los procedimientos, pruebas diagnósticas que se pueden realizar, posibilidades de éxito, alternativas, limitaciones y riesgos.

Según el equipo médico, en nuestro caso concreto, la indicación para someter a nuestros embriones al programa de diagnóstico genético preimplantatorio, viene determinada concretamente por la posibilidad de tratamiento mediante trasplante de progenitores hematopoyéticos procedentes de cordón compatible, ya que el diagnóstico molecular permite identificar qué preembriones son HLA compatibles con un hijo/a afecto/a.

I. ¿En qué consiste?

El Diagnóstico Genético Preimplantatorio (PGD) es un nuevo método de diagnóstico prenatal que se realiza en el embrión antes de su implantación en el útero. En las parejas con riesgo de transmitir a la descendencia enfermedades de base genética, el PGD informa sobre el estado de cada uno de los embriones concebidos y permite que únicamente los no afectados sean transferidos al útero. La técnica del PGD es el resultado de la combinación de 1) la fecundación «*in vitro*», 2) la biopsia embrionaria, 3) el diagnóstico genético y 4) la transferencia de embriones no afectados en los casos que sea posible.

En las parejas cuya descendencia padece una enfermedad monogénica cuyo tratamiento requiere de trasplante de progenitores hematopoyéticos procedentes de cordón compatible, el diagnóstico molecular permite identificar simultáneamente qué preembriones no están afectados de la enfermedad y son HLA compatibles con un hijo/a afecto/a. En parejas con un hijo/a afecto de una enfermedad no hereditaria pero cuyo tratamiento también requiere de dicho trasplante, el diagnóstico molecular permite identificar qué preembriones son HLA compatibles con dicho hijo/a afecto/a.

II. ¿Cuándo está indicada?

En las parejas cuya descendencia padece una enfermedad monogénica cuyo tratamiento requiere de trasplante de progenitores hematopoyéticos procedentes de cordón compatible, y el diagnóstico molecular permite identificar simultáneamente qué preembriones no están afectados de la enfermedad y son HLA compatibles con un hijo/a afecto/a.

En las parejas con un hijo/a afecto de una enfermedad no hereditaria pero cuyo tratamiento requiere de trasplante de progenitores hematopoyéticos procedentes de cordón compatible, el diagnóstico molecular permite identificar qué preembriones son HLA compatibles con dicho hijo/a afecto/a.

III. Procedimiento

1. Fase previa. En esta fase se realizan las consultas y análisis genético con el fin de disponer de la información necesaria para la realización, si procede, del PGD.
2. Obtención de embriones. Se trata de obtener los embriones que serán objeto del PGD. Deben producirse «in vitro» mediante técnicas de reproducción asistida a pesar de que la pareja no presente ningún tipo de anomalía reproductiva que impida la procreación natural.
3. Biopsia embrionaria. La biopsia embrionaria se realiza el segundo día después de la fecundación, cuando el embrión se encuentra en estadio de 6-8 células. Consiste en extraer una o dos células del embrión sin que por ello se comprometa su desarrollo normal.
4. Análisis genético. La célula obtenida es procesada y sometida a estudio genético.
5. Transferencia embrionaria. Previo a la transferencia se informará a la pareja del resultado del PGD y junto con ellos se decidirá el número de embriones a transferir. El número máximo será de 2.

IV. Resultados

La eficacia global del PGD depende del número de embriones disponibles, del método de diagnóstico genético y de su potencial de crecimiento. El registro de nacidos vivos después de la aplicación de PGD muestra que el procedimiento es eficaz y que parece no asociarse a otras anomalías debidas a la técnica, con una tasa de recién nacidos sanos de alrededor del 15%.

La probabilidad de disponer de un embrión HLA compatible y sin enfermedad hereditaria autosómica recesiva es de 3/16. Si solo buscamos embriones HLA compatibles, la probabilidad es 1/4. Por ello, en el caso de PGD/HLA el procedimiento es menos eficaz, con una tasa de nacidos vivos después de la aplicación de PGD/HLA del 5-10%

V. Riesgos

La fiabilidad del PGD es muy alta, con una probabilidad de gestar individuos no afectados de la enfermedad genética diagnosticada del 90-95%. En todo caso, realizar un diagnóstico prenatal de confirmación es recomendable.

No se transferirán embriones afectados o aquellos con diagnóstico genético no concluyente.

Puede ocurrir que el/los embrión/es no progresen tras la biopsia y no dispongamos de embriones para ser transferidos.

Asimismo existen riesgos derivados del tratamiento de fecundación "in vitro" como el embarazo múltiple, el síndrome de hiperestimulación ovárica, el embarazo ectópico y las complicaciones de la punción ovárica (principalmente hemorragia y/o infección).

VI. Destinos posibles de los preembriones crioconservados

Los preembriones no afectos histocompatibles que no se transfieran al útero se congelarán pudiendo ser utilizados para diferentes fines posibles:

- a) Su utilización por la propia mujer (para transferencias futuras) o su cónyuge.
- b) La donación con fines reproductivos.
- c) La donación con fines de investigación
- d) El cese de su conservación sin otra utilización.

Esta última opción solo será aplicable una vez finalizado el plazo máximo de conservación establecido en la Ley sin que se haya optado por alguno de los destinos mencionados en los apartados anteriores.

Optamos por la opción _____

Los preembriones no afectos no histocompatibles que no se transfieran al útero se congelarán pudiendo ser utilizados para diferentes fines posibles:

- e) Su utilización por la propia mujer (para transferencias futuras) o su cónyuge.
- f) La donación con fines reproductivos.
- g) La donación con fines de investigación
- h) El cese de su conservación sin otra utilización.

Esta última opción solo será aplicable una vez finalizado el plazo máximo de conservación establecido en la Ley sin que se haya optado por alguno de los destinos mencionados en los apartados anteriores.

Optamos por la opción _____

Los preembriones afectos, no se consideran aptos para transferir al útero de la propia mujer ó a una posible receptora, por lo que se consideran solo como destinos posibles:

- i) La donación con fines de investigación, para lo cual podrían ser crioconservados.
- j) El cese de su mantenimiento sin otra utilización.

Optamos por la opción _____

(En casos enfermedades no hereditarias y aplicación de PGD para tipaje HLA, rellenar solo los dos primeros puntos).

La utilización de los preembriones para cualquiera de los fines citados requerirá el consentimiento informado debidamente acreditado. Dicho consentimiento deberá haber sido prestado por la mujer o, en el caso de la mujer casada con un hombre, también por el marido, con anterioridad a la generación de los preembriones.

El consentimiento para dar a los preembriones cualquiera de los destinos citados podrá ser modificado en cualquier momento anterior a su aplicación.

Con anterioridad a la prestación del consentimiento la pareja progenitora o la mujer, en su caso, debe estar informada de lo siguiente:

“Cada dos años, como mínimo, se solicitará de la mujer o de la pareja progenitora la renovación o modificación del consentimiento firmado previamente. Si durante dos renovaciones consecutivas fuera imposible obtener de la mujer o de la pareja progenitora la firma del consentimiento correspondiente, y se pudieran demostrar de manera fehaciente las actuaciones llevadas a cabo con el fin de obtener dicha renovación sin obtener la respuesta requerida, los preembriones quedarán a disposición de los centros en que se encuentren crioconservados., que podrán destinarlos conforme a su criterio a cualquiera de los fines citados”.

FIRMA DE LA PAREJA

D.N.I.	D.N.I.

FIRMA DEL MEDICO

CNP:

Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.

Autorización:

Una vez leído y comprendido lo anterior quedamos informados de:

- La indicación, procedimiento, probabilidades de éxito, limitaciones y riesgos de un ciclo de PGD.
- Debido al riesgo de embarazo no deseado, somos conscientes de que no podemos mantener relaciones sexuales sin protección mientras dure el ciclo de PGD.
- Existe un riesgo de error de diagnóstico por lo que se recomienda realizar un diagnóstico prenatal para confirmar el diagnóstico.
- Que los procedimientos pueden ser cancelados en cualquier momento de su realización, bien por razones médicas, bien a petición de la interesada, siempre que no suponga daño alguno para los pacientes y/o para los embriones viables producidos.
- En el caso de los preembriones crioconservados para uso propio, cada dos años como mínimo se solicitará de la mujer o de la pareja progenitora la renovación o modificación del consentimiento firmado previamente.
- La disposición del personal sanitario de este centro para ampliar cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente claro.

Autorizamos al personal de la Unidad Clínica de Genética y Reproducción a llevar a cabo con nuestros embriones el programa de diagnóstico preimplantatorio propuesto.

En _____ a ____ de _____ de _____

Firma de la pareja:

Fecha: DNI:	Fecha: DNI:

Firma del facultativo:

Fecha: DNI:

INFORME DE RESULTADOS
 PGS - 24sure

ID:	62260	Paciente:	-
ID en Origen:	-	Tipo celular:	Blastómera
Fecha Recepción:	17/07/2015	Centro:	At. Raquel Fernández UGC Genética, Reproducción y Medicina Fetal H.U. Virgen del Rocío, Sevilla
Fecha Informe:	23/07/2015		

PGS - 24sure

Resultados

Embriones Normales: E6

Embriones Anormales:

C1; C2; C3; C4; C5; C6; C7; C9; V2; V6; E1; E10; E11; E13; E11'

Embriones no Analizados: E5; C3'; C8

Embrión ID	Resultado	Resumen
#C1	Caótico	Alterado, Varón
#C2	Caótico	Alterado, Varón
#C3	Caótico	Alterado, Varón
#C4	45, XY, -2, dup(7p) dup(Xp)	Alterado, Varón
#C5	44, XY, -2, -15	Alterado, Varón
#C6	44, XX, -2, -9	Alterado, Varón
#C7	Caótico	Alterado, Mujer
#C9	43, XO, -4, -12	Alterado, Mujer
#V2	46, XY, del(7p)	Alterado, Varón
#V6	46, XY, +8, -13	Alterado, Varón
#E1	44, XX, -15, -19	Alterado, Mujer
#E6	46, XX	Normal, Mujer
#E10	Caótico	Alterado, Varón
#E11	Caótico	Alterado, Mujer
#E13	Caótico	Alterado, Varón
#E11'	Caótico	Alterado, Varón
#E5	Fallo de Amplificación	-
#C3'	No analizado a 23/7/2015	-
#C8	No analizado a 23/7/2015	-



BIOARRAY
Diagnóstico Genético

INFORME DE RESULTADOS

PGS – 24sure

Aclaración Importante

1. El test mostrado (PGS) consiste en la amplificación completa del genoma a partir de una o varias células obtenidas directamente del embrión en cuestión, y en su comparación posterior mediante hibridación (CGH) en matrices suministradas por la empresa BlueGnome (24sure).
2. Dicho test está diseñado para detectar anomalías cromosómicas completas (aneuploidias), pero no para detectar deleciones/duplicaciones de menor tamaño.
3. El error estimado del test PGS se encuentra alrededor del 2%.
4. El Screening Genético Preimplantacional (PGS) no es una sustitución de un Diagnóstico Prenatal. Es altamente recomendable que se proceda a realizar un Diagnóstico Prenatal completo, si se produce el embarazo tras haber sido sometido a cualquier técnica de Screening Genético o Diagnóstico Genético Preimplantacionales (PGS o PDG).

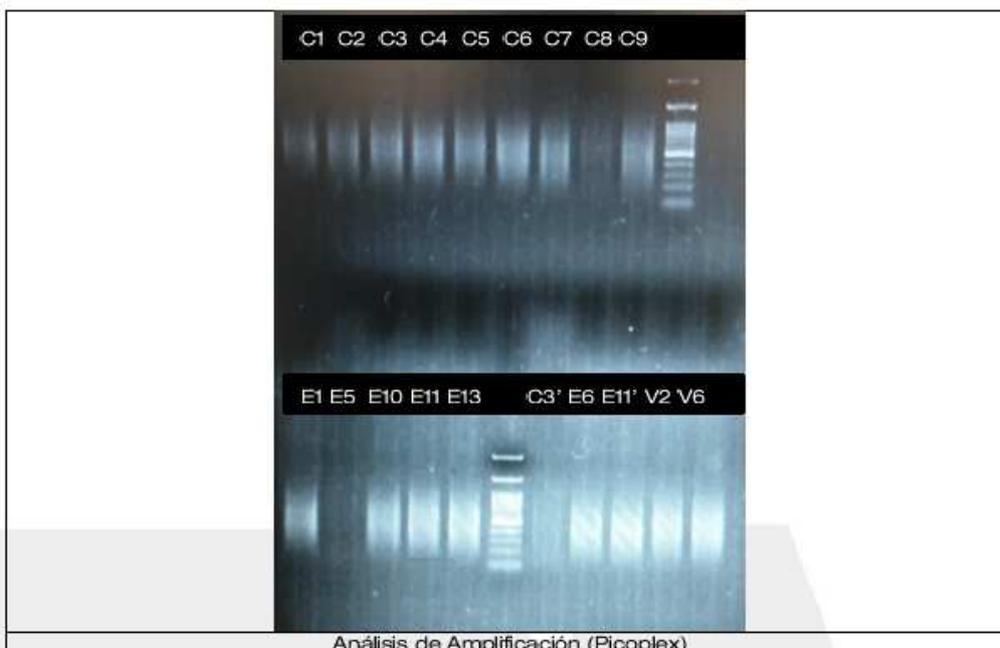


BIOARRAY
Diagnóstico Genético

INFORME DE RESULTADOS

PGS – 24sure

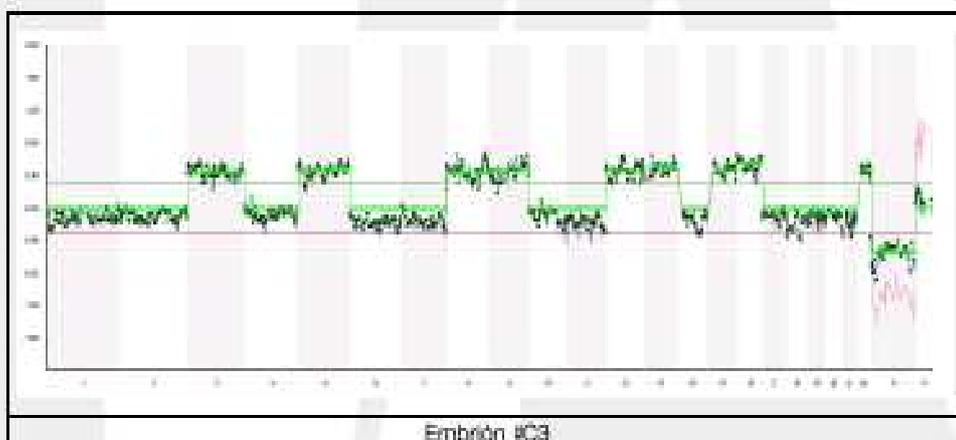
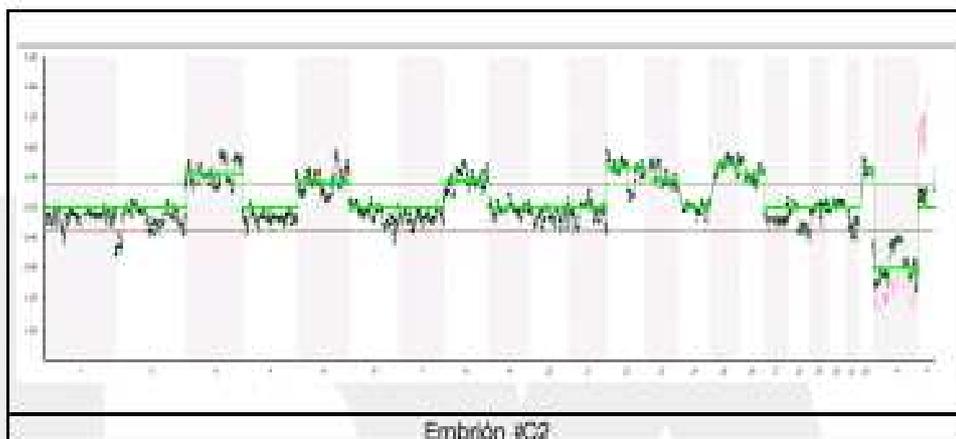
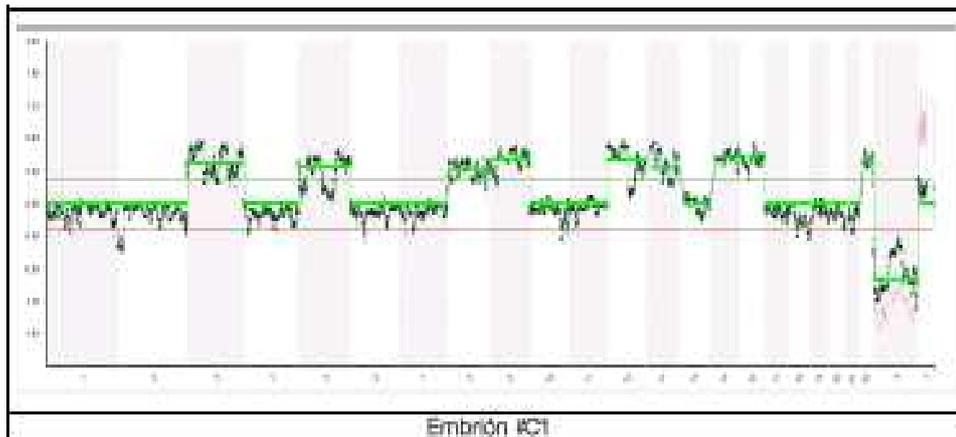
Anexo 1: Resultado Amplificación



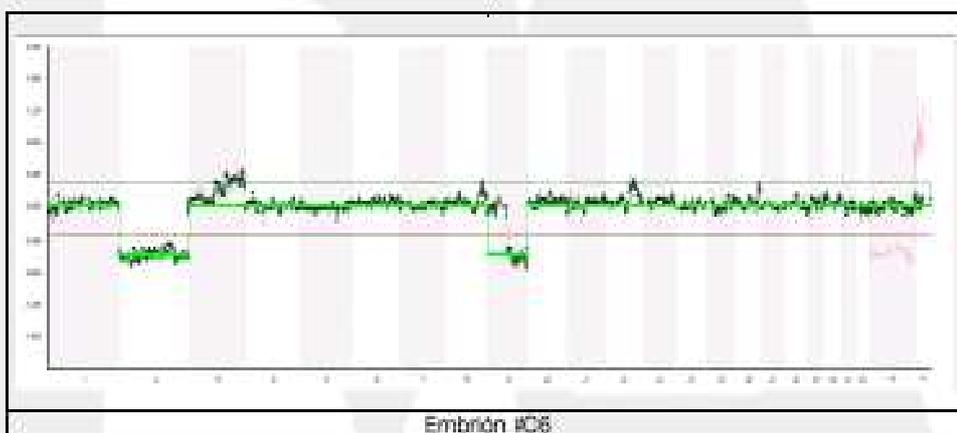
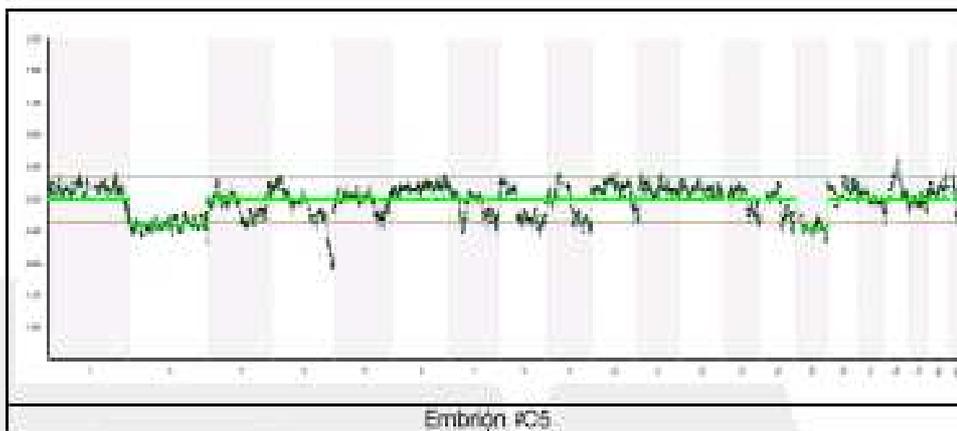
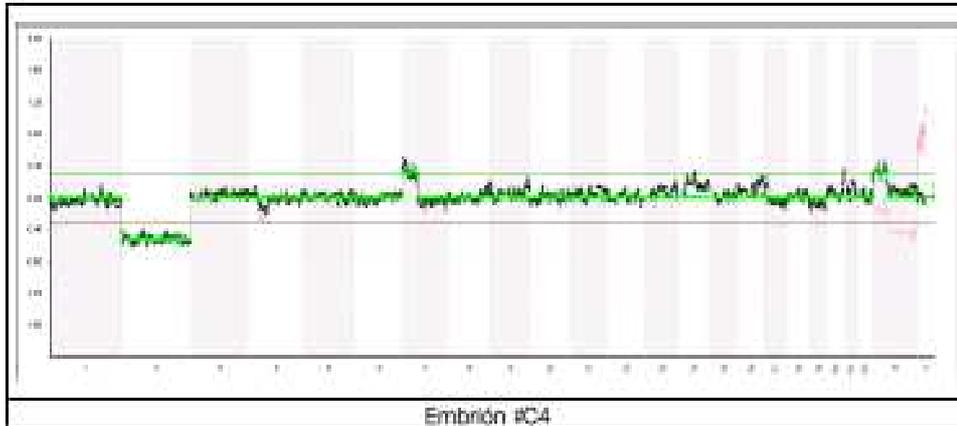
INFORME DE RESULTADOS

PGS - 24sure

Anexo 2: Resultado Gráfico

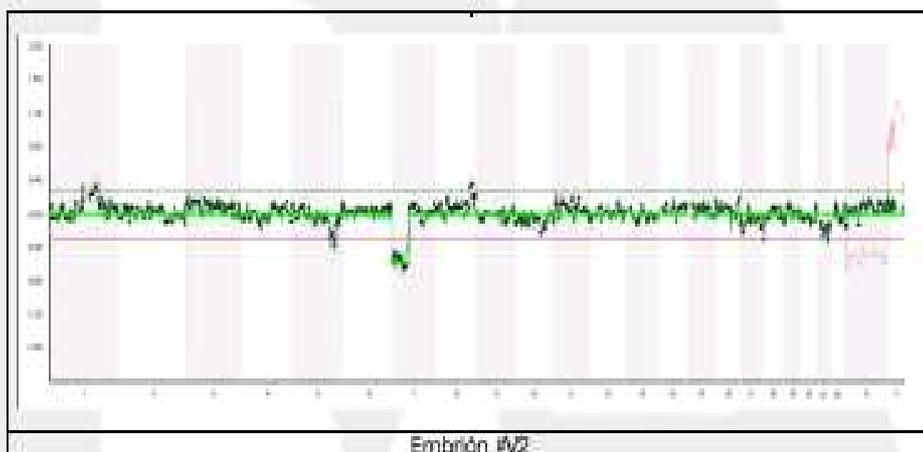
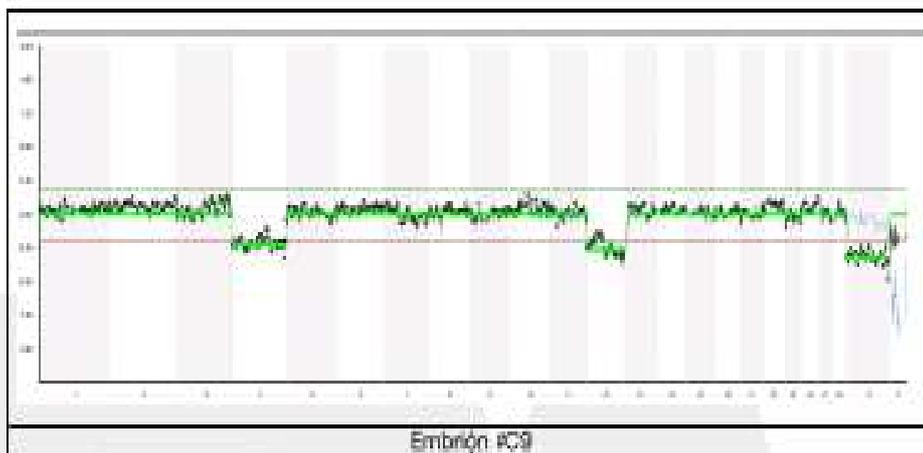
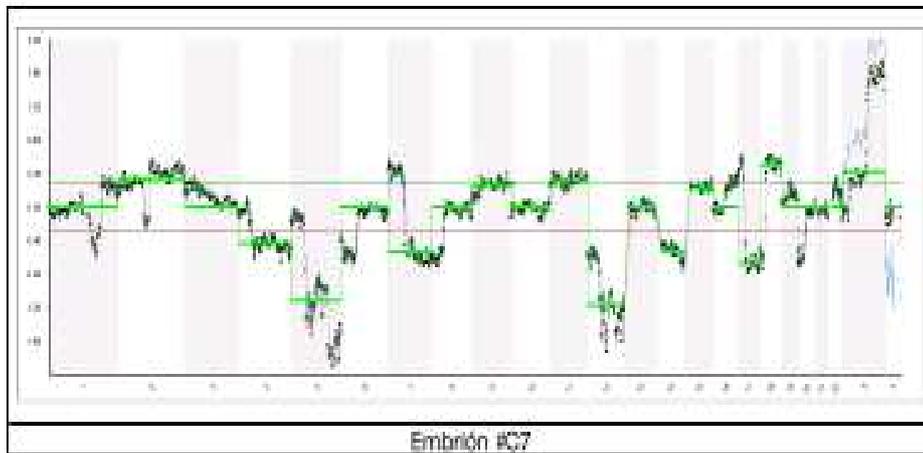


INFORME DE RESULTADOS
PGS - 24sure

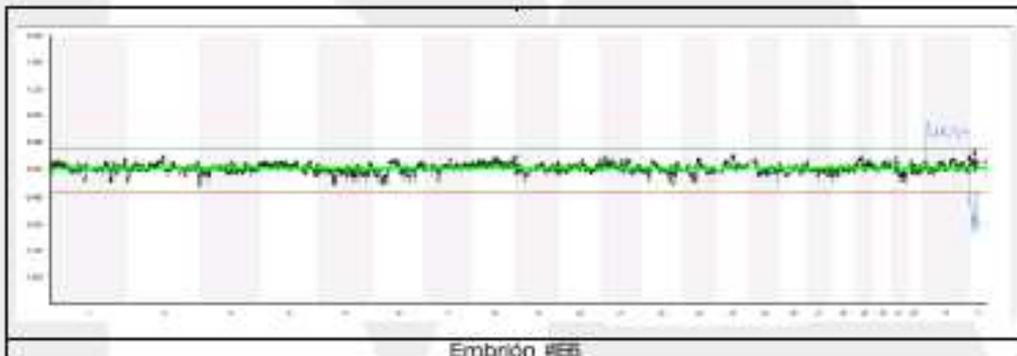
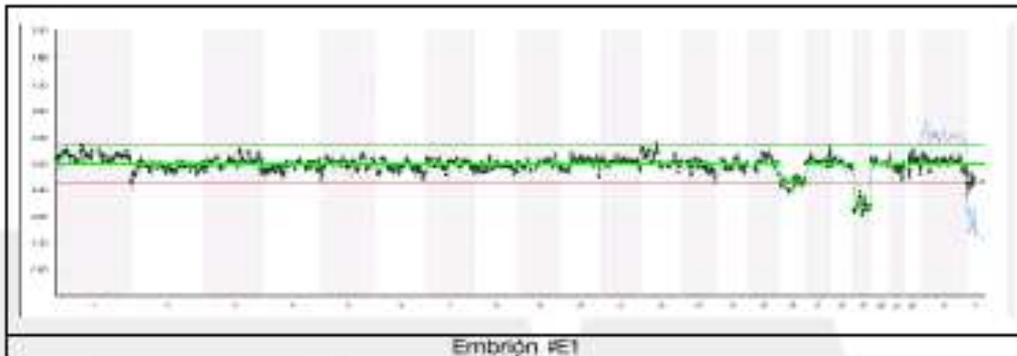
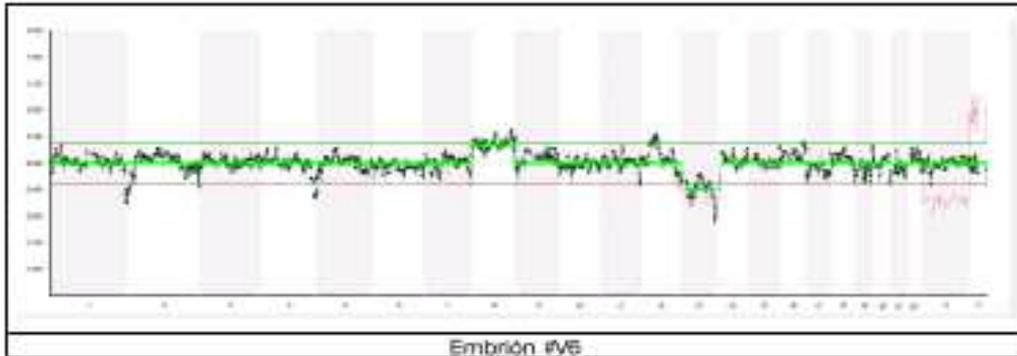


INFORME DE RESULTADOS

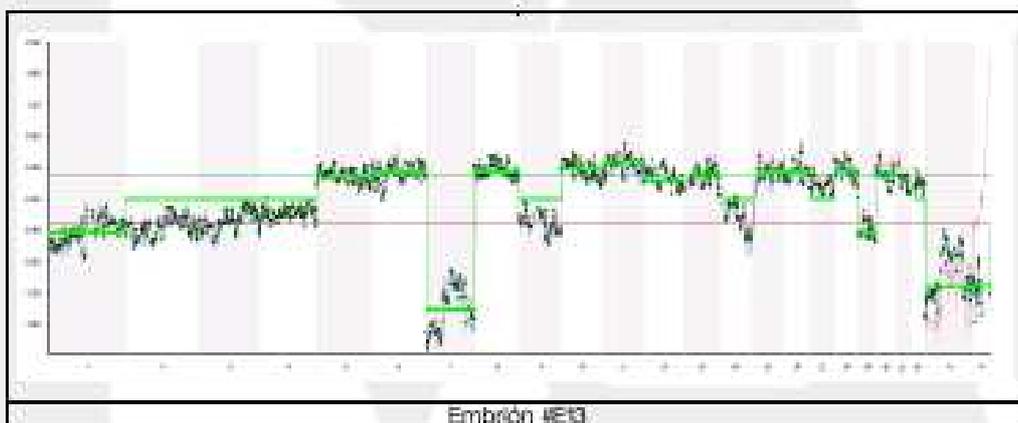
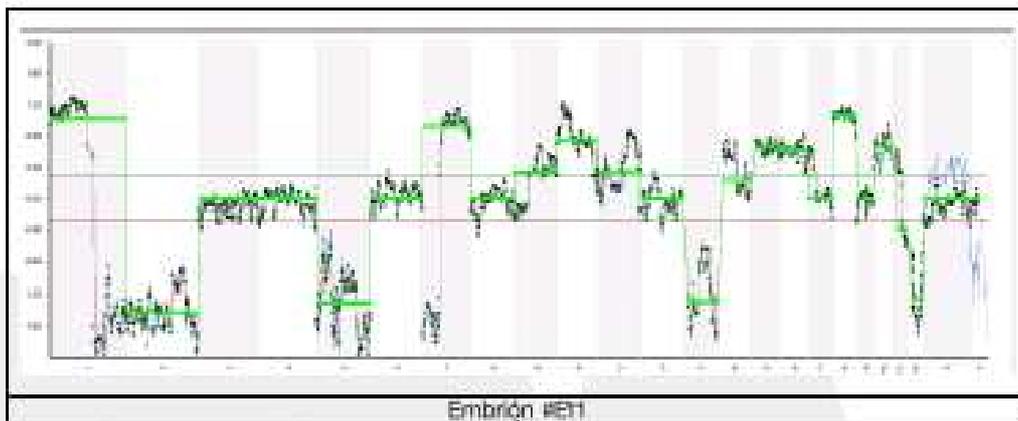
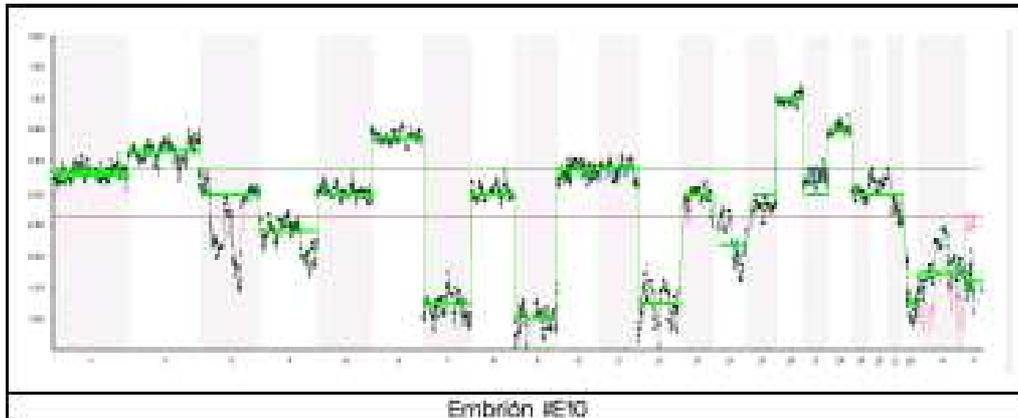
PGS - 24sure



INFORME DE RESULTADOS
PGS - 24sure



INFORME DE RESULTADOS
PGS - 24sure



Diagnóstico genético preimplantatorio: implantación, desarrollo y actualización de un programa de diagnóstico genético preimplantatorio en un Sistema Sanitario Público.



INFORME DE RESULTADOS
PGS - 24sure

