

# Consideracions entorn el diagnòstic preimplantacional

## Grup de treball per a l'estudi del Diagnòstic Genètic Preimplantacional

<b>Lluís Bassas</b>	Fundació Puigvert - Hospital de Sant Pau
<b>Josep M. Calafell</b>	Hospital Clínic i Provincial de Barcelona
<b>Carolina Castelló</b>	Institut Universitari Dexeus
<b>Francesca Vidal</b>	Universitat Autònoma de Barcelona
<b>Josep Arnau</b>	Departament de Sanitat i Seguretat Social
<b>Josep M. Busquets</b>	Departament de Sanitat i Seguretat Social

Gener de 1997

# Sumari

<b>1.</b>	<b>Introducció.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Característiques de les diverses tècniques de Diagnòstic Preimplantacional....</b>	<b>3</b>
2.1.	Biòpsies cel·lulars .....	3
2.1.1.	Biòpsia de corpuscle polar:.....	3
2.1.2.	Biòpsia d'embrions en estadi precoç primerencs de desenvolupament: .....	4
2.1.3.	Biòpsia de blastocist: .....	4
<b>3.</b>	<b>Tècniques d'anàlisi genètic .....</b>	<b>5</b>
3.1.	Hibridació in situ fluorescent: .....	5
3.2.	PCR:.....	5
3.3.	Alternatives a la realització del diagnòstic preimplantacional: .....	5
<b>4.</b>	<b>Beneficiaris.....</b>	<b>5</b>
<b>5.</b>	<b>Candidats.....</b>	<b>5</b>
5.1.	Portadors de malalties genètiques lligades als cromosomes sexuals. ....	6
5.2.	Portadors de malalties monogèniques autosòmiques. ....	6
5.3.	Portadors d'anomalies cromosòmiques. ....	7
5.4.	Altres candidats de risc. ....	8
<b>6.</b>	<b>Despeses .....</b>	<b>8</b>
<b>7.</b>	<b>Situació actual de l'activitat.....</b>	<b>9</b>
<b>8.</b>	<b>Consideracions ètiques i jurídiques .....</b>	<b>9</b>
<b>9.</b>	<b>Visió futura del Diagnòstic Genètic Preimplantacional.....</b>	<b>11</b>
<b>10.</b>	<b>Criteris de selecció en la prestació d'aquest servei sanitari .....</b>	<b>12</b>

## 1. Introducció

A la 27ena Reunió de la Comissió Assessora per a la Reproducció Humana Assistida a Catalunya, del dia 1 d'octubre de 1999, es va acordar crear un grup de treball que elaborés un informe sobre la incidència de malalties de transmissió hereditària, les possibilitats actuals i futures d'abordar la seva prevenció amb tècniques de diagnòstic preimplantacional, el cost que pot representar i com caldria organitzar aquesta prestació per donar-li naturalesa de cobertura pública. Les consideracions que es presenten en aquest document pretenen donar resposta a les demandes que la Comissió va formular i servir de base a les decisions que s'han de prendre per millorar l'accés a aquesta prestació.

## 2. Característiques de les diverses tècniques de Diagnòstic Preimplantacional

El diagnòstic genètic preimplantacional (DGPI) agrupa diversos procediments desenvolupats durant els últims anys amb la finalitat de proporcionar una detecció molt precoç de les malalties hereditàries amb risc elevat de transmissió a la descendència. Actualment pot oferir-se a parelles portadores o afectes de malalties monogèniques i alteracions cromosòmiques numèriques. El diagnòstic es realitza mitjançant hibridació in situ fluorescent (FISH) o la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) depenent de cada cas, i es pot analitzar el corpuscle polar de l'oòcit (diagnòstic preconcepcional) o un o dos blastòmers de l'embrió al tercer dia d'evolució (diagnòstic preimplantacional). El diagnòstic preimplantacional resulta de la combinació de la tècnica de fecundació in vitro (FIV) i de les tècniques de citogenètica i genètica molecular. És important optimitzar l'estimulació ovàrica de les pacients així com les condicions de cultiu en el laboratori de FIV per aconseguir un nombre suficient d'embrions de bona qualitat per a ésser analitzats.

### 2.1. Biòpsies cel·lulars

#### 2.1.1. Biòpsia de corpuscle polar:

S'utilitza principalment en casos de diagnòstic pre-concepcional (biòpsia del 1r corpuscle polar abans de la fecundació) tot i que pot utilitzar-se en casos de diagnòstic preimplantacional (biòpsia del 2n corpuscle polar).

Consisteix en fer un petit orifici en la zona pel·lúcida de l'oòcit de forma química (amb àcid Tyrodes), mecànica (amb agulla), o bé per fototermòlisi (amb làser). Un cop feta l'obertura a la zona pel·lúcida, s'aspira el corpuscle polar el qual es processa en funció del diagnòstic a

realitzar (FISH o PCR). Un cop fet el diagnòstic, la inseminació dels oòcits es realitza per microinjecció espermàtica (ICSI) Indicacions:

- Anomalies cromosòmiques d'origen matern
- Aneuploidies per edat materna

La principal limitació d'aquesta aproximació és la impossibilitat de l'estudi del complement cromosòmic patern.

### **2.1.2. Biòpsia d'embrions en estadi precoç primerencs de desenvolupament:**

S'obtenen 1 o 2 blastòmers d'embrions de 6-8 cèl·lules. El mètode més utilitzat és el d'aspiració i cal la dissecció prèvia de la zona pel·lúcida mitjançant les mateixes tècniques descrites per a la biòpsia del corpuscle polar. El blastòmer biopsiat es processa en funció del diagnòstic a establir. Indicacions:

- Sexat dels embrions per malalties genètiques lligades al cromosoma X.
- Anomalies cromosòmiques d'origen matern o patern. - Aneuploidies per edat materna.
- Estudi dels cromosomes implicats en els avortaments de repetició.

### **2.1.3. Biòpsia de blastocist:**

La possibilitat clínica d'utilitzar blastocists per el diagnòstic preimplantacional tindria l'avantatge de poder disposar d'un major nombre de cèl·lules pel diagnòstic.

L'obtenció de blastocists s'aconsegueix mitjançant el cultiu prolongat dels embrions. S'han descrit diversos mètodes de biòpsia, destacant la que utilitza la tecnologia làser tant per a la perforació de la zona com per a l'aspiració de les cèl·lules del trofèctoderm a biopsiar.

Les qüestions que actualment es plantegen amb la biòpsia de blastocist es centren bàsicament en validar si les cèl·lules del trofèctoderm són representatives de l'embrió o no i en les dificultats tècniques de la seva metodologia.

Les indicacions en el cas de la posada a punt d'aquesta tècnica serien les mateixes que per a la biòpsia d'embrions.

### **3. Tècniques d'anàlisi genètic**

#### **3.1. Hibridació in situ fluorescent:**

Consisteix en la utilització de sondes de DNA específiques per determinats cromosomes o fragments cromosòmics marcades amb fluorescència. Aquesta tècnica s'utilitza per al diagnòstic en malalties lligades al cromosoma X, per al test d'aneuploidies i també per a situacions en què es requereix la identificació de determinats cromosomes o fragments cromosòmics en embrions de pacients amb anomalies cromosòmiques.

#### **3.2. PCR:**

S'utilitza en aquells casos en què cal detectar una mutació gènica a nivell de DNA que implica una malaltia genètica monogènica. La PCR consisteix en l'amplificació de determinades seqüències de DNA a través d'encebadors que s'uneixen específicament a seqüències de nucleòtids. L'aplicació d'un determinat nombre de cicles d'amplificació permetrà la detecció de la mutació per electroforesi en gels d'agarosa o de poliacrilamida. La utilització de la PCR comporta desenvolupar un protocol específic per a cada malaltia que es desitgi diagnosticar.

#### **3.3. Alternatives a la realització del diagnòstic preimplantacional:**

- Embaràs espontani amb diagnòstic prenatal
- Donació d'òcits o donació de semen dependent del portador de la malaltia
- Adopció

### **4. Beneficiaris**

En els darrers anys, els avenços en reproducció assistida han fet possible el desenvolupament de metodologies que permeten oferir noves opcions en el camp de la reproducció humana. El diagnòstic genètic preimplantacional es una d'aquestes opcions i té el seu ventall principal d'aplicació en parelles que presenten un risc elevat per a la transmissió d'anomalies genètiques a la descendència.

### **5. Candidats**

## 5.1. Portadors de malalties genètiques lligades als cromosomes sexuals.

Hi han al voltant de 300 malalties genètiques lligades als cromosomes sexuals catalogades (les distròfies musculars de Duchenne o de Beckett, l'hemofília, la adrenoleucodistròfia, la hipogammaglobulinèmia o el Síndrome de Lesh-Nyhan, etc...) i nombroses cursen amb patologies greus. La gran majoria de casos presenten herència recessiva lligada al cromosoma X, es a dir, la dona n'és portadora no simptomàtica y presenta un risc del 50% de gestar un nen baró afectat per la malaltia.

A tall d'exemple podem presentar les distròfies musculars de Duchenne o de Beckett i l'hemofília. La distròfia muscular de Duchenne i de Becker és una de les mes freqüents entre les malalties recessives lligades al cromosoma X (1/3500 naixements). La vida del homes afectats queda pràcticament limitada a la cadira de rodes i la majoria no sobreviuen més enllà dels 20 anys. Les hemofília són malalties hemorràgiques. La incidència de l'hemofília A (la més freqüent) és d'un de cada 5000 naixements i, tot i que hi ha una intensa heterogeneïtat fenotípica, la seva patologia també es severa.

Al llarg de l'any 98 s'ha catalogat a Catalunya el naixements de 4 nens afectes de distròfies musculars, de 2 afectats d'hemofília i, l'any 1996, 2 casos d'interrupció terapèutica d'embarassos per gestacions de fetus afectes d'aquestes dues malalties.

El diagnòstic genètic preimplantacional, encaminat a determinar el sexe de l'embrió y la posterior transferència d'embrions de sexe femení que no seran afectes, seria una opció diagnòstica a oferir a aquestes parelles.

## 5.2. Portadors de malalties monogèniques autosòmiques.

El catàleg de malalties monogèniques tipificades es molt ampli. Es coneixen més de 1500 defectes que s'hereten de manera autosòmica dominant (síndrome de Marfan, neurofibromatosi, acondroplàsia, etc...) i més de 1000 defectes que s'hereten de forma autosòmica recessiva (fibrosi quística, betatalasèmia, malaltia de Tay Sachs, etc..) i l'incidència de cadascuna d'elles es força variable.

En aquest apartat, la gran majoria de candidats correspon a parelles en les que els dos membres son portadors d'una malaltia monogènica recessiva i presenten un 25% de possibilitats de tenir descendents afectes. En termes generals, els portadors d'aquests tipus de mutacions son fenotípicament normals i la majoria de parelles descobreixen el seu cas quan tenen un fill afectat. Aquest seria el cas de la fibrosi quística, que està considerada la

malaltia hereditària autosòmica recessiva greu més freqüent en la raça blanca. Té una incidència aproximada d'un per cada 2.500 nadons. La fibrosi quística és una malaltia de les cèl·lules epitelials exocrines. Els pacients afectats produeixen un moc espès i viscos que obstrueix l'òrgan on es localitza. El pàncrees i els pulmons són els òrgans més afectats. Encara que gràcies a la medicina preventiva, molts pacients sobreviuen després de la infància, amb una esperada de mitjana de vida superior als 30 anys, la gravetat de la malaltia i el pronòstic son molt variables i en molts casos la seva vida queda condicionada a un trasplantament de pulmons.

Al llarg de l'any 98 s'ha recollit a Catalunya el naixement de 4 nens afectes de fibrosi quística i, l'any 1996, 2 casos d'interrupció terapèutica d'embarassos per gestacions de fetus afectes.

Tot hi que actualment no podem oferir la possibilitat d'un diagnòstic preimplantacional en totes les possibles mutacions que poden resultar en fibrosi quística (més de 400), aquesta possibilitat ja es factible en aquelles mutacions que es presenten amb una freqüència més elevada en la nostra població (per exemple DF508, F508C, 1609 del CA)

Les malalties monogèniques autosòmiques que poden ser caracteritzades mitjançant diagnòstic genètic preimplantacional son encara poques, principalment degut a que en molts casos no es coneix la mutació concreta que les origina i a que cada malaltia requereix del desenvolupament de protocols específics. Així doncs, els principals esforços en aquest àmbit s'han centrat en les malalties que presenten una incidència més elevada en la població. No obstant, el ràpid desenvolupament del diagnòstic preimplantacional fa esperar que les malalties en les que pugui oferir aquesta opció augmentin considerablement en els propers anys.

### **5.3. Portadors d'anomalies cromosòmiques.**

Un altre grup de candidats pel diagnòstic genètic preimplantacional estaria format per aquells individus portadors d'anomalies cromosòmiques. Usualment, es un dels membres de la parella el que es portador d'una reorganització estructural (translocacions, inversions), encara que també series candidats potencials aquells individus que presenten mosaïcisme o sospita de mosaïcisme per anomalies cromosòmiques numèriques (Síndrome de Klinefelter, homes 47, XYY).

Els individus portadors d'anomalies cromosòmiques presenten una alta prevalença de producció de gàmetes (espermatozoides, oòcits) cromosòmicament desequilibrades i per tant de donar lloc a embrions cromosòmicament anormals. La probabilitat d'obtenir embrions

cromosòmicament equilibrats, desequilibrats però viables (i per tant de possible descendència afecte de síndromes deguts a anomalies cromosòmiques) o cromosòmicament desequilibrats no viables (que solen cursar en avortaments de primer trimestre) dependrà de cada reorganització cromosòmica concreta.

Les translocacions recíproques son relativament freqüents i s'estima que un de cada 1.000 individus es portador d'una translocació recíproca. Els individus portadors d'anomalies cromosòmiques acostumen a ser fenotípicament normals. No obstant, en la seva gran majoria coneixen el seu risc reproductiu ja que es freqüent que l'anomalia cromosòmica de que son portadors tingui un origen familiar. Per altra banda, no es estrany que siguin parelles que sol·liciten consell genètic degut a gestacions anteriors amb fetus cromosòmicament desequilibrats (al voltant del 5% dels casos amb síndrome de Down es produeixen com a resultat de una translocació parental) o que consulten per infertilitat degut a la seva dificultat per aconseguir gestacions evolutives.

La possibilitat d'aconsellar el diagnòstic genètic preimplantacional a aquestes parelles representa una opció per iniciar una gestació amb esperances d'arribar a bon fi.

#### **5.4. Altres candidats de risc.**

Al llarg dels darrers anys, el diagnòstic genètic preimplantacional ha augmentat àmpliament el seu espectre d'aplicacions. Així recentment s'ha suggerit la inclusió en els programes de diagnòstic genètic preimplantacional de parelles que presenten avortaments recorrents d'etiologia desconeguda (de fet molts equips de reproducció assistida ja indicaven que la fecundació in vitro en aquests pacients resulta en una millora en les taxes d'embarassos evolutius), en parelles amb fallades repetits d'implantació en cicles de fecundació in vitro i en pacients on s'han observat anomalies de la meiosi.

En tot aquest grup de pacients, la opció de dur a terme un diagnòstic preimplantacional cromosòmic (valoració d'aneuploides) ajudaria a obtenir embarassos evolutius i a minimitzar el risc de transmissió de cromosomopaties a la descendència.

## **6. Despeses**

- Estudi previ d'hibridació in situ per a la valoració de factors de risc en portadors d'anomalies cromosòmiques 50.000 ptes
- Biòpsies embrionàries 35.000 ptes
- Caracterització citogenètica per a la determinació del sexe embrionari 150.000 ptes



- Caracterització citogenètica en portadors d'anomalies cromosòmiques 175.000 ptes
- Caracterització citogenètica (valoració de les aneuploidies més freqüents) 300.000 ptes.
- Caracterització de malalties gèniques autosòmiques
  - Fibrosi quística: mutacions ?F508, 1609delCA, F508C 180.000 ptes
  - FIV (sense ICSI) 585.000 ptes
  - FIV + ICSI 550.000 + 75.000

## 7. Situació actual de l'activitat

De 1993 a setembre de 1999 s'han fet a Catalunya 116 diagnòstics preimplantacionals. D'aquests, 46 s'han realitzat a dones no residents a Catalunya i 70 a residents a Catalunya. La distribució de les indicacions d'aquestes determinacions ha estat la següent:

- 57 casos de sextat
- 38 de cribatge d'aneuploidies
- 17 de determinació d'anomalies cromosòmiques
- 4 per malalties monogèniques .

Amb els recursos humans i tècnics actualment disponibles al nostre país, es pot assumir la realització d'uns 70 casos de diagnòstic preimplantacional a l'any.

## 8. Consideracions ètiques i jurídiques

El DGPI està contemplat com una actuació permesa per la Llei 35/1988 sobre tècniques de reproducció assistida (Art 12.1) si té com a finalitat la valoració de la viabilitat embrionària, o la detecció de malalties hereditàries. Els organismes i comissions competents d'alguns països consideren que la situació del DPGI és encara la d'un tractament experimental, i recomanen que els grups interessats en aplicar aquesta tècnica demanin l'aprovació dels comitès locals d'ètica. L'acceptabilitat ètica del DGPI està condicionada en primer lloc pel tipus de material sobre el que es practica el DGPI. La biòpsia i l'estudi del primer corpuscle polar, abans de la fecundació, del segon corpuscle polar, i de les cèl·lules del trofoectoderm, no presenten objeccions importants en tant que no afecten directament l'embrió. La biòpsia de blastòmers durant l'estadi de 6-10 cèl·lules obliga a plantejar-se si les cèl·lules eliminades poden ser totipotents, i per tant merèixer la consideració d'embrions. Malgrat que això no

desqualifica la pràctica del DGPI en blastòmers, introdueix la conveniència de ponderar la importància de realitzar el diagnòstic. El DGPI implica la selecció dels embrions lliures de l'alteració genètica estudiada per a ser transferits, i l'eliminació dels embrions que presenten anomalies. No cal insistir en les òbvies avantatges d'aquest procediment sobre el diagnòstic prenatal, seguit d'una sempre traumàtica interrupció de l'embaràs. No obstant això, les diferències formals no afecten el fet substancial que suposa la destrucció d'embrions en molts casos viables. La valoració ètica del DGPI depèn doncs de la consideració que es pugui fer sobre l'estatut i els drets de l'embrió. Aquesta qüestió està molt lluny de ser resolta, en part per què els criteris aplicats no són únicament científics, sinó també morals. Amb la finalitat de precisar les indicacions que justifiquen la realització del DGPI, la Llei 35/1988 contemplava (disposició final primera, apartat d) l'elaboració de la llista de malalties genètiques o hereditàries detectables amb diagnòstic prenatal, a efectes de prevenció o tractament. L'elaboració de criteris per desenvolupar aquesta norma va ser encomanada posteriorment a la *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida* (Reial Decret 415/1997, art 4, apt. 4). L'absència d'aquesta llista no impedeix, però, d'aplicar el DGPI en funció dels avenços en el coneixement dels marcadors genètics, i segons els principis de la bona pràctica mèdica. L'analogia més propera es pot trobar en els supòsits en què es puguin preveure greus anomalies físiques o psíquiques per al fetus, contemplat en la Llei Orgànica 9/1985 de reforma de l'article 417 bis del Codi Penal per a la despenalització de l'interrupció voluntària de l'embaràs. La identificació- i per tant la possible exclusió -d'embrions portadors d'alteracions hereditàries recessives per mitjà del DGPI planteja alguns interrogants addicionals. A diferència del diagnòstic prenatal, on la decisió d'interrompre o continuar l'embaràs queda en mans de la mare o la parella, els professionals hauran de prendre una actitud protagonista en el procés de selecció. La qualitat dels embrions portadors i no portadors, la freqüència de portadors en la població general, el tipus de transmissió (recessiva, lligada al sexe) son condicionants que influiran en la conducta final, i que poden plantejar inclús el dilema de si cal iniciar un nou cicle de fecundació i DGPI. Aquestes consideracions fan necessari que el DGPI estigui precedit d'una informació completa, i que el consentiment de la parella hagi de ser per escrit. El document d'informació i consentiment haurà de constar dels següents elements:

- 1.- El risc per a la descendència (habitualment proporcionat durant el consell genètic previ).
- 2.- Consideracions ètiques en funció del tipus de DGPI previst.
- 3.- Alternatives possibles al DGPI

- 4.- Informació sobre el procés de fecundació in vitro, la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (si cal) i el procediment de la biòpsia.
- 5.- L'eficàcia i seguretat global del procés i les dades disponibles sobre resultats del mètode diagnòstic personalitzat per a cada cas.
- 6.- En el cas de que es realitzi DGPI de noves malalties, cal seguir un procediment equivalent al d'un assaig clínic.
- 7.- El mètode de gestió de les llistes d'espera (si n'hi ha) i establiment de prioritats.
- 8.- Conjunt de decisions que caldrà prendre durant el procediment (destí dels embrions anormals, conducta en cas de diagnòstic no informatiu).
- 9.- Conveniència de realització de diagnòstic prenatal, i de seguiment dels nadons fins a una edat preestablerta.
- 10.- Formulari de consentiment signat per la parella amb detall de les diferents alternatives escollides per a cada opció.

## 9. Visió futura del Diagnòstic Genètic Preimplantacional

En l'àmbit de les malalties monogèniques autosòmiques, la continua caracterització molecular de mutacions gèniques que hi estan implicades suggereix que el llistat de candidats als que oferir un diagnòstic genètic preimplantacional s'ampliarà notablement en els propers anys. No obstant, no s'ha oblidar que optimitzar protocols d'amplificació adaptats a una determinada mutació gènica amb fiabilitat i eficiència per a poder oferir-se en diagnòstic genètic preimplantacional representa un esforç científic considerable. En aquest sentit, la majoria d'equips implicats en diagnòstic genètic preimplantacional coincideixen en que, per a mutacions que es presentin amb una baixa incidència a la població, s'estableixin laboratoris de referència a nivell internacional. En l'àmbit del diagnòstic genètic preimplantacional aplicat a la caracterització cromosòmica, el futur estarà lligat al desenvolupament de noves metodologies que permetin un estudi citogenètic exhaustiu de les biòpsies embrionàries (anàlisi de tots els cromosomes, aplicació de protocols d'hibridació genòmica comparada, etc.). Les metodologies aplicades al diagnòstic genètic preimplantacional estan patint una constant evolució, tant pel que fa a possibilitats diagnòstiques com a eficiència de resultats obtinguts. Indiscutiblement, el futur del diagnòstic genètic preimplantacional estarà lligat al desenvolupament de noves metodologies que millorin en sensibilitat i en eficiència. Els beneficiaris potencials d'aquesta opció diagnòstica han augmentat notablement en els darrers anys, no obstant hem de tenir present que el

diagnòstic genètic preimplantacional no representa una alternativa al diagnòstic prenatal si no que es presenta com una opció per a reduir al màxim la probabilitat d'iniciar gestacions de fetus afectes en parelles que presenten un risc elevat de transmissió d'anomalies genètiques severes.

## **10. Criteris de selecció en la prestació d'aquest servei sanitari**

- 1.- No es considera aconsellable l'elaboració d'una relació d'indicacions específiques per a realitzar el diagnòstic preimplantacional que quedessin incloses en el catàleg de prestacions de la sanitat pública.
- 2.- Es considera convenient fixar un nombre màxim de casos assumibles a l'any per el SCS. Els que es preveuen necessaris per a Catalunya són entre 10 i 20 l'any. Aquest límit caldrà revisar-lo periòdicament en funció del possible augment de la demanda.