

Títol del treball: Revisió de les tècniques aplicables al diagnòstic genètic preimplantacional (DGP)

Estudiant: Clara Ferrer Carré

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1911093@campus.udg.edu

Tutor: Sílvia Sancho Badell

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor

Nom del tutor: Sílvia Sancho Badell

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): silvia.sancho@udg.es

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

AGRAÏMENTS

A la meva tutora, Sílvia Sancho, qui em va donar l'oportunitat de realitzar el treball que jo vaig decidir i qui em va ajudar en la realització d'aquest de principi a fi.

A en Joan Sarquella, sense el qual no hauria tingut l'oportunitat d'introduir-me en el món de la reproducció assistida, qui em va ajudar tot i ser una completa desconeguda que venia a empenyar i qui em va ajudar en tot moment des del principi només per dedicació.

Al gran equip que formen els treballadors de Reprogenetics que em van ajudar a entendre de manera pràctica les aplicacions del DGP.

A la meva família, la meva mare, el meu pare i la meva germana, i especialment a la meva àvia qui va marcar tant la meva infància i qui sempre m'ha recolzat i m'ha ensenyat els millors valors.

A en David, el qual sempre m'ha recolzat decidís el que decidís en els dies bons i dolents, i sobretot qui ha tingut la paciència d'aguantat totes les batalletes i anècdotes de la reproducció assistida tot i no interessar-li massa el tema.

Als meus amics, tant els de tota la vida (Maria, Raquel, Elena i Àlex) com els amics de la Universitat (Rebecca, Olga, Marc, Mercè, Irene, Pedro i Irene) els quals han demostrat fer-me costat en les bones i males situacions i m'han animat a tirar endavant amb els meus somnis.

I a totes les persones que d'una manera o altre m'han ajudat a fer possible la realització d'aquesta memòria.

RESUM

El Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP) és una tècnica associada a la Reproducció Assistida (RA) que consisteix en l'anàlisi del material genètic del preembrió amb la finalitat de determinar si aquest es troba lliure d'alteracions genètiques per a ser transferit a l'úter de la mare i possibilitar la descendència d'un individu sa.

Per a realitzar aquest projecte s'ha dut a terme una cerca exhaustiva, a partir d'una sèrie de paraules clau, en bases de dades, fonts bibliogràfiques i webgrafia, a més a més de la consulta a especialistes del sector mèdic. Per a complementar els coneixements teòrics adquirits es van realitzar estades amb el grup Girofiv i el grup Reprogenetics.

El DGP és una tècnica indicada bàsicament en parelles que presenten malalties lligades al sexe, malalties monogèniques, en la cerca de germans histocompatibles, en anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals, en dones que han patit avortaments recurrents o en pacients majors de 35 anys en les quals es pot sospitar de la presència d'alteracions gèniques en els oòcits. Per tal d'analitzar aquestes situacions es sol realitzar un consell genètic per part d'especialistes i es determinen totes les possibilitats de què disposen els pacients. Per a realitzar un DGP és necessari l'obtenció d'oòcits, els quals s'extrauen a partir d'una punció ovàrica amb prèvia estimulació hormonal. Els oòcits madurs (ja siguin de la pròpia pacient o de donant, els quals poden ser criopreservats) es fecunden *in vitro* o mitjançant injecció intracitoplasmàtica d'on en resultaran els preembrions, els quals seran seleccionats per a extreure'n una o més cèl·lules a partir d'una biòpsia del corpuscle polar, blastòmer o trofèctoderma. El DNA de les cèl·lules extretes és analitzat mitjançant principalment 3 tècniques: PCR, FISH i array de CGH.

La legislació d'aquesta tècnica es veu altament influenciada per qüestions ètiques i religioses. Espanya és un dels països de la Unió Europea i del món que més utilitza el DGP dins les tècniques de RA, existint una legislació força permissiva tot i que sempre validada per comissions especialitzades. Altres països europeus tenen legislacions més o menys restrictives respecte a aquesta tècnica. Fora d'Europa, els països amb mitjans per a aplicar el DGP generalment no presenten una legislació pròpia per aquest i sovint el regulen mitjançant comissions o a partir del que determina la pròpia religió.

RESUMEN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es una técnica asociada a la Reproducción Asistida (RA) que consiste en el análisis del material genético del preembrión con la finalidad de determinar si éste se encuentra libre de alteraciones genéticas para ser transferido al útero de la madre y posibilitar la descendencia de un individuo sano.

Para realizar este proyecto se ha llevado a cabo una búsqueda exhaustiva, a partir de una serie de palabras clave, en bases de datos, fuentes bibliográficas y webgrafía, además de la consulta a especialistas del sector médico. Para complementar los conocimientos teóricos adquiridos se realizaron estancias con el grupo Girofiv y el grupo Reprogenetics.

El DGP es una técnica indicada básicamente en parejas que presentan enfermedades ligadas al sexo, enfermedades monogénicas, en la búsqueda de hermanos histocompatibles, en anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, en mujeres que han sufrido abortos recurrentes o en pacientes mayores de 35 años en las que se puede sospechar de la presencia de alteraciones genéticas en los oocitos. Para analizar estas situaciones se suele realizar un consejo genético por parte de especialistas y se determinan todas las posibilidades de que disponen los pacientes. Para realizar un DGP es necesario la obtención de ovocitos, los cuales se extraen a partir de una punción ovárica con previa estimulación hormonal. Los ovocitos maduros (ya sean de la misma paciente o de donante, los cuales pueden ser criopreservados) se fecundan *in vitro* o mediante inyección intracitoplasmática de donde resultarán los preembriones, los cuales serán seleccionados para extraer una o más células a partir de una biopsia del corpúsculo polar, blastómero o trofotoderma. El DNA de las células extraídas es analizado mediante principalmente 3 técnicas: PCR, FISH y array de CGH.

La legislación de esta técnica se ve altamente influenciada por cuestiones éticas y religiosas. España es uno de los países de la Unión Europea y del mundo que más utiliza el DGP en las técnicas de RA, existiendo una legislación bastante permisiva aunque siempre validada por comisiones especializadas. Otros países europeos tienen legislaciones más o menos restrictivas respecto a esta técnica. Fuera de Europa, los países con medios para aplicar el DGP generalmente no presentan una legislación propia para este, y a menudo lo regulan mediante comisiones o a partir de lo que determina la propia religión.

ABSTRACT

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is a technique associated with assisted reproduction (AR) which is the analysis of genetic material from pre-embryo in order to determine if it is free of genetic alterations and to transfer it to the uterus of the mother enabling the seed of a healthy baby.

To do this project it has done a thorough search, searching many keywords in databases, bibliographic and webgraphy sources and consulting specialists in medical field. To complement the theoretical knowledge acquired stays were performed with Girofiv and Reprogenetics groups.

PGD is a technique basically indicated in couples who have sex-linked diseases, monogenic diseases, the search of histocompatible siblings, in numerical and structural chromosomal abnormalities, in women who have had recurrent abortions or in patients over 35 years where the doctor can suspect the presence of genetic alterations in oocytes. To analyse these situations is usually provided genetic counselling by specialists where all possibilities available to patients are determined. In the PGD it is necessary to obtain oocytes, which are extracted from ovarian puncture with prior hormonal stimulation. Mature oocytes (either from the same patient or donor, which can be cryopreserved) are fertilized *in vitro* or by intracytoplasmic injection to get the pre-embryos, which are selected to extract one or more cells from a biopsy polar body, blastomere or trophoctoderm. The extracted DNA from the cells is analysed by three techniques: PCR, FISH and CGH array.

The legislation of this technique is highly influenced by ethical and religious issues. Spain is one of the countries of the European Union and the world that most uses the PGD techniques of RA, having a fairly permissive legislation, always validated by specialized committee. Other European countries have more or less restrictive legislation regarding this technique. Outside Europe, the developed countries which use the DGP usually do not have separate legislation for this technique, and they often regulate it by commissions or from what determines their religion.

ÍNDIX

1.	Introducció	2
1.1.	El Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) dins les tècniques de reproducció assistida (RA)	2
1.1.1.	Principals causes d'infertilitat en humans	2
1.1.2.	Breu repàs de les principals tècniques de RA	3
1.2.	Esdeveniments més rellevants en RA.....	5
1.3.	El diagnòstic genètic	5
1.3.1.	Preimplantacional genetic screening (PGS) o Comprehensive Chromosome Screening (CCS)	5
1.3.2.	Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP).....	6
1.4.	Alteracions genètiques	6
1.4.1.	Anomalies gèniques (monogèniques)	7
1.4.2.	Anomalies cromosòmiques.....	7
2.	Objectives.....	7
3.	Material i mètodes	8
4.	Resultats i discussió.....	9
4.1.	Indicacions per a realitzar un DGP.....	9
4.1.1.	Consell genètic	9
4.2.	Marc legal del DGP.....	10
4.3.	Metodologia del DGP.....	11
4.4.	Etaques del DGP.....	11
4.4.1.	Biòpsia embrionària	11
4.4.1.1.	Procediment experimental	12
4.4.2.	Estudi genètic	13
4.4.2.1.	Fluorescent in Situ Hybridization (FISH).....	13
4.4.2.2.	PCR.....	14
4.4.2.3.	Microarray de hibridació genòmica comparada (CGH).....	15
4.5.	Transferència embrionària (TE).....	18
4.6.	Aplicacions clíniques del DGP.....	18
4.7.	Limitacions del DGP	21
4.7.1.	Tècnica	21
4.7.2.	Ètica	22
4.7.3.	Legislació	23
4.8.	Recopilació de dades de la pràctica del DGP.....	25
5.	Conclusions	26
6.	Bibliografia	27

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) dins les tècniques de reproducció assistida (RA)

S'entén per reproducció assistida (RA) el conjunt de mètodes i tècniques científiques ginecològiques de reproducció alternatives a les naturals, utilitzades fonamentalment per a solucionar els problemes d'infertilitat en humans. Aquestes tècniques s'utilitzen per a substituir alguns dels processos naturals de la reproducció amb la finalitat d'obtenir una descendència sana. En els últims anys s'ha experimentat un avenç notable en les diferents tècniques utilitzades i cada vegada s'obtenen millors resultats, fet que fa que hi hagi un gran interès en la recerca i la seva aplicabilitat clínica. Tot i que la RA és utilitzada sobretot per a solucionar problemes d'infertilitat, també pot ser utilitzada amb finalitats diferents com és la d'evitar la transmissió de malalties genètiques a la descendència i és aquí on s'inclouen les tècniques de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP). Aquestes tècniques poden ser també una eina útil alhora de solucionar determinats problemes d'infertilitat. Des de l'any 2002 la *Sociedad Española de Fertilidad-SEF* publica els informes relatius a la pràctica clínica del DGP en Reproducció Humana realitzada a Espanya (SEF, 1990).

1.1.1. Principals causes d'infertilitat en humans

Es defineix com a esterilitat la incapacitat per aconseguir un zigot viable i, per tant, una gestació. Altrament, es defineix el terme infertilitat com a dificultat per a aconseguir una descendència viva, de manera que s'aconsegueix gestar però s'acaba produint un avortament. Aquests dos termes, que sovint s'engloben en un mateix, poden ser primaris i donar-se des del primer intent d'embaràs, o secundaris en els casos de parelles que han pogut concebre anteriorment. Segons *l'Organització Mundial de la Salut (OMS)*, tant l'esterilitat com la infertilitat són considerats problemes de salut pública, i les parelles amb aquests problemes tenen el dret a ser tractades a partir de totes les tècniques disponibles des de la branca mèdica de la reproducció assistida.

La infertilitat afecta aproximadament a una de cada sis parelles en els països occidentals, amb una considerable implicació d'alteracions genètiques (García, 2007). Així, tant les tècniques de Reproducció Assistida com el nombre de centres que les duen a terme ha augmentat molt en els darrers anys.

Hi ha tant factors masculins (30% dels casos) com femenins (30%) que influeixen en la infertilitat. Un 15-30% dels casos és degut a una combinació dels factors dels dos sexes, i un 10% dels casos és degut a efectes desconeguts (conegut com a esterilitat idiopàtica) (García, 2007).

Les principals causes d'infertilitat en les dones són el factor ovàric (alteracions en l'ovulació, trastorns hormonals...), factor tubàric (obstrucció congènita o per inflamació de les trompes de Fal·lopi o alteració de l'epiteli), factor uterí (alteracions anatòmiques i endometriosis), factor cervical (quistos, pòlips, canvi de les característiques del moc cervical...), errors de fecundació (problemes en la interacció dels gàmetes), exposició a medicaments i drogues, influència del medi ambient i factor psicòtic i emocional. Altrament en homes els diferents factors són anomalies seminals degut al mal funcionament dels testicles o de les vesícules seminals, anomalies en les vies seminal (absència de conductes i obstruccions), trastorns hormonals, anomalies genètiques, disfunció erèctil, exposició a medicaments i drogues, varicoceles, influència del medi ambient, factor psicòtic i emocional (García, 2007).

A més a més hi pot haver influència de l'edat dels progenitors en les causes d'infertilitat. Això és degut a que al llarg de la vida s'està exposat a l'ambient, el qual conté tòxics i radiacions que

afecten directament sobre els gàmetes, pel que hi ha una afectació de major intensitat en la dona que és portadora de tots els seus gàmetes des de la infància (pateix un descens del potencial reproductiu a partir dels 35 anys). Altrament, l'home presenta un procés d'espermatogènesi continu al llarg de la seva vida, de manera que és més difícil que els espermatozoides pateixin alteracions genètiques notables degudes a l'ambient.

La infertilitat en la societat actual és un problema cada vegada més freqüent i en molts casos segueix sent de causa desconeguda. Un dels principals factors coneguts que ha derivat a aquesta situació és l'endarreriment de l'edat mitja de concepció de les diferents poblacions. A través del coneixement dels diferents factors que poden alterar la fertilitat i, amb l'ajuda de les diferents tècniques de diagnòsi, es podria dur a terme planificacions personalitzades i així optimitzar els diferents tractaments necessaris en reproducció assistida per a obtenir els millors resultats (García, 2007).

1.1.2. Breu repàs de les principals tècniques de RA

La reproducció assistida inclou tant els mètodes d'obtenció de gàmetes com els mètodes de manipulació d'aquests amb l'objectiu d'aconseguir un embaràs viable. En la majoria dels casos les parelles que recorren a la reproducció assistida ho fan degut a problemes de fertilitat. Inicialment es comprova quin dels dos progenitors presenta anomalies mitjançant anàlisis de sang en ambdós individus (nivells hormonals) i anàlisis seminals en l'home. A mesura que es descarten patologies diverses es realitzen anàlisis més complertes per a intentar determinar les possibles causes d'infertilitat i així determinar quin és el tractament més indicat en cada cas.

L'obtenció d'espermatozoides per als diferents tractaments pot ser a partir de semen fresc, semen criopreservat (mètode de congelació), de l'orina (en pacients amb ejaculació retrògrada), dels conductes epididimaris (MESA- *microepididymal sperm aspiration* i PESA- *percutaneous epididymal sperm aspiration*) o dels testicles (TESA- *testicular sperm aspiration* i TESE- *testicular sperm extraction*). Segons el mètode d'obtenció dels espermatozoides/semen es realitzarà tractaments de criopreservació (en el cas que es vulguin conservar per una situació futura) o tractaments d'optimització (selecció d'espermatozoides) per a utilitzar-los en fresc en les diferents tècniques de RA.

En RA es pot preveure en quin moment del cicle ovàric es troba la dona a partir de la temperatura basal, examen del moc cervical, ecografies de l'evolució fol·licular i anàlisis dels nivells hormonals, especialment la LH. A més a més es pot dur a terme una superovulació en el cas que es vulgui dur a terme una aspiració fol·licular per a obtenir els oòcits que més tard seran classificats i processats segons l'ús que se'ls vulgui donar (criopreservació o utilització *in situ*) (Serhal, 2004).

Les principals tècniques utilitzades per a aconseguir l'embaràs són la inseminació artificial (IA), la fecundació *in vitro* (FIV) i la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI).

El mètode d'inseminació artificial consisteix en la inoculació de semen capacitat de la parella o d'un donant (pot ser semen criopreservat) a dins el tracte reproductor de la dona durant el període periovulatori. L'ovulació de la dona pot ser normal o controlada, tot i que en aquests casos el problema sol venir donat per l'home. Aquesta inseminació artificial pot ser intravaginal, intracervical, intrauterina (IUI) o intraperitoneal (GIFT- *gamete intrafallopian transfer* i ZIFT- *zygote intrafallopian transfer*). Cada una d'aquestes tècniques és indicada segons la patologia corresponent dels pacients i pot comportar riscos com són l'embaràs múltiple i el síndrome d'hiperestimulació ovàrica (MNT, 2011).

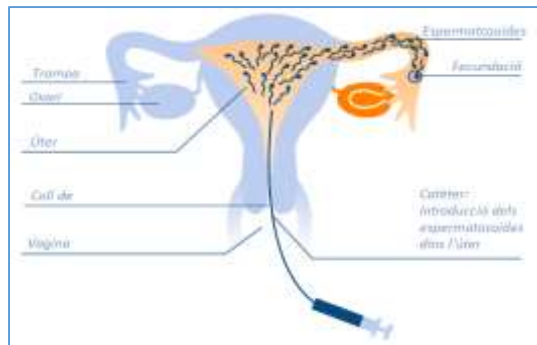


Figura 1. Mètode d'Inseminació Artificial Intrauterí (IUI). Extret de <http://www.cpm.ch>.

La fecundació in vitro (FIV) consisteix en la coïncubació d'òocits madurs amb espermatozoides mòbils durant unes 16-20 hores a unes condicions òptimes per aquests. Els espermatozoides poden ser frescos o criopreservats, igual que els òocits. En molts casos es du a terme una estimulació de la superovulació per aconseguir els òocits de la mateixa pacient a partir de l'extracció dels fol·licles madurs. Seguidament es selecciona els òocits fecundats per espermatozoides gràcies a l'aparició visible dels dos pronuclis i primeres divisions a partir dels 2 dies, a més a més de la classificació per les característiques fisiològiques d'aquests (cèl·lules d'igual mida, presència o no de fragmentació...). Els blastòmers es mantindran en cultiu un màxim de 5 dies fins a poder dur a terme una transferència embrionària transvaginal (als 5 dies de vida dels blastòmers) o intratubàrica (als 2-3 dies). Els embrions que no s'han utilitzat es poden criopreservar per a posteriors tractaments. En aquest cas, les possibilitats de patir un embaràs múltiple dependran del nombre de pre-embrions transferits, amb un màxim de 3 pre-embrions permesos a l'Estat Espanyol (U.S. National Library of Medicine, 2015).

La injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) consisteix en l'obtenció i selecció d'òocits (ja siguin criopreservats o per estimulació de la superovulació seguida d'una aspiració fol·licular) en els quals se'ls injectarà els espermatozoides (en fresc o criopreservats) a través d'una microinjecció. Els òocits que hagin resultat fecundats seran seleccionats per a una posterior transferència com en el cas de la FIV. Els principals problemes que pot comportar aquest mètode són embarassos ectòpics, avortaments naturals, embarassos múltiples i el síndrome de hiperestimulació ovàrica (RA, 2015). Una altra modalitat d'aquesta tècnica és l'IMSI (*intra-cytoplasmic morphologically-selected sperm injectio*) la qual consisteix en una ICSI amb prèvia selecció dels espermatozoides segons les seves característiques morfològiques (Institut Marquès, 2015).



Figura 2. Microinjecció d'un espermatozoide seleccionat en un oòcit madur en el mètode IMSI (imatge extreta d'un enregistrament realitzant IMSI (Girofiv. Clínica Girona)).

1.2. Esdeveniments més rellevants en RA

La RA és una ciència que s'ha desenvolupat molt recentment i que encara necessita de molts estudis per a continuar millorant les seves tècniques. El primer cas d'inseminació artificial dut a terme amb èxit en animals es va realitzar el 1776, però no va ser fins el 1884 quan es va publicar el primer cas de donació de semen per a inseminació artificial. En el 1944 es va realitzar la primera fecundació in vitro (FIV) d'un oòcit humà aconseguint un embaràs, i el 1954 es va aconseguir el primer embaràs a partir d'esperma congelada. El 1969 es va realitzar la primera fecundació in vitro a partir d'un oòcit immadur. El 1979 neix Louise Brown a Anglaterra, el primer nadó nascut a partir d'una fecundació in vitro i, un any abans, al 1978, neix Elisabeth Jordan Carr, primera nena Americana concebuda a través d'una fecundació in vitro (*ART, ART and Embryo Donation*, 2012). A l'Estat Espanyol, el primer nadó nascut a partir d'una FIV es va produir al 1984.

El primer nadó nascut a partir d'un embrió congelat i primer nadó nascut a partir d'una donació d'òvuls (FIV) va tenir lloc l'any 1984. En el 1986 va tenir lloc la utilització per primera vegada de les tècniques GIFT (transferència de gàmetes intratubàrica) i ZIFT (transferència de zigot intratubàrica). En el 1990 es va realitzar per primera vegada l'aplicació clínica del DGP. El primer cas conegut d'incubació assistida de pre-embrions va tenir lloc el 1990, i el primer embaràs amb èxit utilitzant la tècnica ICSI (injecció espermàtica intracitoplasmàtica) el 1992. L'any 2000 va néixer el primer nadó nascut a partir d'oòcits i espermatozoides criopreservats. En el 2010 es va començar a utilitzar un aparell que optimitzava les condicions dels oòcits i preembrions in vitro, l'embrioscop. Al 2015, el Regne Unit va aprovar la reproducció assistida amb l'ADN de 3 pares per a evitar malalties mitocondrials, cas molt polèmic degut a la ètica que comporta (Harper, 2012; Público, 2015).

1.3. El diagnòstic genètic

El diagnòstic genètic consisteix en una sèrie de tècniques que es poden dur a terme en la reproducció assistida lligades a la genòmica. Un Diagnòstic Genètic Prenatal (DP) consisteix en un diagnòstic genètic que utilitza una sèrie de tècniques per a determinar possibles anomalies genètiques en un fetus, de manera es tracta d'un diagnòstic que es realitza en una dona embarassada. Un Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP) consisteix bàsicament en realitzar una biòpsia dels preembrions per a obtenir una o més cèl·lules i analitzar-ne el contingut genètic, amb la finalitat de detectar possibles malalties hereditàries, la qual pot ser una alternativa al DP. Segons l'objectiu concret del DGP es pot diferenciar entre el DGP pròpiament i el *Preimplantacional Genetic Screening* (PGS).

1.3.1. *Preimplantacional genetic screening* (PGS) o *Comprehensive Chromosome Screening* (CCS)

El PGS és un mètode de diagnòstic que consisteix en la cerca d'anomalies en el contingut genòmic i es realitza quan es té sospita de possibles anomalies com és el cas de les dones que no es troben en l'etapa de major fertilitat (a partir dels 35 anys). A mesura que s'augmenta l'edat es pot observar un deteriorament cada vegada major en els oòcits de les dones per causes vàries com són els hàbits i l'entorn. Així, en aquests casos pot ser recomanable realitzar aquest tipus d'anàlisi (Harper, 2012).

1.3.2. Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP)

El diagnòstic genètic preimplantacional (DGP o PGD) sovint s'utilitza englobant el PGS. En aquest diagnòstic es busca determinades malalties concretes conegudes per l'historial familiar dels pacients o be degut a que els propis progenitors la pateixen. Un DGP sempre anirà lligat a la reproducció assistida (ICSI o FIV) ja que depèn de la manipulació d'un preembrió amb una possible transferència posterior. A partir d'aquest diagnòstic es podrà escollir quins preembrions seran transferits a l'úter de la mare i quins no. Un avantatge notable d'aquest mètode respecte al DP és que no fa falta dur a terme un embaràs per a realitzar l'anàlisi, de manera que no es planteja l'avortament en casos de mals diagnòstics. Bàsicament s'utilitza en parelles que pateixen alguna malaltia genètica o amb familiars que la presenten, pares amb fills anteriors afectats, dones que han patit avortaments, dones que presenten errors d'implantació en tractaments previs de RA o en dones d'edat avançada. La tecnologia requerida en aquests tractaments i anàlisis és complexa i requereix d'un personal altament qualificat fet que fa que es tracti d'una metodologia amb elevats costos econòmics. Per a realitzar-lo s'utilitzen bàsicament tres tècniques: PCR amb encebadors específics i seqüenciació, el mètode FISH i finalment un de força recent que sembla substituir a l'anterior, els micro-chips d'array CGH (Harper 2012; The ABCs of PGD; PGS and More 2015).

Les principals etapes per a la realització del DGP/PGS són:

- Consulta i estudi genètic i citogenètic amb la determinació del risc d'una possible malaltia (consell genètic).
- Estudi de la malaltia mitjançant anàlisis de laboratori i realització del diagnòstic.
- Estimulació ovàrica.
- Programar la punció ovàrica segons el cicle.
- Obtenció dels oòcits (per punció) i dels espermatozoides (a partir de semen fresc o criopreservat).
- Preparació dels oòcits i espermatozoides.
- Realització d'una FIV o ICSI.
- Avaluació dels pre-embrions resultants i classificació.
- Biòpsia dels pre-embrions seleccionats (del cos polar, blastòmers o trofèctoderma) i fixació.
- Diagnòstic sense sobrepassar mai els 14 dies límit d'incubació dels pre-embrions (BOE, Llei 14/2006, capítol 4, article 15). Si es necessita més de 6 dies per a realitzar els tests es recorre a la criopreservació dels preembrions ja que a partir d'aquest dia la taxa d'implantació disminueix.
- Transferència dels embrions amb resultats acceptables (a Espanya la llei delimita un màxim de 3 pre-embrions transferits en un sol cicle (BOE, Llei 14/2006, capítol 1, article 3)).
- Seguiment post-transferència mitjançant controls hormonals i ecografies. En alguns casos es pot realitzar un Diagnòstic Prenatal amb possibilitat d'avortament si es dona un mal diagnòstic.

1.4. Alteracions genètiques

Considerem com a alteracions genètiques qualsevol alteració del genoma que té un efecte fenotípic o no en l'individu. Aquestes constitueixen la font principal de variació en el genoma

dels organismes i per tant de fenotips nous. Tot i els possibles avantatges, en la majoria de casos una mutació serà defectiva, donant com a resultat un mal funcionament de l'organisme fins al punt que en pot causar una patologia greu o fins i tot la mort. La sospita d'una malaltia genètica és l'objectiu de la realització del DGP. Aquestes anomalies genètiques es poden classificar en anomalies monogèniques i cromosòmiques.

1.4.1. Anomalies gèniques (monogèniques)

Les alteracions monogèniques afecten només a un dels dos al·lels d'un gen degut a canvis a nivell de nucleòtid. Són causades per substitucions, delecions i/o insercions de nucleòtids. Poden tenir una herència Mendeliana (autosòmiques dominants o recessives, lligades al sexe dominants o recessives i mitocondrials) o no (mosaicisme i empremta genètica) (Centro de Medicina Embrionaria, 2013).

Les alteracions multifactorials són aquelles que estan afectades per diferents factors (més de dos gens), a més a més d'haver-hi una afectació clara de l'ambient. Així, el risc de patir aquestes alteracions dependrà inicialment del genotip de cada progenitor. En la majoria dels casos un dels dos sexes es veu més afectat que l'altre en l'expressió dels diferents fenotips associats (NEWS MEDICAL, 2015).

1.4.2. Anomalies cromosòmiques

Les alteracions cromosòmiques són errors que es produeixen en la gametogènesi o en les primeres divisions dels zigots i que donen com a resultat alteracions en el nombre de gens o en l'ordre d'aquests dins dels cromosomes. Si l'error es dona en la gametogènesi, trobarem que totes les cèl·lules del nou organisme presentaran l'anomalia. En canvi, si es dona en les primeres divisions del zigot, es pot donar un cas de mosaicisme en el qual algunes cèl·lules del nou organisme presentaran les anomalies i altres no. Les alteracions cromosòmiques es divideixen en en numèriques i en estructurals.

Les alteracions cromosòmiques numèriques es caracteritzen per l'alteració del nombre normal de cromosomes que s'esperaria. Per un costat es presenten les aneuploidies que consisteixen en una mala repartició dels cromosomes en la divisió cel·lular, de manera que el resultat són línies amb trisomies, monosomies i nul·lisomies (letals). Per altre banda una poliploidia és el fet de presentar 3 o més jocs complets de cromosomes (triploidia i tetraploidia són els casos més freqüents) (JF Griffiths, 2000).

Les anomalies cromosòmiques estructurals es produeixen quan hi ha un trencament que afecta a un o més cromosomes i no es hi ha una reparació correcta. Quan el trencament cromosòmic es produeix a la línia germinal es consideren hereditàries. Quan les alteracions es produeixen a la línia somàtica no ho són. Les causes d'aquest tipus d'alteració són les translocacions robertsonianes, translocacions recíproques, delecions, insercions, duplicacions, mosaicisme, isocromosomes i cromosomes en anell (University of Rochester, 2015).

2. OBJECTIVES

The main objective of this project is to review the current state of the assisted reproductive techniques (ART) in relation to the preimplantational genetic diagnosis (PGD). The interest of this work is focused in those genetic techniques destined to predict the birth of healthy newborns.

The specific objectives of this project are:

- To check the validity of the genetic techniques used in PGD destined to predict the embryo state before its implantation.
- To assess and compare from an ethical and legal point of view the current use of the PGD techniques in Spain and around the world.

3. MATERIAL I MÈTODES

Per a dur a terme aquest treball s'ha realitzat una primera cerca bibliogràfica general que ha consistit en una selecció del fons de la Biblioteca de la Universitat de Girona d'aquells textos científics i articles de revisió en el camp de la reproducció assistida i més concretament en el diagnòstic genètic preimplantacional.

Seguidament i, al llarg de la realització del treball, s'ha anat especialitzant més la cerca bibliogràfica mitjançant la selecció d'aquells articles indexats publicats a diferents bases de dades (PubMed -Medline, Scopus, ScienceDirect i Wiley) i que se centren en les tècniques de diagnòstic genètic preimplantacional utilitzades fins a l'actualitat.

Inicialment aquesta cerca a les bases de dades s'ha dut a terme a partir d'una primera selecció amb les paraules clau: *assisted reproduction*, *DGP* i *PGS* on s'han trobat articles generals per a situar el context del DGP i les diferències d'aquest amb el PGS. S'ha seleccionat cada article en base a l'especificitat de l'assaig experimental i l'any de realització d'aquest degut a que la reproducció assistida és un camp en constant evolució.

A mesura que s'han anat tractant els diferents temes s'ha realitzat una segona selecció de manuscrits a partir d'altres paraules clau específiques de cada tema.

En la majoria de casos s'ha basat la cerca en aplicacions de la Reproducció Assistida en l'espècie humana.

Per tal de complementar la recerca bibliogràfica en què es fonamenta aquest treball es va realitzar una estada d'una setmana als laboratoris del grup *Girofiv* de Reproducció Assistida a la Clínica Girona (Girona) on s'ha pogut observar, de primera mà, les tècniques bàsiques de la reproducció assistida com són, les diferents tècniques de manipulació de gàmetes i pre-embrions, les tècniques ICSI, IMSI, DGP, la transferència embrionària.

Inicialment es va intentar aconseguir les dades relatives al DGP en els últims tres anys del màxim de clíniques de reproducció assistida de Catalunya tot i que no va ser possible. Malgrat es van dirigir nombrosos correus, no es va obtenir resposta de la majoria i per tant no es va poder dur a terme un tractament estadístic de les dades. A partir de les dades obtingudes s'ha pogut fer una valoració subjectiva del grau d'aplicabilitat de la tècnica del DGP.

Tanmateix es va fer una breu estada a *Reprogenetics* (Barcelona), un laboratori dedicat a la genètica reproductiva, on es va poder observar les dues tècniques principals utilitzades actualment en el DGP: la PCR amb seqüenciació i els microarrays de CGH.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Indicacions per a realitzar un DGP

El DGP és una tècnica recomanada en casos en què l'història clínica de la parella o d'algun dels progenitors presenta o pot presentar anomalies genètiques que poden afectar a la descendència i, per tant, la selecció d'un embrió abans de la seva transferència pot evitar-ho. Fins a la primera aplicació clínica del DGP (Handyside et al., 1990) només es podia evitar la transmissió de malalties genètiques a la descendència mitjançant el diagnòstic genètic prenatal (DP) i el corresponent avortament terapèutic. De totes maneres, no es tracta d'una metodologia aplicada de forma rutinària arreu degut a la seva complexitat, cost econòmic i marc legal.

En els països en què la legislació ho permet, el DGP s'ofereix, sempre necessàriament associat a un cicle de FIV o ICSI, a parelles que pateixen o són portadores d'alguna malaltia genètica o amb familiars directes que la pateixen o en són portadors i que pot ser transmesa a la seva descendència. També es pot utilitzar com a eina terapèutica en dones que han patit avortaments recurrents, ja sigui amb o sense la utilització de tractaments de FIV, sense conèixer la causa exacta o per errors d'implantació de l'embrió a les parets de l'úter.

La Sociedad Española de Fertilidad (SEF) facilita un arxiu amb recomanacions relacionades amb el diagnòstic genètic preimplantacional que recullen diferents aspectes com són els criteris d'inclusió i exclusió en DGP, aconsellant la seva realització quan el diagnòstic genètic és tècnicament possible, la seva fiabilitat elevada, la taxa d'èxit acceptable, les tècniques de reproducció assistida factibles i no aconsellant la seva realització quan el diagnòstic genètic no és tècnicament possible o de resultat incert, quan la taxa d'èxit no és acceptable o si les tècniques de reproducció assistida estan contraindicades.

Actualment el DGP és una tècnica inclosa dins la cobertura que ofereix la Seguretat Social a l'Estat Espanyol regulada per la Llei 1030/2006, però accedir-hi és difícil degut a les llistes d'espera, requisits, proves requerides i avaluacions favorables de les comissions encarregades de valorar la seva conveniència (Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida). A més a més cada centre té els seus requisits, un nombre concertat de cicles a l'any i cobreix només una part o tot el tractament.

4.1.1. Consell genètic

En molts casos es realitza un consell genètic en el qual un grup d'especialistes que tracten el cas analitzen la situació clínica de cada parella i informen dels diferents procediments de RA que es poden realitzar, entre ells el DGP. Una indicació afegida per a realitzar el consell genètic són les poblacions amb un major risc de patir malalties degut a l'alta consanguinitat com és en el cas de certs grups ètnics.

En el consell genètic s'informa objectivament als pacients de les conseqüències de l'anomalia cromosòmica o la malaltia genètica de la que en són portadors, les probabilitats de transmetre l'anomalia cromosòmica o malaltia genètica, les possibilitats de prevenir-la, evitar-la o millorar-la i dels possibles beneficis de la realització del DGP. Tanmateix, el o els pacients han de signar

el consentiment informat on ha de constar-hi, com a mínim, la següent informació: objectiu del DGP, procediment del procés de FIV-DGP, especificant la unitat on es realitza cada un dels procediments, en què consisteix la biòpsia embrionària i la tècnica diagnòstica que s'utilitzarà, limitacions de la tècnica, riscos associats a la metodologia (biòpsia embrionària i anàlisi genètica), possibles beneficis, alternatives al DGP, aspectes legals relacionats amb el DGP i firma de consentiment mitjançant l'arxiu de consentiment informat facilitat per la SEF (SEF, 2015).

4.2. Marc legal del DGP

La legislació espanyola regula la Reproducció Humana Assistida a partir de la Llei 14/2006 del 26 de maig (BOE núm. 126) i la Llei 1030/2006 del 15 de setembre que regula les cobertures de la Seguretat Social (annex 3, BOE núm. 269).

La Llei 14/2006 decreta que el DGP es pot dur a terme amb finalitat de prevenció de la transmissió de malalties o trastorns d'origen cromosòmic o genètic greus, d'aparició precoç i no susceptibles de tractament curatiu mitjançant els coneixements científics actuals, amb l'objectiu de dur a terme la selecció embrionària dels preembrions no afectats per a la seva transferència. Les situacions concretes per les que es pot indicar el DGP amb finalitat preventiva són: malalties monogèniques susceptibles de ser detectades per DGP i anomalies cromosòmiques estructurals o numèriques maternes o paternes.

El DGP es pot realitzar amb aquesta finalitat quan es compleix que: existeix alt risc de recurrència de la malaltia present en la família i que el trastorn genètic pugui generar greus problemes de salut, és a dir, que la malaltia de base genètica comprometi l'esperança de vida i/o qualitat de vida del nounat (discapacitat intel·lectual, sensorial o motora) no susceptible d'un tractament curatiu respecte als coneixements científics actuals. Tanmateix és necessari que el diagnòstic genètic sigui possible i fiable i inclogui un informe de consell genètic on s'especifiqui l'estatus genètic de la parella o família consultant en relació a la malaltia i la identificació del gen implicat, la mutació responsable i la certesa de la relació fenotip/genotip. Aquests requisits inclouen que ha de ser possible realitzar un procediment de fecundació in vitro/injecció espermàtica intracitoplasmàtica (FIV-ICSI) amb una resposta adequada després d'una estimulació ovàrica controlada. A més s'han de complir els criteris específics per a FIV amb gàmetes propis.

A més a més dels criteris anteriors serà necessari una autorització expressa de l'autoritat sanitària corresponent, previ informe favorable de la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida.

La Llei també contempla que es pugui realitzar el DGP amb finalitat terapèutica a tercers: DGP en combinació amb la determinació dels antígens de histocompatibilitat HLA (antigen leucocitari humà) dels preembrions in vitro per a la selecció de l'embrió HLA compatible. Els criteris específics per a accedir a aquesta tècnica són: dones amb edat menor a 40 anys en el moment d'indicació del tractament i amb una reserva ovàrica suficient per a la finalitat del tractament que es persegueix, existència d'indicació reconeguda, és a dir, fill previ afectat de malaltia que necessita tractament amb precursors hematopoètics procedents d'un germà histocompatible i l'autorització expressa de l'autoritat sanitària corresponent, previ informe favorable de la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida.

Segons aquesta mateixa llei el límit màxim de cicles de tractament és de tres cicles amb estimulació ovàrica i tres cicles addicionals després de la valoració clínica pel facultatiu

especialista o, en el seu cas, per la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida dels resultats obtinguts en els tres cicles inicials. Aquest límit podrà reduir-se en funció del pronòstic, i en particular dels resultat dels tractaments previs.

D'altra banda, la Llei 1030/2006 que regula les cobertures de la Seguretat Social decreta que els centres degudament autoritzats poden practicar tècniques de diagnòstic preimplantacional per a la detecció de malalties hereditàries greus, d'aparició precoç i no susceptibles de tractament curatiu postnatal d'acord amb els coneixements científics actuals, per tal de portar a terme la selecció embrionària dels preembrinos no afectes per a la seva transferència, la detecció d'altres alteracions que puguin comprometre la viabilitat del preembrió. L'aplicació de les tècniques de diagnòstic preimplantacional en aquests casos s'ha de comunicar a l'autoritat sanitària corresponent, que n'ha d'informar a la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida .

4.3. Metodologia del DGP

Com s'ha comentat anteriorment, la realització del DGP implica necessàriament sotmetre's a tècniques de reproducció assistida per tal d'obtenir oòcits fèrtils, fecundar-los amb espermatozoides, obtenir els embrions, seleccionar-los i transferir-los a l'úter de la pacient.

El primer pas consisteix en una estimulació de la superovulació a partir de l'administració de diferents dosis d'hormones al llarg d'un cicle, seguit d'una punció ovàrica. La mitjana d'oòcits extrets és de 8-10 d'alta qualitat. Els oòcits es classifiquen en funció de la seva maduresa i característiques morfològiques i es co-incuben amb espermatozoides (de la parella o de donant) per a ser fecundats in vitro (FIV). En casos més complexes es pot realitzar una ICSI/IMSI (Intracytoplasmic Sperm Injection/ Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection) on es seleccionen els millors espermatozoides per a ser introduïts mecànicament ens els diferents oòcits. Els oòcits fecundats presentaran dos pronuclis i seran preservats en cultiu. Actualment s'utilitza l'aparell embryoscope per a minimitzar les alteracions en les condicions en que es troben els pre-embrións i on es registra tot el procés en imatges. En els dies posteriors es seleccionaran aquells pre-embrións que presentin bones característiques morfològiques i se'ls realitzarà el DGP abans del dia 6 després de la fecundació. Una vegada s'obtenen els resultats de les diferents anàlisis de DGP, es seleccionaran d'1 a 3 pre-embrións (nombre màxim establert per la llei espanyola, REF) per a ser transferits intra-tubàricament a la pacient; els altres pre-embrións seran criopreservats i emmagatzemats. Una vegada transferits a la pacient els pre-embrións seleccionats per DGP, se li realitzarà el seguiment posterior per a determinar l'èxit o no del procés d'embaràs. S'ha de tenir en compte que l'èxit del procés no només depèn dels resultats del DGP sinó també d'altres factors, entre d'altres, la criopreservació de l'espermatozoide, l'edat de la mare, l'estat fisiològic i psicològic de la mare, els factors ambientals, la fragmentació del DNA espermàtic, etc.

4.4. Etapes del DGP

4.4.1. Biòpsia embrionària

La biòpsia embrionària es realitza a partir de pre-embrións en condicions de cultiu de FIV i a partir del tercer dia quan ja ha experimentat varies divisions mitòtiques. El fet de realitzar la biòpsia en l'estadi de 2-4 cèl·lules (segon dia de cultiu) pot produir una reducció de la massa

cel·lular interna (MIC) de l'embrió la qual cosa pot afectar notablement en el seu posterior desenvolupament. Existeixen tres tipologies de biòpsia, tot i que actualment les dues últimes són utilitzades amb més freqüència (Braude et al., 2002; Sermon, 2004; Moreno, 2007):

- **Biòpsia del corpuscle polar:** permet extreure el primer corpuscle polar (CP), de l'òcit, i el segon, del zigot. Aquest tipus de biòpsia permet estudiar només el material genètic matern.
- **Biòpsia en cèl·lules de l'embrió (biòpsia de blastòmer):** permet l'extracció d'una o dues cèl·lules del blastòmer en dia 3 i es tracta de la tècnica més utilitzada ja que és la que permet obtenir uns resultats fiables amb menys temps. A més a més, al realitzar-se en preembrions de unes 6-8 cèl·lules, permet tenir la seguretat de que es treballa amb preembrions potencialment viables.
- **Biòpsia del trofotoderma:** permet extreure vàries cèl·lules del teixit del trofotoderma del blastocist a dia 5-6 de desenvolupament (es recomana realitzar la biòpsia amb làser). Aquesta tècnica permet definir els possibles mosaics en els embrions però sovint requereix de tècniques de criopreservació (a partir del 6è dia de desenvolupament) mentre es realitzen les diferents anàlisis genètiques, fet que comporta una menor eficàcia de la tècnica degut a la menor viabilitat de l'embrió.

4.4.1.1. Procediment experimental

Per a realitzar el DGP és necessari el següent equipament: un microscopi invertit amb òptica de Hoffman, el qual permet veure una imatge clara de l'embrió, un micromanipulador hidràulic que permet manipular amb facilitat l'embrió a biopsiar, una pipeta d'aspiració i una pipeta de subjecció o *holding* que manté subjecte l'embrió en una placa amb medi de biòpsia.

Inicialment es realitza una perforació de la zona pel·lúcida de l'embrió, que pot ser portada a terme mitjançant diferents possibles mètodes: una punció en el cas de l'extracció del CP (mecànicament), mitjançant el tractament amb àcid Tyrode o bé a través d'un làser associat al microscopi en el cas de la biòpsia del trofotoderma. Els mètodes més utilitzats són l'àcid Tyrode seguit del làser. En un recent estudi es va poder observar que la utilització del làser comporta una menor exposició de les cèl·lules del preembrió ja que el procediment és més ràpid i es creu que això pot dur a una major taxa d'implantació (Geber et al., 2011). Aquest mètode només s'utilitza en alguns casos ja que és necessari disposar d'un làser acoblat a un microscopi. Generalment les empreses que realitzen el DGP acostumen a desplaçar-se fins als centres de RA per a realitzar la biòpsia dels preembrions, de manera que no els permet utilitzar el làser ja que comportaria que tots els centres de RA disposessin d'un. Així, en aquests casos la tècnica més útil és utilitzar l'àcid Tyrode el qual no requereix un transport costós. El mètode de l'àcid Tyrode consisteix en aplicar una petita quantitat d'àcid per a originar un petit orifici a la zona pel·lúcida del preembrió, de manera que es pugui extreure una cèl·lula per aspiració. Tant l'extracció del CP com del blastòmer es realitza mitjançant aspiració (pipeta d'aspiració), i en el cas del trofotoderma l'extracció es realitza mitjançant l'estrangulament.

El nombre de cèl·lules biopsiades dependrà de l'embrió i el professional que realitzi el procediment, tot i que es recomana extreure només una cèl·lula fins a dia 5. Sempre s'intentarà realitzar la biòpsia en cèl·lules mononucleades i en el cas que l'anàlisi no sigui vàlida es podrà tornar a biopsiar el mateix embrió (es recomana utilitzar el mateix orifici per a aspirar la cèl·lula). Una vegada ha acabat el procés, s'ha de rentar els embrions i passar-los a un medi de cultiu sense restes d'àcid o del medi de biòpsia. Els embrions biopsiats es mantenen de manera

individual, sempre ben identificats, en cultiu en les condicions òptimes fins a obtenir els resultats de les anàlisis en el DGP. En els casos en què l'embrió arribi als 6 dies de cultiu, aquest és criopreservat, tot i que es pot mantenir en cultiu fins a 14 dies tal com decreta la Llei 14/2006 de 26 de maig (article 15, apartat 1.b).

En el cas que un embrió quedi danyat en el procés de biòpsia, aturarà el seu creixement i ja no serà apte per a ser transferit. Les metodologies de biòpsia han de presentar un risc de dany a l'embrió inferior a l'1% (SEF Recomendaciones, 2015).

Després de la transferència embrionària els embrions sobrants hauran de ser criopreservats o bé per a una posterior utilització per part de la mateixa pacient o en donacions a altres pacients o en donacions a la ciència. Els embrions sobrants no podran ser destruïts i hauran de ser criopreservats (Capítol 3- article 11.4 de la Llei 14/2006 de 26 de maig).

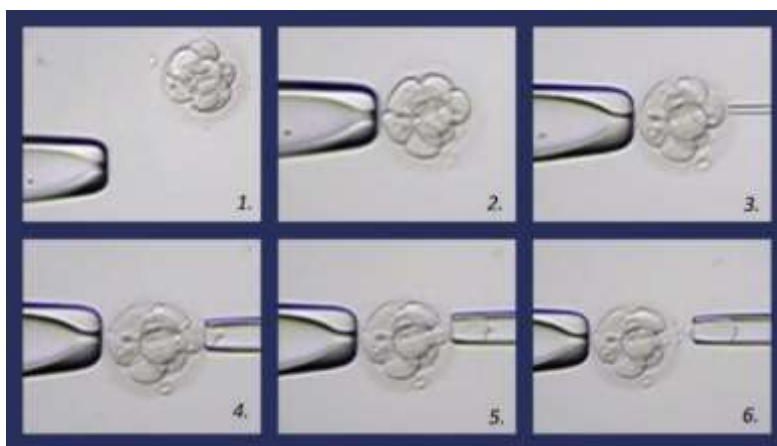


Figura 3. Procediment en l'extracció d'un blastòmer en la biòpsia per a un DGP on es pot observar la seqüència d'esdeveniments (1-5) (Imatge obtinguda a partir de l'enregistrament d'un DGP realitzat per Reprogenetics a la Clínica Girona amb el grup Girofiv).

4.4.2. Estudi genètic

Una vegada realitzada la biòpsia embrionària es du a terme l'anàlisi genètica de les cèl·lules que s'han obtingut de cada preembrió. Les anàlisis a realitzar han de ser molt precises ja que se sol disposar de poques cèl·lules de cada preembrió (1-2 en el cas de la biòpsia d'un blastocist) a més a més de disposar de poc marge de temps degut a que l'eficàcia d'implantació es va reduint. Generalment es criopreserven els embrions per vitrificació en el dia 6 del seu desenvolupament per a maximitzar les possibilitats d'implantació, tot i que la llei permet desenvolupar-los en medi fins al dia 14. Actualment el DGP utilitza bàsicament una d'aquestes tres tècniques: PCR, FISH i microarray. La utilització d'una o altra depèn de l'objectiu a assolir tot i que hi ha altres factors que poden afectar.

4.4.2.1. Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)

La tècnica Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) és una de les més utilitzades fins al moment. Aquesta s'utilitza sobretot per al sexatge dels preembrions en casos de malalties lligades al sexe (cromosoma X), en cribratge d'aneuploidies i en estudis de segregacions anormals que desenvolupen en anomalies estructurals.

Aquest mètode consisteix en mesurar el nombre de senyals que dona el nucli del blastòmer durant l'aplicació de la tècnica. En aquesta, s'uneix una sonda marcada amb un fluorocrom a una zona específica coneguda. Cada sonda determina una zona concreta del DNA i té un temps específic d'hibridació, de manera que s'han de dissenyar per separat i utilitzant fluorocroms de diferents colors per a diferenciar-los. Per a que les sondes es puguin unir al DNA del preembrió i així emetre fluorescència cal dur a terme la desnaturalització del DNA i que aquest no es trobi en forma de doble hèlix. Un microscopi de fluorescència serà l'encarregat de mesurar els diferents pics de llum a les diferents longituds d'ona i així poder analitzar els resultats obtinguts (Sermon, 2004; Informes, Estudios e Investigación, 2011). Aquesta tècnica només permet analitzar 12 dels 23 parells de cromosomes que conté una cèl·lula humana (Abdelhadi et al., 2003), fet que fa que cada vegada es vegi més substituïda per la tècnica de microarrays de CGH. Es recomana analitzar els cromosomes més freqüentment implicats en cromopaties viables i avortaments durant el primer trimestre, els quals són els cromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X i Y. En funció de cada cas es recomana incloure altres cromosomes. Tenint en compte les limitacions del diagnòstic realitzat en cèl·lules úniques i el possible mosaïcisme embrionari, amb la tècnica FISH el risc d'error en el diagnòstic és de 0,9%. En tots els casos s'ha d'informar a la parella de les limitacions de la tècnica i de les seves diferències respecte a tècniques citogenètiques de diagnòstic prenatal. Les diferències principals entre aquests és el risc de patir mosaïcisme embrionari i el nombre de cromosomes analitzats (SEF Recomendaciones, 2015).

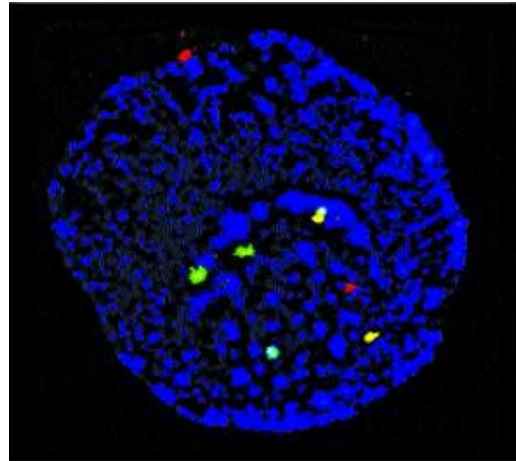


Figura 4. Imatge d'una FISH multicolor emprant sondes per als cromosomes 13 (vermell), 16 (blau pàlid), 18 (blau fosc), 21 (verd) i 22 (groc) (Abdelhadi, 2003).

La tècnica FISH també s'utilitza en espermatozoides com a estudi previ. Aquesta anàlisi permet determinar la presència d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides i així determinar el risc de transmissió a la possible descendència. Aquesta tècnica es recomana en parelles que han patit avortaments recurrents.

4.4.2.2. PCR

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) és una tècnica que permet duplicar un nombre il·limitat de vegades un fragment d'ADN en un procediment *in vitro*. En DGP s'utilitza per a l'estudi de malalties monogèniques (directament a través de la mutació del gen o indirectament a través de marcadors moleculars associats) i en la cerca d'embrions histocompatibles. En aquest cas és necessari que la fecundació es realitzi mitjançant una ICSI. Es recomana que l'estudi genètic garanteixi una fiabilitat d'un 80-90% d'amplificació de les cèl·lules analitzades i una fiabilitat del 95% amb taxes de pèrdues al·lèliques inferiors al 10% (SEF Recomendaciones, 2015).

La PCR es va desenvolupar per Kary Mullis el 1983. Aquesta es basa en utilitzar la DNA polimerasa per a sintetitzar noves cadenes d'ADN complementàries a una cadena existent (la més utilitzada és la Taq DNA polimerasa) realitzant varis cicles on es va variant la temperatura. La DNA polimerasa és un enzim capaç d'afegir nucleòtids (A, T, G i C) a l'extrem 3' on hi ha el grup OH. Necessita d'un *primer* a partir del qual amplificarà a partir de la primera base en cada cicle.

Aquest *primer* serà el que especificarà la zona a amplificar, de manera que es pot dissenyar els *primers* específicament per a una regió d'interès (gen/mutació conegut o marcadors associat a aquest). El procés d'amplificació consta de 3 passos: desnaturalització del DNA a una temperatura de 95°C durant 5 minuts (separació de les cadenes de DNA que estan en forma de doble hèlix), cicles de temperatura on s'uneixen els *primers* (de 55 a 65°C depenent dels *primers* dissenyats), elongació (68-72°C) on la DNA polimerasa actua i desnaturalització dels *primers* (aquests es separen per seguidament poder tornar a començar el cicle de 30 a 35 vegades). Per acabar la PCR es realitza un últim pas d'elongació a la temperatura òptima de la DNA polimerasa durant uns 5 minuts (Obradors, 2009). Quan s'acaba la reacció en cadena s'obté bilions de còpies del fragment d'interès (NCBI, *Polymerase Chain Reaction*). A partir del producte es realitza un estudi genètic.

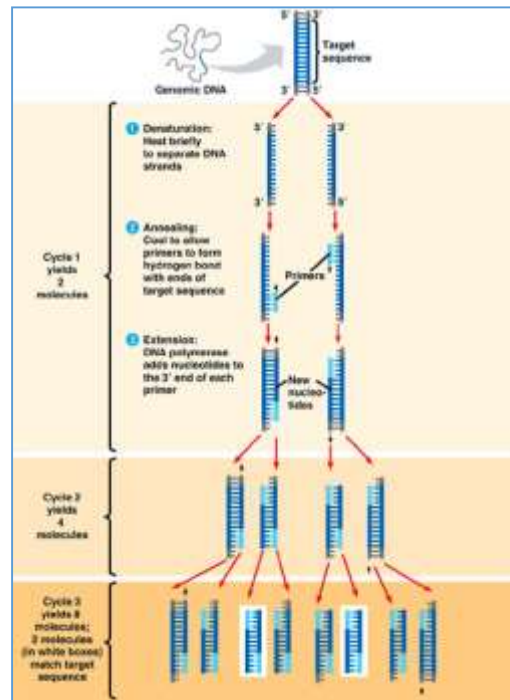


Figura 5. Funcionament d'una PCR. (Imatge obtinguda de <http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/>).

En alguns casos, prèviament a la PCR, es realitza una amplificació de tot el genoma de la cèl·lula o Whole Genome Amplification (WGA). Aquesta tècnica s'aplica quan és necessari estudiar un nombre elevat de regions com és el cas de la cerca de germans histocompatibles els quals han de presentar un gran nombre de marcadors iguals (Informes, Estudios e Investigación, 2011). En aquests casos s'utilitza una PCR-múltiplex en la qual s'utilitzen diferents *primers* alhora.

Quan es coneix la mutació exacta causant de la malaltia es pot fer una detecció directa amplificant per la mutació en si. També pot succeir que es coneguin marcadors com microsatèl·lits associats, el que permet una detecció indirecta. Si es coneix tant la mutació com els microsatèl·lits associats, és aconsellable utilitzar ambdós per a minimitzar el risc d'error. En el cas que es conegui la mida de l'al·lel normal, es pot detectar les anomalies que afectin a la mida com insercions i delecions. Per a la detecció de mutacions puntuals s'utilitza el mètode de *MiniSequencing* en el qual a partir d'un *primer* es sintetitza una nova cadena amb nucleòtids marcats fluorescentment (amb diferents colors) el qual és llegit i permet conèixer si la mutació hi és present o no. La diferència bàsica amb la seqüenciació és que només es busca el punt exacte de la mutació, per tant aquest ha de ser prèviament conegut (Obradors, 2009). Degut a problemes inherents al processat de les biòpsies obtingudes, s'estima que un 10% dels embrions biopsiats no tindrà diagnòstic (SEF Recomendaciones, 2015).

4.4.2.3. Microarray de hibridació genòmica comparada (CGH)

El microarray de CGH o hibridació genòmica comparada consisteix en una tècnica que s'ha desenvolupat molt recentment en el camp de l'anàlisi del DGP. Aquesta tècnica permet, a diferència de la tècnica FISH, analitzar el genoma complet (23 parells de cromosomes) d'una cèl·lula i així poder determinar les anomalies quantitatives genètiques en una sola anàlisi. Aquesta tècnica permet conèixer les possibles insercions (increment d'ADN respecte una mostra

control) i delecions (disminució d'ADN) en genoma d'una cèl·lula. És una tècnica indicada en la detecció de dèficits mentals, autisme, dimorfismes, defectes congènits, avortaments recurrents on no es coneix la causa, edat materna avançada, etc.

Els microarrays són dispositius en els quals es col·loquen sondes, una al costat de l'altre, en un espai molt petit. Aquestes sondes són de ADN en punts microscòpics d'un portaobjectes, les quals són impreses a la placa a partir d'un robot. La mostra marcada fluorescentment hibridarà amb les sondes emetent diferents fluorescències.

En aquesta anàlisi s'utilitzen dues mostres d'ADN control o de referència (d'un individu femení i d'un masculí sans) per a determinar la quantitat d'ADN d'una mostra problema, en aquest cas les cèl·lules biopsiades de diferents preembrinos. Cada mostra amplificada a partir de WGA basat en PCR es situa en un xip (a cada xip hi caben 4 mostres) i es marca amb dos fluorocroms que emeten fluorescència de diferent color.

Un cop les mostres han hibridat, emeten diferents fluorescències (verd, vermell o la combinació dels dos, groc). A partir de la comparació de la fluorescència emesa per les mostres a analitzar i les mostres control es pot conèixer si hi ha un excés, manca o igual ADN que en les mostres control (sanes). Així, amb aquest estudi es pot determinar la quantitat d'ADN que es té (de cada cromosoma) però no es pot predir les possibles translocacions, mutacions, inversions i mosaics per sota del 30% de la població cel·lular. A més a més permet predir el sexe del preembrió, el qual és utilitzat només en el cas de sospitar de malalties lligades al sexe (Miret, 2013).

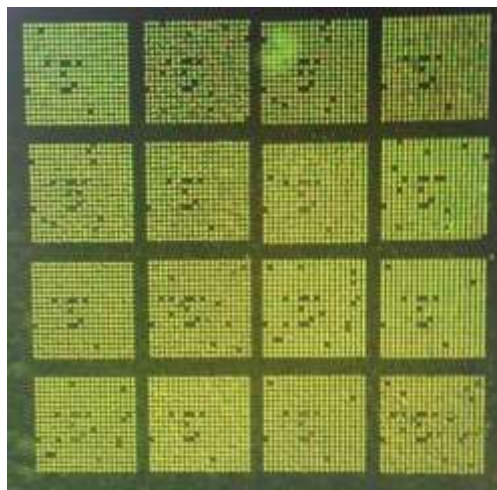


Figura 6. Xip de microarray on s'observa la diferència de fluorescència en cada pic. Cada pic representa una sonda coneguda diferent que pot hibridar amb la mostra. (Imatge facilitada per Reprogenetics).

Degut a que permet un anàlisi més exhaustiu que la tècnica FISH, els microarrays de CGH han passat a substituir cada vegada més a la tècnica de FISH tant emprada fins al moment, tot i que es tracta d'una tècnica cara i requereix de més temps respecte a FISH (Informes, Estudios e Investigación, 2011).

Els resultats d'un microarray són analitzats mitjançant un programa informàtic que permet comparar cada cèl·lula biopsiada amb les mostres control i així determinar l'estat de cada preembrió. Els resultats es mostren per quantitat d'ADN (de més i de menys en relació als controls) per cada preembrió i per parells de cromosomes (Figures 7, 8 i 9).

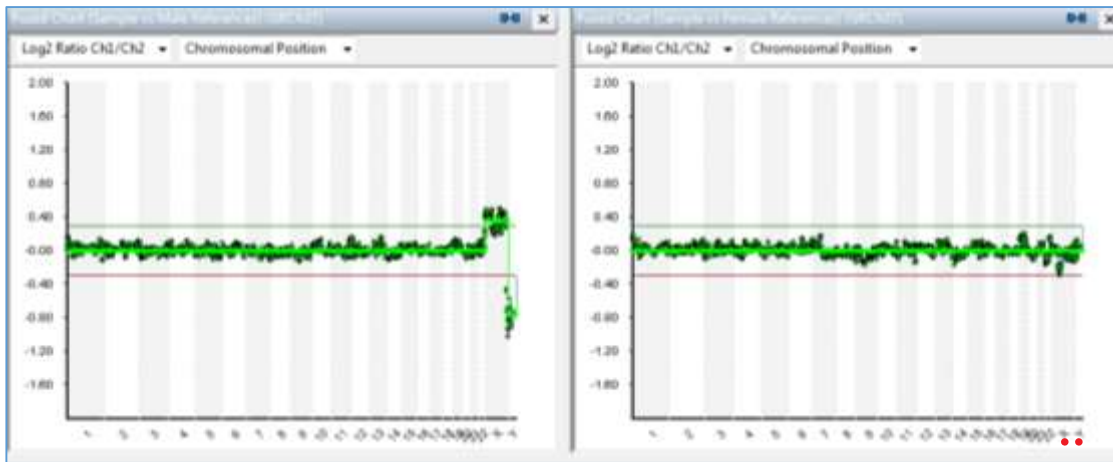


Figura 7. Comparació de la quantitat d'ADN d'un preembrió respecte una mostra control d'un mascle (esquerre) i d'una femella (dreta). El preembrió presenta una quantitat normal d'ADN (dins les línies de referència) i és de sexe femení (presenta igual quantitat d'ADN respecte al control femella). El preembrió pertinent seria favorable per a ser transferit (Imatge facilitada per Reprogenetics).

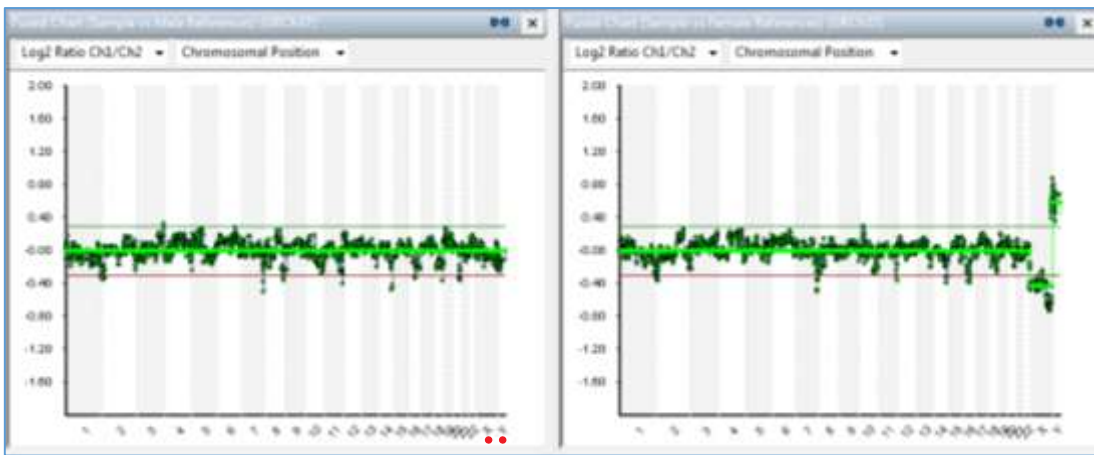


Figura 8. Comparació de la quantitat d'ADN d'un preembrió respecte una mostra control d'un mascle (esquerre) i d'una femella (dreta). El preembrió presenta una quantitat normal d'ADN i és de sexe masculí (presenta una quantitat igual d'ADN que el control mascle). El preembrió seria favorable per a ser transferit (Imatge facilitada per Reprogenetics).

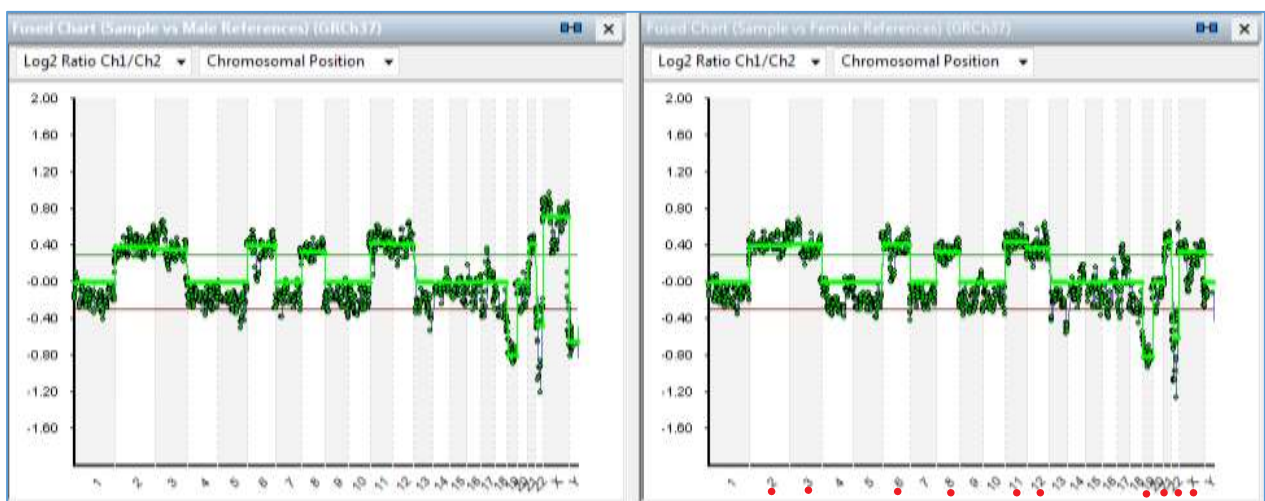


Figura 9. Comparació de la quantitat d'ADN d'un preembrió respecte una mostra control d'un mascle (esquerre) i d'una femella (dreta). El preembrió presenta una quantitat anormal d'ADN en els cromosomes 2, 3, 6, 8, 11, 12, 19, 21, 22 i X. Es tracta d'un embrió de sexe femení XXX (Síndrome de la triple X). En aquest cas el preembrió no seria favorable per a ser transferit ja que presenta un gran nombre d'anomalies genètiques (Imatge facilitada per Reprogenetics).

4.5. Transferència embrionària (TE)

Una vegada obtinguts els resultats de l'estudi genètic per a cada preembrió es comparen entre si per a poder determinar quin/s embrió/ns són susceptibles de ser transferits. En alguns casos les anomalies genètiques són presents en tots els preembrions i s'ha de recórrer a utilitzar altres tècniques com preembrions o oòcits de donants.

La transferència embrionària (TE) consisteix en el procediment en el qual es diposita l'embrió/ns a l'úter de la pacient, normalment al fons de la cavitat uterina i principalment a la paret posterior. En el cas que s'hagin detectat preembrions bons per a la TE es procedirà a seleccionar els més adients segons les seves característiques morfo-fisiològiques en el nombre adequat. La Llei Espanyola decreta que podran ser transferits un màxim de 3 embrions per dona en cada cicle reproductiu (BOE, Llei 14/2006, Capítol I, Article 3.2). Transferir només un sol embrió disminueix molt les probabilitats de que aquest s'implanti, però transferir-ne 3 comporta un major risc d'embaràs múltiple, de manera que per a cada cas s'adapta a les condicions de la pacient.

Una TE es realitza en una sala mèdica o quiròfan sense necessitat d'anestèsia. Hi intervenen un metge embrióleg i un biòleg del laboratori de FIV. Inicialment s'introdueix un espècul estèril per a obrir el canal vaginal. Seguidament es neteja el cèrvix amb gasses i sèrum fisiològic estèril. Es neteja l'endocèrvix amb medi de cultiu i s'aspira el moc cervical de manera curosa per a no provocar cap tipus de sagnat. Es comprova que un catèter s'introdueixi fàcilment a través del cèrvix i seguidament l'embrióleg passa a carregar una cànula amb el/s embrió/ns seleccionat/s. Seguidament s'introdueix la cànula a través del cèrvix fins el centre de la cavitat endometrial i s'injecten els embrions. A través d'un ecògraf es pot visualitzar el recorregut del catèter i com es diposita els embrions (s'observa una petita gota de color blanquinós). Seguidament ja es pot retirar el catèter lentament i es comprova que no hagi quedat cap embrió en aquest (García, 2007).

En alguns casos hi ha una gran dificultat de travessar el cèrvix per el mateix canal i es passa a realitzar una transferència embrionària transmiometrial. Aquesta tècnica es realitza en el quiròfan i si requereix d'anestèsia. Consta d'un procediment similar a la TE, amb la diferència que es travessa el cèrvix quirúrgicament per a poder alliberar els embrions a la cavitat uterina. A més a més, requereix d'un temps de repòs d'una hora post-operacional (Urbina et al., 2008).

4.6. Aplicacions clíniques del DGP

La tècnica del DGP té tres funcions principals: incrementar les taxes d'implantació, reduir el risc d'avortaments espontanis i evitar els naixements d'individus cromosòmicament anormals. Dins d'aquesta tercera aplicació la ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) va estimar que des del s'han reportat més de 2500 aplicacions clíniques diferents per al DGP/PGS (Goossens et al., 2012) agrupades dins dels següents apartats:

Malalties lligades al sexe: es caracteritzen per ser originades per una mutació que afecta a un gen que es troba en un dels cromosomes sexuals, X o Y. Aquestes malalties poden ser dominants de manera que un sol gen anormal determina la presència de la malaltia. En els casos que la mare el presenta en la X, hi ha un 50% de probabilitats de que un fill sigui afectat. Per altra banda es pot tractar d'un gen recessiu del qual els pares en poden ser portadors i transmetre'l a la descendència. Existeixen unes 300 malalties d'aquest tipus com són la hemofília, la distròfia

muscular de Duchenne, el síndrome de Turner, el síndrome de Klinefelter, etc. En general en aquests casos hi ha un 50% de possibilitats de passar la malaltia als descendents de sexe masculí, mentre que les dones solen ser només portadores. En la majoria d'aquests casos es busca seleccionar un preembrió de sexe femení per així evitar els possibles trastorns (García, 2007).

Malalties monogèniques: es caracteritzen per ser originades per la mutació puntual d'un sol gen. La mutació en el gen pot causar un canvi en la síntesi de la proteïna resultant d'aquest, que aquesta no es sintetitzi, que es produeixi en excés, en poca quantitat o que la proteïna sigui diferent donant com a resultat un mal funcionament en alguna part de l'organisme i així provocant la malaltia. En aquest cas també pot haver-hi una herència dominant o recessiva dependent de la malaltia que es tracti (García, 2007).

El DGP s'ha realitzat cercant una gamma molt àmplia de malalties monogèniques, però només algunes d'aquestes necessiten d'un informe favorable de la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida (Taula 1).

Taula 1. Llistat de malalties monogèniques cercades en el DGP. En negreta es mostren les malalties que requereixen d'un informe favorable de la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida per a poder ser diagnosticades en un DGP (Sánchez, 2009; Giménez, 2012).

Achondroplasia; ACH	Acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain, deficiency
Acyl-CoA dehydrogenase, very long-chain; ACADVL	Adenosine deaminase deficiency; ADA
Adenomatous polyposis of the colon; APC	Adrenoleukodystrophy; ALD
Albinisme, ocular, type I; OA 1	Alopecia universalis congènita; ALUNC
Alpers diffuse degeneration of cerebral gray matter with hepatic cirrhosis	Alport syndrome, X-linked; ATS
Alpha 1 antitrypsin deficiency (AAT)	Androgen receptor; (testicular feminization); spinal and bulbar muscular atrophy; Kennedy disease
Amyloidosis I, Hereditary neuropathic	Angiodema, hereditary; HAE
Ataxia-telangiectasia; AT	Basal cell nevus syndrome; BCNS (Gorlin)
Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus; BPES	Beta Thalassemia
Brachydactyly, Type B1; BDB1	Blood Group- Kell- Cellano System
Breast cancer, BCRA1	Brain tumor, posterior fossa of infancy, familial
Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase; BTK	Breast cancer, BRCA2
Ceroid lipofuscinosis, neuronal 2, late infantile; CLN2	Canavan disease
Charcot-Marie-Tooth disease, demyelinating, type 1A, CMT1A	Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2E
Charcot-Marie-Tooth disease, X-linked 1; CMTX1	Charcot-Marie-Tooth disease, demyelinating, type 1B; CMT1B
Chondroplasia punctata 1, X-linked recessive; CDPX1	Cholestasis, progressive familial intrahepatic 2
Citrullinemia, classic	Choroideraemia; CHM
Colorectal cancer, hereditary non-polyposis, type 1; HNPCC1	Collagen, type IV, alpha-5; COL4A5
Congenital adrenal hyperplasia (CAH)	Colorectal cancer, hereditary non-polyposis, type 2; HNPCC2
Currarino syndrome	Craniofacial dysostosis, type I; (CFD1)
Cystic Fibrosis; CF	Cutis laxa, autosomal recessive, type I
Darier-White disease; DAR	Cystinosis, nephropathic; CTNS
Diamond-Blackfan anaemia; DBA	Deafness, neurosensory, autosomal recessive; EDMD3
Dystrophia myotonica 1	Dysautonomia, familial
Ectodermal dysplasia I, anhidrotic; ED1	Early-onset familial Alzheimer disease
Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip/palate syndrome 1; EEC1	Ectodermal dysplasia, anhidrotic
Emery-Dreifuss muscular dystrophy, X-linked; EDMD	Emery-Dreifuss muscular dystrophy, autosomal recessive; EDMD3
Epidermolysis bullosa lethalis	Epidermolysis bullosa dystrophica, Pasini type
Epiphyseal dysplasia, multiple, 1; EDM1	Epidermolysis bullosa simplex and limb-girdle muscular dystrophy
Fabry disease	Exostoses, multiple, type I
Fanconi anaemia, complementation group C; FANCC	Facioscapulohumeral muscular dystrophy 1A; FSHMD1A
Fanconi anaemia, complementation group F; FANCF	Fanconi anaemia, complementation group E; FANCE
Fanconi anaemia, complementation group J	Fanconi anaemia, complementation group G
Fragile site mental retardation 1	Fanconi anaemia, complementation group A; FANCA
Fragile X syndrome	Fragile site, folic acid type, rare, FRA(X)(q28); FRAXE
Friedreich ataxia I; FRDA	Galactosaemia
Gangliosidosis, generalized GM1, type I	Gaucher disease, type I
Glomuvenous malformation type VI	Glutaric acidemia I
Haemoglobin-alpha locus 2; HBA2	Haemoglobin-alpha locus I; HBA1
Haemophagocytic lymphohistiocytosis, familial, 2	Haemoglobin-beta locus; HBB
Hemophilia B	Hemophilia A
Homocystinuria due to deficiency of N(5, 10)-methylene tetrahydrofolate reductase activity	HLA matching genotyping
Huntington disease; HD	Hoyeraal-Hreidarsson syndrome; HSS
Hydrocephalus, X-linked; L1CAM	Hurler syndrome
Hypophosphatasia, infantile	Hyperinsulinemic hypoglycaemia, familial, 1; HHF1
Immunodeficiency with hyper-IgM, type 1; HIGM1	Hypophosphatemic rickets, X-linked dominant
Isovaleric acidemia; IVA	Incontinentia pigmenti; IP
Leigh syndrome; LS	Krabbe disease

Li-Fraumeni syndrome 1; LFS1	Leukoencephalopathy with vanishing white matter; VWM
Long-chain 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase deficiency; HADHA	Loeys-Dietz syndrome; LDS
Marfan syndrome; MFS	Machado-Joseph disease; MJD
Metachromatic lecodistrofia	Meckle-Gruber Syndrome
Methylmalonic acidúria and homocystinúria (MMACHC)	Metaphyseal chondroplasia, Schmid type; MCDS
Migraine, familiar hemiplègic, 1; FHM1	Microcoria-congenital nephrosis syndrome
Mucopolysaccharidosis type II (Hunter) Hunter-McAlpine	Morquio syndrome, non-keratosulfate-excreting type
craniosynostosis syndrome	Multiple endocrine neoplasia, type I; MEN1
Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency; MADD	
Multiple endocrine neoplasia, type IIA; MEN2A	Muscular dystrophy, Becker type; BMD
Muscular dystrophy Duchenne type; DMD	Myotubular myopathy 1; MTM1
N-acetylglutamate synthase deficiency	Neurofibromatosis, type I; NF1
Neurofibromatosis, type II; NF2	Neuropathy, hereditary sensory and autonomic, type III; HSAN3
Niemann-Pick Disease	Norrie disease; NDP
Oculocutaneous albinisme, type I; OCA1	Oculocutaneous albinisme, type II; OCA2
Omenn syndrome	Optic atrophy 1; OPA1
Ornithine transcarbamylase deficiency	Osteogenesis imperfecta congenita; OIC
Osteogenesis imperfecta congenita; OIC	Osteopetrosis, autosomal recessive
Osteopetrosis imperfecta congenita	Pancreatitis, hereditary; PCTT
Pelizaeus-Merzbacher-like disease; PMLD	Peutz-Jeghers syndrome; PJS
Phenylketonúria	Polycystic kidney disease 1; PKD1
Polycystic kidney disease 2; PKD2	Polycystic kidney disease, autosomal recessive; ARPKD
Popliteal pterygium syndrome; PPS	Propionic acidemia
Retinitis pigmentosa	Retinitis pigmentosa 3; RP3
Retinoblastoma; RB1	Rett syndrome; RTT
Rhesus blood group, CcEe antígen; RHCE	Rhesus blood group, D antigen; RHD
Sandhoff disease	Sickle cell anaemia
Smith-Lemli-Opitz syndrome; SLOS	Sonic hedgehog; SH
Spinal muscular atrophy, type I; SMA1	Spinocerebellar atàxia 1; SCA1
Spinocerebellar atàxia 2; SCA2	Spinocerebellar atàxia 6; SCA6
Spinocerebellar atàxia 7; SCA7	Stickler syndrome, type I; STL1
Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency	Symphalangism, proximal; SYM1
Tay-Sach disease; TSD	Torsion distonia 1, autosomal dominant; DYT1
Treacher Collins-Franceschetti syndrome; TCOF	Tuberous sclerosis, type I
Tuberous sclerosis type 2	Von Hippel-Lindau syndrome; VHL
Ulnar-mammary syndrome; UMS	Zellweger syndrome; ZS
Wiskott-Aldrich Syndrome; WAS	

Anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals: aquest tipus d'anomalies sol ser causa d'un error en la gametogènesi, de manera que es poden veure afectats tant els oòcits com els espermatozoides, el que dóna lloc a un embrió amb anomalies cromosòmiques. Les anomalies cromosòmiques numèriques més comunes són les aneuploïdies i són la principal indicació de DGP. Per altra banda en les anomalies cromosòmiques estructurals hi distingim les translocacions recíproques i robertsonianes, inversions i delecions. En la majoria d'aquests casos els embrions no són viables, el que desemboca en un avortament, normalment durant el primer trimestre d'embaràs. Així, en casos d'avortaments repetitius és aconsellable realitzar un DGP per a poder determinar quins preembrions no pateixen aquestes alteracions. Aquest tipus d'anomalies també són les causants dels errors d'implantació dels embrions, de manera que en els casos en que la pacient tingui tres o més errors d'implantació és aconsellable realitzar el DGP (García, 2007). Aquestes anomalies són freqüents en dones majors de 35 anys degut a que tenen una major probabilitat de presentar oòcits genèticament alterats degut a possibles factors mutagènics a conseqüència de la dotació fixe d'oòcits que resten aturats a la meiosi I, de manera que s'aconsella realitzar aquest anàlisi en el grup de dones majors de 35 anys (Maroulis i Koutlaki, 2006). Les malalties més freqüents dins d'aquest grup són la trisomia del 21, donant lloc al Síndrome de Down, el Síndrome de Klinefelter (XXY), la trisomia del 13, la trisomia del 18 i el Síndrome de la triple X.

Germans histocompatibles: en alguns casos es busca un embrió histocompatible amb un fill anterior degut a que aquest últim té problemes que es podrien resoldre a través d'un germà histocompatible. Un exemple és la cerca d'un germà histocompatible per a la donació de medul·la òssia en trastorns neoplàsics i no neoplàsics (Cárdenas, 2000). Aquest tipus de DGP requereix de l'autorització prèvia de la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida degut al gran debat ètic que l'envolta.

A la Taula 2 es mostren els percentatges de DGP realitzats a l'Estat Espanyol segons l'informe de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) de l'any 2012.

Taula 2. Percentatge de DGP segons les indicacions (Modificada de Registre de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) de l'any 2012).

DGP: Indicacions		
	N	% sobre el total de cicles iniciats DGP
Malalties moleculars	327	11,9%
Malalties citogenètiques	348	12,7%
Avortaments repetitius	271	9,9%
Edat materna avançada	1045	38,1%
Error d'implantació	223	8,1%
Altres	283	10,3%

4.7. Limitacions del DGP

4.7.1. Tècnica

La realització d'un DGP no resulta sempre exitós degut a que cada tècnica té la seva limitació. S'ha observat que la utilització de tècniques de RA pot provocar el naixement de nadons prematurament a més a més de presentar un menor pes corporal i ser susceptibles de patir més problemes en el naixement. Tot i això, s'ha de tenir en compte que en molts casos les tècniques de RA s'utilitzen en dones d'edat avançada, el que podria tenir a veure amb aquests resultats observats (Taylor, 2008), però és difícil de determinar si realment les tècniques utilitzades en el DGP afecten negativament als nounats o si està causat per l'edat avançada de les mares que es sotmeten a aquest tipus de diagnòstic.

Les tècniques utilitzades en RA, i per tant també en un DGP, no són exitoses al 100% (SEF Recomendaciones). Les tècniques que utilitzen sondes es veuen afectades degut a que aquestes poden no ser del tot eficaces, el que du a embrions classificats com a no informatius per a algun dels cromosomes analitzats, donant falsos negatius i en alguns casos falsos positius. En el cas de FISH, només és possible diagnosticar anormalitats en un total de 13 cromosomes, mentre que en el microarray de CGH es pot analitzar la totalitat del contingut genètic, amb un increment de cost considerable. És per això que en els últims anys aquesta tècnica ha començat a substituir la de FISH en la majoria de clíniques.

Per a aconseguir uns resultats òptims és necessari realitzar el DGP amb un nombre elevat de preembrions, el que no sempre és possible degut a que hi ha dones a les quals no se'ls pots extreure suficients oòcits després de l'estimulació hormonal. A més a més, el DGP comporta un cost econòmic important, i com més preembrions s'analitzen més car és aquesta anàlisi.

Una limitació important és el nombre de cèl·lules biopsiades i, per tant, analitzades (Munné, 2002). La biòpsia més utilitzada és la del blastòmer, en la qual s'extreu una o dues cèl·lules depenent de l'estat del preembrió (nombre de divisions) i de l'especialista que la realitza. Extreure més de una cèl·lula pot comportar un risc de cares al desenvolupament del preembrió el qual, tot i estar en estat totipotent, pot veure's afectat negativament. Tot i així, extreure més

de una cèl·lula pot ajudar a la realització de les tècniques fent-les més fiables i aconseguint diagnòstics més acurats, a més a més de l'avantatge de poder dur a terme un diagnòstic de mosaïcisme. En els casos que es pot sospitar d'aquest mosaïcisme també podria ser convenient de realitzar una biòpsia del teixit del trofèctoderma de manera que es malmet menys l'embrió, però s'acaba disposant de menys dies d'anàlisi per a dur a terme una implantació en fresc, el que redueix la taxa d'implantació degut a la criopreservació.

El cost de la realització d'un DGP és realment elevat degut a que no només comporta el cost de la tècnica en si, sinó també de totes les tècniques de RA associades a aquest. La realització d'un cycle complet de FIV juntament a un DGP té un cost aproximat total de mitjana de 5.000-7.000€. En la Taula 3 es pot observar els costs estàndards per un tractament de RA amb DGP en una clínica de Madrid de l'any 2008.

Taula 3. Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP-cycle). Costs estimats del procediment, any 2008 (Modificada de *Informes, Estudios e Investigación, 2011*).

FASES	COSTS
1. Consulta	160-164 €
2. Anàlisis laboratoris previs	
- Cariotip, anàlisis bioquímics, en progenitors (cariotip en sang perifèrica)	75-77 €
- Estudi previ per a la valoració de factors de risc en portadors	406-417 €
4. FIV aspiració (sense les biòpsies embrionàries) + Transferència incloent medicació + ICSI (529,67 €)	2.988-3.066€
3 bis. Biòpsies embrionàries	284-292 €
3. Informativitat	
- FISH	500-800 €
5. Diagnòstic genètic Preimplantacional (DGP)	
- PCR (Caracterització molecular en portadors de malalties hereditàries)	1.421-1.458 €
- FISH (Caracterització citogenètica per a la determinació del sexe embrionari i de portadors d'anomalies cromosòmiques)	1.218-1.250 €
6. Diagnòstic prenatal (DP)	
- PCR	1.892-1.941 €
- FISH	1.689-1.733 €
7.	
a) Abortament espontani + raspat	1.270 €
b) Embaràs a terme. Part normal	1.471 €
c) Embaràs a terme. Part amb cesària.	2.287 €
d) Interrupció de l'embaràs terapèutic.	1.270 €

4.7.2. Ètica

El DGP ha estat objecte d'una gran polèmica des de bon principi degut al que s'anomena "nens a la carta" més que pel fet de poder diagnosticar malalties genètiques. Es veu com una tècnica de selecció genètica que pot ser utilitzada per a seleccionar el sexe dels preembrions sense justificació de malaltia lligada al sexe, o per a seleccionar altres factors dels nadons com és l'alçada o la intel·ligència segons els desitjos dels pares (Zhuang, 2003). En alguns casos el DGP es realitza a partir de marcadors lligats a un possible gen mutat, però aquests marcadors també poden anar lligats a un gen conegut que dona un determinat fenotip, el que donaria lloc a una selecció d'un embrió amb unes determinades característiques fenotípiques. En molts països s'ha prohibit el DGP degut a aquest factor tot i que aquest fet es podria resoldre mitjançant un bon control per part de la legislació de cada país. En molts dels països en els quals el DGP (veure apartat 4.7.3. Legislació) està abolit es continua utilitzant el DP, la qual cosa és contradictòria ja que aquest té la mateixa finalitat que un DGP, amb la diferència que es realitza sobre un embaràs

ja existent. En molts casos el que s'intenta evitar, a més a més d'un mal ús del DGP, és la manipulació de preembrions els quals, en moltes cultures, ja es consideren éssers vius amb dignitat humana. Així, la determinació ètica de quan un preembrió passa a ser considerat un ésser humà és fonamental per a determinar la legislació respecte a la manipulació d'aquests, el qual sol anar lligat a la mentalitat de cada país, sovint lligat a la mateixa religió. Altres decisions importants són qui decideix, i amb quins criteris, quins són els embrions que poden ser transferits, quines malalties (més o menys greus) determinen que un preembrió no és viable per a desenvolupar-se, i quin és el destí possible des d'un punt de vista ètic per als preembrions sobrants. En els països que permeten el DGP s'han creat diverses comissions d'ètica per a prendre les diverses decisions que envolten a aquest i a tot el món de la RA.

Un altre debat ètic important lligat al DGP és la utilització d'aquesta tècnica amb la finalitat d'obtenir un germà histocompatible per a un individu que necessita cèl·lules mare per a tractar una malaltia greu, és el DGP amb finalitat terapèutica a tercers. A través d'aquesta tècnica es creen molts preembrions sobrants sense la garantia d'obtenir el germà histocompatible i en molts casos aquests preembrions sobrants mai seran utilitzats. En el cas d'obtenir un individu histocompatible, aquest estaria obligat pels progenitors a ajudar al germà fins que tingués edat legal per a decidir-ho ell mateix, a més a més de ser conscient de que va ser seleccionat només com a cura per a una tercera persona, el que pot comportar unes conseqüències psicològiques greus en l'individu.

Les alternatives ètiques al DGP són les de realitzar un DP o utilitzar embrions/semen de donants sans, els quals no necessiten de la realització d'un DGP per a determinar possibles alteracions. Tot i això, obtenir un fill a través d'òcits i esperma de donant no sol ser tant satisfactori per a les parelles ja que no es tracta d'un fill genèticament derivat d'aquests. Així, en parelles que no accepten realitzar un DGP, DP o utilitzar gàmetes de donant només els resta l'alternativa de l'adopció, la qual sol constar d'un procediment llarg i costós. Aquesta última opció és la que solen prendre parelles amb creences religioses que castiguen la pràctica de la RA.

4.7.3. Legislació

El DGP ha generat un gran ventall d'opinions a tot el món de tal manera que ha creat una gran discordança tant en la ètica com en la legislació de les diferents comunitats capaces d'emprar-lo. En general, els factors que més influencien a la legislació que l'envolta són el social, tradicional, econòmic i religiós. En la Declaració Universal sobre el Genoma Humà de 1997 la UNESCO declara en sentit simbòlic el genoma humà com a patrimoni de la humanitat i prohibeix les pràctiques contràries a la dignitat humana, com és la clonació humana. En l'àmbit europeu, el Conveni d'Europa relatiu als Drets Humans i la Biomedicina del 4 d'abril de 1997 dedica el Capítol IV al genoma humà i determina que només es podran realitzar proves predictives de malalties genètiques o d'identificació de portadors de gens responsables de malalties per a finalitats mèdiques o d'investigació mèdica, accepta la intervenció en el genoma humà per a finalitats terapèutiques i només quan no tingui finalitats de modificar el genoma de la descendència i prohibeix la selecció del sexe, excepte en els casos que sigui precís per a evitar una malaltia genètica greu. El Protocol Addicional a la Convenció per a la Protecció dels Drets Humans i la Dignitat de l'Ésser Humà en respecte a l'aplicació de la biologia i la medicina, firmat a París el 12 de gener de 1998, estableix que qualsevol intervenció que sigui per a crear un ésser humà genèticament idèntic a un altre està totalment prohibida. Aquest conveni no va ser firmat per tots els països europeus (si per Espanya) ja que alguns el van considerar massa permissiu

(com Alemanya) o massa restrictiu (com en el cas del Regne Unit) (Jiménez, 2014). La Cort Europea de Drets Humans va condemnar a l'Estat italià entre altres degut a la incoherència que resultava de la Llei 40/2004, la qual prohibia la selecció embrionària per a evitar la transmissió de malalties greus, i per altra banda admetia eliminar un fetus amb malalties greus mitjançant un avortament. Darrere aquest i molts països s'amaga el factor religiós, principalment el catolicisme. Aquest reconeix que un embrió té una dignitat humana igual a la de un nou-nat de tal manera que rebutja la majoria de pràctiques sobre aquest, donant lloc a polítiques restrictives en els països creients. Per altra banda, religions com l'islamisme permet la manipulació dels preembrions fins als 40 o 120 dies quan es dona el moment de la fusió de l'ànima amb Al·là. El judaisme permet la manipulació fins als 40 dies com s'especifica en el Torà, i el budisme i hinduisme tenen una visió gradual de la dignitat de l'embrió.

Cada any la Societat Europea de Reproducció Humana i Embriologia (ESHRE) recull des del 2002 la informació relativa a les aplicacions de la RA, entre ells el DGP, realitzant uns informes en vers a cada tècnica. A la Figura 10 es pot observar el nombre de cicles de DGP registrats per cada país Europeu durant l'any 2008, en el qual s'observa que el país que més va utilitzar aquesta tècnica va ser Espanya seguit de Rússia, França, la República Txeca i el Regne Unit.

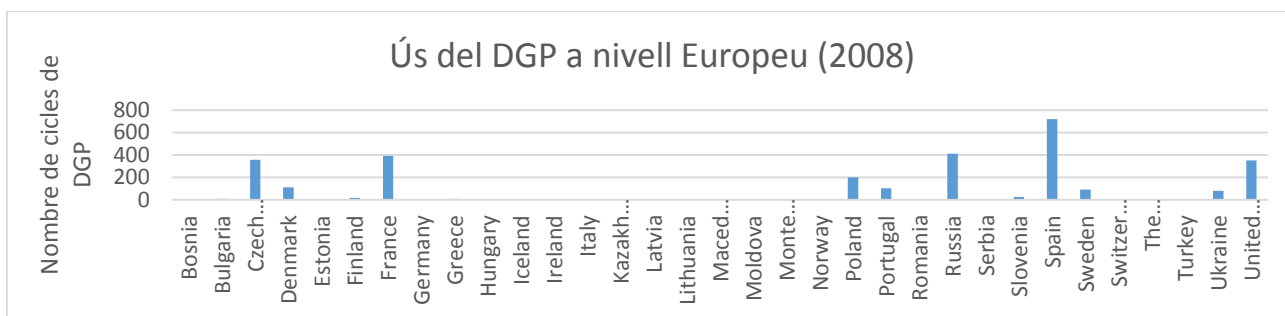


Figura 10. Gràfic on es mostra el nombre de cicles de DGP registrats en els països Europeus durant l'any 2008 (Modificada de Ferrarretti et al., 2012).

A Espanya el DGP està regulat per la Llei 14/2006 i la Llei 1030/2006 de la Seguretat Social (veure apartat 4.2. Marc legal del DGP). A més a més de seguir la legislació en alguns casos és necessari d'una autorització de la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida, la qual es reuneix unes vegades a l'any per a que un tribunal ètic discuteixi cada cas proposat. A Espanya la Seguretat Social cobreix un nombre limitat de casos de RA a l'any i els serveis depenen de cada centre hospitalari, com en el cas del centre hospitalari Clínic de Barcelona que cobreix un total de 24 cicles de FIV amb DGP a l'any. En alguns centres es cobreix la totalitat del tractament però en altres els pacients han de pagar una part que correspondria a la de laboratori. Els tractaments de RA dins la Seguretat Social només donen cobertura a parelles heterosexuales en les quals la dona no sobrepassi l'edat de 40 anys, i només en la realització d'un total de 3 cicles. El DGP indicat per a avortaments recurrents es sol realitzar a partir dels 3 avortaments espontanis, de manera que en moltes ocasions el DGP només es realitza en casos coneguts de malalties monosòmiques ja que no dóna temps a realitzar-lo en presència d'anomalies cromosòmiques estructurals i numèriques.

En general el DGP no es troba regulat legislativament: a Xina existeix un buit legal per al DGP, de manera que és molt habitual recórrer a aquest; a l'Índia està permès conèixer el sexe de l'embrió tant abans com després de la implantació; al Japó no hi ha una legislació concreta, però es segueix les recomanacions d'una comissió que estableix que només es pot utilitzar en casos de

possible transmissió de malalties greus; a Israel el DGP està altament acceptat fins al punt que està permès elegir el sexe del preembrió per raons familiars en casos concrets; els països àrabs no disposen de cap legislació que reguli el DGP, el qual està àmpliament acceptat i es realitza habitualment.

Als Estats Units cap legislació regula la tècnica i aquesta va lligada al contracte que realitzi cada parella amb el centre hospitalari, els quals són privats.

El DGP és una tècnica que no es troba a l'abast tant a Àfrica com a l'Amèrica Llatina degut a altres preocupacions més importants com la condició de la societat i la sanitat (Jiménez, 2014). En general trobem que el DGP està acceptat o no en els diferents països degut bàsicament a les diferents cultures i ètnies amb diferents creences, però el que realment necessita aquesta tècnica no és ser acceptada per tots aquests països, sinó crear una legislació que en reguli una bona praxi.

4.8. Recopilació de dades de la pràctica del DGP

Malgrat no poder recopilar les dades dels diferents centres requerits si que s'ha pogut fer una valoració subjectiva de l'estat actual de la tècnica del DGP mitjançant les dades publicades per la Sociedad Española de Fertilidad SEF. Anualment, des de l'any 2002, la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) recull els resultats envers a les tècniques de RA de l'estat espanyol. L'últim informe emès és el relatiu al 2012 degut a la dificultat de recopilació i contrastació de les dades. A continuació es mostren algunes de les taules de dades informatives de l'informe del 2012.

A la Taula 4 es pot observar el nombre realitzat de puncions/descongelacions, transferències, gestacions, embarassos ectòpics, avortaments, gestacions amb evolució desconeguda, parts i infants nascuts amb vida respecte al tractament amb DGP. Com es pot observar, en un 83% (1242/1493*100) de les transferències realitzades en el 2012 es van utilitzar embrions en fresc els quals solen presentar una major taxa d'implantació, tot i que en aquest cas les taxes són majors en embrions criopreservats. Això podria ser degut a que s'han utilitzat embrions criopreservats de donants, els quals presenten millors característiques ja que no pateixen alteracions genètiques.

Taula 4. Taula de dades del DGP de l'any 2012 on es mostren les puncions, transferències, gestacions, embarassos ectòpics, avortaments, gestacions amb evolució desconeguda, parts i nounats vius segons el tipus d'embrió (fresc o criopreservat) que s'han dut a terme a Espanya (Modificada de SEF, 2012).

DGP: puncions, transferències, gestacions i parts			
	Embrions en fresc	Embrions congelats	TOTAL
Puncions/Descongelacions	2341	417	2758
Transferències	1242	251	1493
Gestacions	568	118	686
Ectòpics	5	1	6
Avortaments	83	12	95
Gestacions amb evolució desconeguda	86	12	98
Parts	394	93	487
Nascuts vius	463	116	579

A la Taula 5 es pot observar el nombre de gestacions que es van dur a terme. En general s'observa que les taxes més altes es donen en les gestacions amb un sac (75-78%) degut a la

dificultat de que s'implanti més de un embrió (sent 3 el nombre màxim de transferència), seguit de un 22-24% de gestacions amb dos sacs i finalment un 0,5-1,7% de gestacions amb tres sacs. El nombre d'embrions transferits depèn de cada cas, la probabilitat d'implantació i el desig o no per part de la parella d'obtenir un embaràs múltiple. D'igual manera, els embarassos amb més èxit són els de gestació única, assolint un 74-83% dels parts, seguit dels parts amb dos fetus (18-26%). L'any 2012 no hi va haver cap cas de part triple, de manera que totes les gestacions triples van donar lloc a avortaments. Aquestes dades són totalment orientatòries degut a la dificultat de recaptar-les per part de la SEF de manera que hi ha un 10-15% de les gestacions amb evolució desconeguda.

Taula 5. Taula de dades del DGP on es mostren les gestacions (amb 1, 2 o 3 sacs) i la multiplicitat dels parts que van tenir lloc durant el 2012 a Espanya (Modificada de SEF, 2012).

DGP: Gestació i multiplicitat dels parts			
	Embrions en fresc	Embrions congelats	TOTAL
Gestacions amb 1 sac	441 (77,6%)	88 (74,6%)	529 (77,1%)
Gestacions amb 2 sac	124 (21,8%)	28 (23,7%)	152 (22,2%)
Gestacions amb 3 sacs	3 (0,5%)	2 (1,7%)	5 (0,7%)
Total gestacions	568 (100,0%)	118 (100,0%)	686 (100,0%)
Parts amb fetus únic	325 (82,5%)	69 (74,2%)	394 (80,9%)
Parts generals	69 (17,5%)	24 (25,8%)	93 (19,1%)
Parts triples o més	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Total parts	394 (100,0%)	93 (100,0%)	487 (100,0%)
Ectòpics	5 (1,0%) (*)	1 (0,9%) (*)	6 (1,0%) (*)
Avortaments	83 (17,2%) (*)	12 (11,3%) (*)	95 (16,2%) (*)
Gestacions amb evolució desconeguda	86 (15,1%) (**)	12 (10,2%) (**)	98 (14,3%) (**)

(*) Percentatge calculat respecte al total de gestacions menys les gestacions amb evolució desconeguda.

(**) Percentatge calculat respecte al total de gestacions.

Com es pot observar en les Taules 4 i 5, les taxes d'implantació, gestació i part tenen una tendència a ser majors en els embrions congelats que en els embrions en fresc, tot i que en general les taxes són força similars. El que s'esperaria és que aquestes taxes fossin majors en embrions en fresc ja que aquests s'han manipulat menys. Tot i així, els resultats globals per a l'any 2012 a l'Estat Espanyol indiquen que els oòcits que presenten unes majors taxes d'implantació són els oòcits de donants seguits dels preembrions criopreservats de donant, els oòcits propis i els preembrions criopreservats propis.

5. CONCLUSIONS

To conclude this project:

The extensive bibliography found about the preimplantational genetic diagnosis (PGD) method which is applicable to the assisted reproductive techniques (ART) demonstrates the great interest generated by this topic in the current society.

The most used techniques in PGD genetic analyses are FISH, PCR and CGH microarray. All of them could be successfully used depending on the individual case and on the chosen center.

The PGD technique is widely used in Spain as much as in the most of developed countries where it is allowed. Spain has a particular regulation of this practice, as in the most of the European countries where there are specific law to allow or to ban it. There are other countries where there is no specific legislation for the use of PGD since ethical and religious aspects could be the only restriction of its practice.

6. BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- ✓ Abdelhadi, Iman et al. *Preimplantation genètic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes*. RBMOnline, Reproductive BioMedicine Online, 28 de gener 2003.
- ✓ BOE: Llei 14/2006, de 26 de Maig, sobre tècniques de reproducció humana assistida. Última modificació: 2 d'agost de 2011.
- ✓ BOE: Llei 1030/2006 del 15 de Setembre. Última actualització: 6 de Febrer 2015.
- ✓ Braude, Peter, et al. *Preimplantation Genetic Diagnosis*. Nature Reviews, Volume 3. Desembre 2002.
- ✓ Cárdenas Cardós, Rocío. *Transplante de medul·la òsea*. Vol. 7, núm 2, abril-juny 2000.
- ✓ CEBES: Revista Bioderecho, Vol. 1. Núm. 1. *¿Es necesario un acuerdo internacional en torno al diagnóstico genético preimplantacional (DGP)?* 2014.
- ✓ Ferraretti, A.P., et al. *Assisted reproductive Technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE*. Human
- ✓ García Velasco, J.A, José Schneider. *Ciencias de la salud: Enfermería en Reproducción Humana*, Universidad Rey Juan Carlos. 1a ed. Madrid: DYKINSON, S.L., 2007.
- ✓ Geber, Selmo, et al., *Laser confers less embryo exposure than acid tyrode for embryo biopsy in preimplantation genètic diagnosis cycles: a randomized study*. Reproductive Biology and Endocrinology 2011.
- ✓ Giménez, Carles. *Legislación*. Genética & Reproducción: Actualización en Diagnóstico Genético Preimplantacional. 12 juliol 2013.
- ✓ Goossens et al. *Assisted reproductive Technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE*. 10 de juliol, 2012.
- ✓ Handyside, et al. *Pregnancy from biopsied human preimplantation embryos sexed by y-specific DNA amplification*, Nature, 344, 768-770 19 d'abril 1990.
- ✓ Harper, Joyce.C, Sioban B. SenGupta. *Preimplantation genètic diagnosis: State of the ART 2011*. Hum Genet 131:175-186, 12 juny 2012.
- ✓ Informes, Estudios e Investigación: *Revisión sistemàtica sobre la eficàcia, efectividad, Seguridad y costes del Diagnóstico Genético Preimplantacional*. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. UETS abril 2011.
- ✓ JF Griffiths Anthony, et al. *An introduction to genètic analysis*. 7a edició. New York, W.H.Freeman 2000.
- ✓ Jiménez González, Joaquín. *¿Es necesario un acuerdo internacional en torno al diagnóstico genético preimplantacional (DGP)?* Revista Bioderecho.es, Vol. 1, núm. 1, 2014.
- ✓ Sermon, Karen et al., *Preimplantation genètic diagnosis*. The Lancet, vol 363, 15 de Maig 2004.
- ✓ Maroulis George B. i Nikkoleta Koutlaki, Vol. 1092. *Women's Health and Disease: Gynecologic, Endocrine and Reproductive Issues*. Pag. 297-284, desembre 2006.
- ✓ Moreno, Juan Manuel. *Biopsia Embrionaria "Aspectos Técnicos"*. Unidad de Reproducción Hospital Clínica Vistahermosa. Vol. 12, nº1., juny 2007.

- ✓ Munné. *Preimplantational genètic diagnosis of numerical and structural chromosomes abnormalities*. Vol. 4, nº2 183-196, Reproductive BioMedicine Online. 4 de febrer 2002.
- ✓ Obradors, Albert. *Anàlisi completa d'aneuploidies d'origen femení i de malalties monogèniques en embrions: El Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor (DF-PGD)*. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, juny 2009.
- ✓ Sánchez García, Jorge. *Diagnòstic Genètic Preimplantacional de malalties hereditàries: Fibrosi quística i Hemofília*. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, maig 2009.
- ✓ Serhal, Paul, Caroline Overton. *Good Clinical Practice in Assisted Reproduction*. 1a ed. United Kingdom: Cambridge, 2004.
- ✓ Taylor, Alisa. *A guide to Pre-implantation Genetic Diagnosis*. Galton Institutew, juliol 2008.
- ✓ Urbina, Lerner Biber. *Fertilidad y Reproducción asistida*. 1a ed. Ed Médica Panamericana, 2008.
- ✓ Zhuang, G.-L., D. Zhang. *Preimplantation genetic diagnosis*. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong, China, març 2003.

Webgrafia

- ✓ *ART and Embryo Donation: A Short History*. Fertility Authority. Recuperat des de <https://www.fertilityauthority.com/blogger/swmoyers/2012/4/05/art-and-embryo-donation-short-history>. Data consulta: 14 de març 2015.
- ✓ *ART*. Harvard Medical School Center for Mental Health and Media. Recuperat des de <http://www.artparenting.org/about/>. Data consulta: 14 de març 2015.
- ✓ *SEF: Sociedad Española de Fertilidad*. 1990. Recuperat des de: <http://www.sefertilidad.net/>. Data consulta: 14 de Març 2015.
- ✓ *Enciclopèdia*. Gran enciclopèdia catalana. Recuperat des de <http://www.enciclopedia.cat/search/site/reproducci%C3%B3%20assistida>. Data consulta: 14 de març 2015.
- ✓ Embriovid. *¿Qué es el diagnostico genético preimplantacional?* Recuperat des de <http://www.embriovid.com/web4/diagnosticogenetico.htm>. Data consulta: 11 de maig 2015.
- ✓ Centro de Medicina Embrionaria: *Enfermedades Hereditarias Monogénicas*. 2013. Recuperat des de: http://www.pgdcm.com/terminologia/enfermedades_hereditarias_monogenicas.html. Data consulta: 26 de març 2015.
- ✓ *The ABCs of PGD, PGS and More*. Fertility Authority. Recuperat des de: <https://www.fertilityauthority.com/articles/abcs-pgd-pgs-and-more>. Data consulta: 21 de març 2015.
- ✓ Institut Marquès: *IMSI para elegir el major espermatozoide*. Recuperat des de: <http://www.institutomarques.com/imsi.html>. Data consulta: 14 de març 2015.
- ✓ *MNT: What Is Artificial Insemination? Why Is Artificial Insemination Used?* *Medical News Today*. Recuperat des de: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/217986.php>. Data consulta: 21 de març 2015.
- ✓ Miret, Clara. *Arrays de CGH*. Recuperat des de: <http://www.reproduccionasistida.org/arrays-de-cgh/>. Data consulta: 12 de maig 2015.
- ✓ NCBI, *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Recuperat des de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr>. Data consulta: 12 de maig 2015.
- ✓ NEWS MEDICAL: *Desorden Genético (complejo) Multifactorial y poligénico*. Recuperat des de: <http://www.news-medical.net/health/Multifactorial-And-Polygenic-%28Complex%29-Genetic-Disorder-%28Spanish%29.aspx>. Data consulta: 26 de març 2015.
- ✓ RA: *Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)*. Recuperat des de: <http://www.reproduccionasistida.org/microinyeccion-intracitoplasmica-de-espermatozoides-icsi/>. Data consulta: 21 de març 2015.
- ✓ *Reino Unido aprueba la reproducción asistida con el ADN de tres pedres*. Público. Recuperat de <http://www.publico.es/ciencias/reino-unido-aprueba-reproduccion-asistida.html>. Data consulta: 14 de març 2015.
- ✓ SEF: *Fecundación in vitro (ICSI) con diagnostico genético preimplantacional (DGP), Documento de consentimiento*. Recuperat des de:

- <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/consentimientos/mod8.pdf>. Data consulta: 5 de maig 2015.
- ✓ SEF: *Fecundación in vitro con diagnostico genético preimplantacional (DGP), Documento de consentimiento.* Recuperat des de: <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/consentimientos/mod7.pdf>. Data consulta: 5 de maig 2015.
 - ✓ SEF: *Recomendaciones sobre diagnostico genético preimplantacional.* Recuperat de <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/recomendacionesPreimplantacional.pdf> . Data consulta: 11 de maig 2015.
 - ✓ University of Rochester, Medical Center: *Types of Genetic Diseases.* Recupèrat des de: <http://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=90&ContentID=P02505>. Data consulta: 26 de març de 2015.
 - ✓ U.S. National Library of Medicine. Medline Plus: *In vitro fertilization (FIV).* Recuperat des de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/007279.htm>. Data consulta: 21 de març 2015.