

ESTUDIOS CIENTÍFICOS

# METANÁLISIS DEL DIAGNÓSTICO PREIMPLANTATORIO

**L.A. Soriano y L.M. Pastor.**

Universidad de Murcia (España)  
Departamento de Biología Celular. Facultad de Medicina de Murcia.  
Centro de Investigación y Formación en Bioética de Murcia.

## INTRODUCCIÓN<sup>1</sup>

Detectar las enfermedades del embrión en el útero materno ha sido siempre una meta en obstetricia. En 1956 se realizó el análisis de la cromatina del sexo en células del líquido amniótico para determinar el sexo del feto en embarazadas con riesgo de padecer enfermedades recesivas ligadas al sexo. En 1968 se hizo el primer diagnóstico prenatal de trisomía 21 mediante el análisis de células procedentes del líquido amniótico.

El deseo de poder realizar el diagnóstico prenatal antes del primer trimestre, condujo a la realización de la biopsia de corion, técnica actualmente con un riesgo de abortos 3-4 veces superior a la amniocentesis aunque los estudios más recientes de Jackson et al.(1992) la consideran relativamente segura y con un grado de exactitud diagnóstica muy elevado. Sin embargo parece existir una considerable variación entre distintos centros respecto a su seguridad. Los índices de abortos después de usar esta técnica son generalmente más altos en los centros donde se realiza menos, hecho que también sugiere que el índice de falsos positivos, depende también de la inexperiencia del centro. La fiabilidad de la técnica, mejora cuando la biopsia de corion se realiza entre la 10-12 semanas. Las pacientes deberían ser informadas para que en ningún caso se realizara esta técnica antes de las 9 semanas de gestación.

Hoy en día, la fertilización "in vitro" ofrece la oportunidad de realizar el diagnóstico genético incluso antes de la implantación (seis días después de la ovulación) las ventajas de esta técnica son obvias. Incluso la biopsia de corion no puede ser realizada antes de que la organogénesis esté casi completa, y las estrategias terapéuticas en el futuro podrían depender de que se realizaran antes de este acontecimiento.

Este nuevo diagnóstico preimplantatorio (DP), está todavía en su fase experimental, pero se han obtenido ya resultados importantes y con amplias perspectivas. Su desarrollo está estrechamente relacionado por un lado, con el de la Medicina de la reproducción (Tecnología de Reproducción Asistida), la Procreática, y por otro con la Genética Reproductiva Prenatal. Dada la actualidad de esta tecnología, nuestro trabajo pretende: a) Revisar los métodos utilizados de DP, b) Estudiar sus indicaciones y c) Analizar las controversias e implicaciones éticas.

<sup>1</sup> Este estudio es el trabajo matriz del cual se han publicado partes en los siguientes artículos de nuestro equipo de investigación: L.M. Pastor. *Algunos dilemas éticos de la genética actual*. *Progresos en Diagnóstico Prenatal* 7: 451-480,1995. L.M. Pastor. *Cuestiones biomédicas fundamentales*. Cap. 1 en: *Bioética Fundamental*, Edit BAC,1996.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha hecho una búsqueda informática de las publicaciones aparecidas en los últimos años respecto al DP realizado tanto con embriones animales como humanos en "Index Medicus" y "Bibliography of Bioethics".

## RESULTADOS

Revisamos a continuación las técnicas que se llevan a cabo para la realización del DP desarrollando de manera especial las más utilizadas.

### OBTENCIÓN DE LOS EMBRIONES

Los oocitos se obtienen por estimulación hormonal de los ovarios administrando gonadotropinas exógenas, previamente la glándula pituitaria ha sido insensibilizada, se recuperan por vía vaginal mediante guía de ultrasonido, a continuación se fecundan "in vitro" y se cultivan en el medio de Earle suplementado con un 10% de suero materno inactivado por calor. Se generan un promedio de 6 embriones por ciclo.

Aunque normalmente la obtención de los embriones preimplantados se realiza por fecundación "in vitro" (FIV) también se pueden obtener a los 5 días de la fecundación natural previo control de la temperatura basal y posterior recogida mediante lavado uterino (Formigli et al. 1990). También se ha aplicado el lavado uterino previa inseminación artificial.

Brambati et al. (1990) describe una técnica de lavado uterino de gran eficacia y seguridad recobrando siempre 99-100% del volumen de fluido inyectado. La inserción del sistema en la cavidad uterina se realiza bajo continua vigilancia ultrasónica y fue un éxito en todos los casos. Apenas se describieron complicaciones después del procedimiento, como un pequeño manchado desde unas horas a un día, ligero dolor abdominal y dolor de espalda durante 1-2 horas en todos los casos. Esta experiencia se ha realizado en mujeres no embarazadas y es muy prometedor e indicado en el DP; pero la práctica de Carson et al. (1991), demuestra un gran fracaso para recobrar los embriones.

Los métodos que existen para el estudio de los embriones se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- No invasivos: Aquellos que respetan la integridad celular del embrión.
- Invasivos: En los que se practica la biopsia de células del embrión.

### **MÉTODOS NO INVASIVOS PARA EL ESTUDIO DE EMBRIONES**

Uno de los métodos no invasivos de determinar la salud de un embrión que se ha realizado es medir la tasa de nutrientes por análisis del medio de cultivo. La actividad enzimática del medio de cultivo podría medirse para diagnosticar la deficiencia de algún enzima debido a una enfermedad hereditaria. Sermon et al. (1991) midieron la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa en 5 microlitros del medio de Earle suplementado con albúmina humana y procedentes de 33 embriones cultivados en el estadio de 2-6 células antes de transferirlos. Como blancos se utilizaron 5 microlitros procedentes de un medio sin embriones. La actividad media fue de 4,4 pmol/h/5 $\mu$ l en el medio de cultivo y de 4,0 pmol/h/5 $\mu$ l en los blancos, no se observaron por tanto diferencias significativas a pesar de la alta actividad del enzima en los embriones (250-350 pmol/h/embrión). Por lo tanto, hasta el momento estos métodos no parecen satisfactorios, quizás en pocos años se puedan diagnosticar algunas enfermedades hereditarias.

### **MÉTODOS INVASIVOS PARA EL ESTUDIO DE EMBRIONES**

Actualmente son los más utilizados, en ellos se pueden diferenciar dos fases: a) la obtención de las células b) el diagnóstico propiamente dicho.

Estudio comparativo de las técnicas de obtención de las células para el DP.

Existen tres técnicas generales para la obtención de células para el diagnóstico genético del embrión preimplantado (Simpson, 1992) :

- A) Biopsia del corpúsculo polar (extracción del producto haploide no funcional, resultante de la meiosis I)

- B) Extracción de una o dos células (blastómeros) del embrión cuando se encuentra en el estadio de 4-8 células.
- C) La biopsia de células citotrofoblásticas (las que van a formar la placenta, no el cuerpo del embrión).

*A) Biopsia del corpúsculo polar.*

El primer corpúsculo polar puede ser obtenido por aspiración de los oocitos procedentes de mujeres cuya ovulación ha sido inducida tras la administración de gonadotropinas. Este método presenta la ventaja de que para algunas parejas la manipulación y selección de gametos es más aceptable moralmente que la manipulación de embriones; sin embargo también presenta las siguientes limitaciones: (1) Solamente permite la detección de defectos genéticos de la madre; (2) hay una reducción considerable del número de embriones para transferir como consecuencia del posible entrecruzamiento entre cromosomas homólogos; (3) los análisis genéticos que pueden realizarse después de extraer el primer cuerpo polar tienen poca fiabilidad porque sólo se puede analizar un núcleo, además la extracción del corpúsculo polar es técnicamente difícil; (4) se dan más errores que cuando el análisis se realiza con blastómeros.

*B) Biopsia del embrión en estado de mórula.*

Los pioneros en la biopsia de embriones humanos en el estadio de 4-8 células fueron Handyside et al.(1990) en el Hospital Hammersmith de Londres.

Hasta la fecha existen varios métodos, sin embargo, no todos dan buenos resultados, ni todos se pueden utilizar para el DP porque la viabilidad del embrión y/o el blastómero puede ser afectada tras la biopsia. La mayoría de los trabajos actuales centran su atención en la capacidad de los embriones biopsiados para desarrollarse "in vitro" y/o "in vivo", mientras que hay muy pocos que estudien la viabilidad de los blastómeros.

Las técnicas de biopsia de embriones se empezaron en ratones en diferentes estadios. La mayoría de los embriones biopsiados en el estadio de 8 células (tres días después de la fecundación) sobrevivieron "in vitro" e "in vivo" no afectando a la

viabilidad la congelación previa (Wilton et al. 1989). La extracción de dos blastómeros tampoco parece afectar significativamente al desarrollo del blastocisto "in vitro" ni siquiera después de la congelación. Sin embargo el índice de implantación después de haber biopsiado y congelado los embriones fue del 77% cuando se extraía un blastómero y del 63% cuando se extraían dos. En comparación con el grupo control, no se observó una reducción significativa en el índice de implantación. El porcentaje de nacidos vivos después de la biopsia de dos blastómeros y posterior congelación fue similar a la del grupo control y alcanzó el 58%. Sin embargo este porcentaje se redujo al 34% cuando se extraían 3 blastómeros del embrión de 8 células.

La biopsia de 1-2 blastómeros del embrión humano de 8 células no parece afectar a su viabilidad "in vitro". El primer estudio clínico hasta el momento sugiere que después de transferir embriones biopsiados en el estadio de 6-8 células a mujeres fértiles con riesgo de transmitir enfermedades genéticas, el índice de embarazos es similar al índice de concepción para embriones intactos implantados en pacientes estériles (Handyside et al. 1990).

No todos los estadios de división tienen el mismo potencial éxito a la biopsia, bien por dificultades técnicas o bien por la variación de la tolerancia a la manipulación "in vitro" en los diferentes estadios de división. En humanos, los embriones de 8 células (3 días después de la inseminación) están muy compactados de tal forma que cuando se intenta la biopsia de los blastómeros se producen un elevado número de lisis porque la adhesión celular y las apretadas uniones comienzan a formarse. Este problema se resuelve incubando los embriones en un medio deficiente en cationes divalentes utilizando un agente quelante mezcla de EDTA y glicina, y/o citocalasinas (B o D). Sin embargo, la interrupción de las interacciones célula-célula en las especializadas uniones intercelulares formadas antes y durante la compactación, produce modificaciones en el normal reparto de células al trofoectodermo y a la masa celular interna. El uso de citocalasinas (B o D) al actuar interrumpiendo la organización de microfilamentos e inhibiendo la formación de otros nuevos puede ser más perjudicial que el uso de la mezcla EDTA-glicina, además puede alterar el posterior desarrollo del embrión. El estado óptimo para la biopsia en el ratón y en la vaca es el de 8 células y 16 células respectivamente. En estos estadios, la extracción de 1/4 de embrión en el ratón y hasta la 1/2 de células en la vaca produce mínimos efectos adversos en el desarrollo hasta el estadio de blastocisto "in vitro". De igual forma que ocurre en el ratón, el estadio óptimo para la biopsia en embriones humanos,

como dijimos, parece ser el de 8 células y la extracción de masa celular más adecuada la de 1/4 al tercer día de la fecundación de esta forma se reducen al máximo los efectos adversos en la implantación y posterior desarrollo "in vivo".

Existen tres técnicas para biopsiar en los primeros días (Tarín et al. 1993):

a) Aspiración

Los blastómeros son extraídos por succión mediante una micropipeta, ésta puede introducirse a través de la zona pelúcida (ZP) como una aguja o bien puede contactar con el blastómero a través de una perforación previa que se hace en la zona pelúcida bien usando Solución de Tyrode o bien con una pipeta afilada (biselada).

b) Extrusión

Que puede realizarse de tres formas:

1) Desplazamiento:

Consiste en hacer una abertura en la ZP con una pipeta biselada, luego se vuelve a introducir en un segundo punto y se inyecta un suave flujo de medio a través de ella lo que provoca el desplazamiento de uno o más blastómeros fuera de la ZP a través de la primera abertura. Recientemente Roudebush y Dukelow, (1991), aplican una modificación de este método mediante una presión sobre los blastómeros unido a un cambio en el ángulo de la micropipeta.

2) Pinchando y estirando (stitch and pull).

Se perfora la ZP con solución de ácido Tyrode y se extraen los blastómeros mediante movimientos punzantes con una microaguja (Tarín et al. 1993).

3) Empujando (push).

Tras perforar la ZP con Tyrode o por disección mecánica los blastómeros se extraen mediante presiones contra la ZP con una microaguja a cierta distancia del agujero.

c) División mecánica.

Consiste en la eliminación de la ZP mediante el uso de pronasa o ácido Tyrode o bien mediante un corte con una microhoja. Inmediatamente después de la extracción los blastómeros son separados aspirando con una pipeta Pasteur.

En el ratón no se han encontrado diferencias significativas en cuanto al desarrollo "in vitro" e "in vivo" después de la biopsia usando los métodos de desplazamiento o de aspiración (pinchando la ZP). Sin embargo el número de blastómeros que permanecen viables e intactos después de la biopsia es significativamente mayor en el caso del desplazamiento que para la aspiración independientemente del estado de división del embrión en el momento de la biopsia. De esta forma, aunque se deberían confirmar estos resultados, parece que las técnicas de desplazamiento son menos traumáticas que las de aspiración y por tanto más adecuadas para el DP.

Aunque las técnicas "stitch and pull" y "push" en el ratón y la aspiración (perforando la ZP con Tyrode) en embriones humanos no son perjudiciales para el desarrollo "in vitro" o "in vivo"; sin embargo estas técnicas tienen sus limitaciones para el DP por varias razones: 1) la "stitch and pull" puede producir la lisis de los blastómeros biopsiados e impedir su posterior análisis genético mediante hibridación "in situ" o cariotipo. 2) La exposición de los oocitos humanos y de los embriones a la solución del Ácido Tyrode puede reducir su viabilidad y posteriormente el desarrollo preimplantario.

### *C) Biopsia del trofoectodermo del blastocisto.*

La biopsia en los primeros estadios de división tiene el inconveniente de que muchas veces la cantidad de DNA que se obtiene ( el DNA de una célula es aproximadamente de 6 pg) es insuficiente para realizar el DP con éxito. Una forma de obtener más células es la biopsia del trofoectodermo del blastocisto (embrión de 5-6 días con un número de células aproximado de 200). Cortando la zona pelúcida se permite la herniación de 10-30 células trofoectodérmicas (las que van a formar la placenta, no el cuerpo del embrión) que pueden ser escindidas. El mayor inconveniente estriba en que el desarrollo del embrión "in vitro" de más de 5 días es más bien pobre y el índice de embarazos es más bajo que cuando la transferencia del embrión se realiza en un estadio más temprano. Sin embargo, se ha constatado que la obtención del blastocisto por lavado uterino tras la fecundación "in vivo" ofrece a menudo un índice más elevado de embarazos que los embriones en un estadio precoz.

De igual forma que para la biopsia de embriones en los primeros estadios de división, en el blastocisto se pueden realizar tres técnicas diferentes:

a) Aspiración.

Por este procedimiento con una micropipeta se succionan células de las que componen la pared del trofoectodermo (que darán lugar a la placenta) situada en la parte opuesta de la masa celular interna mientras que con una microaguja se cortan las células que están en contacto. Antes de la aspiración, la ZP se corta con una aguja y mediante micromanipulación se produce una herniación a través del corte.

b) Stich and pull.

Utiliza dos microagujas de vidrio siliconadas para retirar unas cuantas células de la pared del trofoectodermo a través de la ZP (parcialmente disuelta con ácido Tyrode) y mediante movimientos punzantes con una de ellas.

c) Herniación.

Tras realizar un corte en la ZP justo en la parte opuesta a la masa celular interna, los embriones se dejan en cultivo unas horas hasta que se produce una herniación definida en las células de la pared del trofoectodermo. A continuación son cortadas con un escalpelo o bien se separan por frotación con una aguja de vidrio siliconada por la estrangulación de la hernia contra el fondo de un disco.

Aunque no se han hecho estudios comparativos parece que los métodos a) y b) ofrecen mejores perspectivas de éxito para la práctica clínica porque no es necesario esperar a que se produzca una herniación de las células del trofoectodermo de forma espontánea. De esta forma la transferencia del blastocisto se puede realizar en el mismo ciclo en que se realiza la biopsia, evitando así la congelación y sus posibles efectos adversos sobre la viabilidad del embrión. Además, el número de células herniadas en blastocistos humanos, depende del intervalo de tiempo entre el corte de la zona pelúcida y la biopsia de la hernia. Un período de cultivo menor de 12 horas puede no ser suficiente para observar una definida herniación, mientras que un intervalo de 12-14 horas puede ser excesivo y provocar la extracción de demasiadas células. Esto podría reducir significativamente la viabilidad del embrión después de la biopsia, la producción de gonadotropina coriónica humana y la implantación. Otro factor a considerar es que en humanos sólo entre el 42-76% de los blastocistos dan lugar a una herniación después del tiempo de cultivo establecido (18-24h). Este hecho junto con la imposibilidad

de practicar la biopsia en algunos casos por dificultades técnicas, pueden limitar de forma considerable el número de embriones para analizar, si además tenemos en cuenta que sólo 14,5 - 42% de los oocitos humanos fertilizados normalmente llegan al estado de blastocisto "in vitro", la posibilidad de identificar un embrión como adecuado para ser transferido podría ser muy reducida y más todavía el establecimiento del embarazo.

Desde que en 1968 tuvo lugar el primer éxito en DP con blastocistos de conejo, la biopsia de las células del trofoectodermo había sido considerada la técnica que ofrecía más ventajas en el DP porque: 1) Suministra el mayor número de células para realizar el análisis genético. 2) Las células de trofoectodermo extraídas son, en sentido estricto, extraembrionales pues dan lugar a los tejidos placentarios después de la implantación, de esta forma no habrían riesgos de afectar al normal desarrollo del feto que deriva exclusivamente de la masa celular interna del blastocisto. 3) En el estadio de blastocisto, especialmente en el trofoectodermo, la expresión génica del embrión está bien establecida haciendo posible el diagnóstico de enfermedades hereditarias mediante sensibles ensayos bioquímicos. Sin embargo, el bajo índice de embarazos después de la FIV y el de transferencia en el estado de blastocisto hasta la fecha, hacen que esta técnica no sea del todo adecuada para el DP.

Resumiendo este análisis de los actuales estudios, puede concluirse que en humanos:

- 1) Los métodos de desplazamiento y presión (push) son más convenientes para el DP que las técnicas de "stich and pull" y la aspiración (pinchando la ZP) en los primeros estadios de división. El uso de los métodos de aspiración y "push" (después de perforar la ZP con ácido Tyrode) y la división mecánica podrían no ser aconsejables antes del estadio de 8 células porque expone a los oocitos humanos y los embriones en el estadio de 4 células a la solución de ácido Tyrode que puede reducir su viabilidad y el posterior desarrollo preimplantatorio. Además, los embriones humanos sin ZP se dividen en cultivo de manera desorganizada hasta el estadio de 8 células.
- 2) En el estadio de blastocisto, la aspiración y la técnica de "stich and pull" dan un mayor índice de éxitos que el método de herniación.
- 3) Los embriones en el estadio de 2 células y en blastocisto podrían no ser aconsejables para el DP porque por un lado, hay una excesiva reducción de masa celu-

lar en el estadio de 2 células y por otro lado, un bajo o nulo índice de embarazos después de transferir los embriones en el estadio de blastocisto.

- 4) La biopsia de un cuarto de masa celular del embrión al tercer día después de la fecundación puede ser el estadio óptimo para la biopsia.

Se requieren, por lo tanto, más estudios para determinar los efectos que tiene en la transferencia, el que el embrión esté en diferentes etapas del desarrollo. Así se sabe que el PR (Índice de Embarazos) se reduce después de transferir en los días 5, 6 y 7 tras la fecundación. Si la implantación no se viera afectada después del día 4, se podrían intentar nuevas técnicas de DP. La biopsia de embriones en el estadio de mórula previo tratamiento del medio de cultivo con una mezcla de EDTA-glicina para eliminar los iones divalentes  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  es la más utilizada. Sin embargo podría ser necesario valorar si la interrupción reversible de las uniones intercelulares que ocurren cuando los embriones son incubados en un medio libre de cationes divalentes influyen en la proporción de células del trofoectodermo y de la masa celular interna y si la biopsia en el estadio de mórula usando otros métodos tales como la división mecánica y la aspiración, reducen la viabilidad del embrión. Es evidente también, que el proceso de implantación se desconoce, lo que implica que un número de embriones viables no alcancen a implantarse.

La biopsia de un cuarto de masa celular del embrión al segundo día después de la fecundación podría ser intentada usando métodos distintos a la aspiración (después de perforar la ZP con solución Tyrode). Si la ratio de división no se retarda y la proporción de masa celular interna y trofoectodermo no se ve afectada podría merecer la pena el cultivo de los blastómeros biopsiados hasta el día 3 (o 4) para aumentar el tiempo y el número de células para analizar. La congelación de embriones podría ampliar el intervalo de tiempo entre el cultivo del blastómero y el análisis. Sin embargo, la congelación debería ser evitada mientras sea posible porque aumenta el riesgo de fallos en la transferencia de los embriones.

## PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS: INTERVENCIONES GENÉTICAS DIVERSAS

### Estudio del cigoto

Es posible realizar un diagnóstico microscópico a groso modo del cigoto, pudiéndose detectar algunos casos de triploidías o poliploidías en general. En condiciones

normales a las 18 horas de la fecundación ya se observan dos pronúcleos. Pero pueden observarse tres pronúcleos en el cigoto, esto podría ser porque penetraron dos espermatozoides o bien porque el segundo corpúsculo polar no fue eliminado. El desarrollo del cigoto, conlleva graves complicaciones en estas circunstancias, con muerte precoz del embrión. Liberar al embrión triploide del núcleo sobrante no es una empresa fácil. En primer lugar hay que detectar exactamente cual de ellos es el sobrante para poder extraerlo introduciendo una micropipeta y aspirándolo. Cualquier equivocación acarrea graves complicaciones pues deja al óvulo fecundado con dos pronúcleos del mismo origen dando lugar a estructuras tumorales: teratomas si son los dos maternos o bien molas hidatiformes androgénicas si son los paternos. La poliploidía no es un problema significativo en la reproducción humana natural; sin embargo en la asistida se alcanzan cifras del 5% de los oocitos fecundados "in vitro" (Herranz, 1994).

#### Estudio de blastómeros: Diagnóstico genético

En condiciones estériles en una cabina de flujo laminar, los blastómeros biopsiados se lavan dos veces con un medio tamponado de Hepes y suplementado con albúmina bovina para eliminar las trazas de suero materno o de esperma contaminante. A continuación se pueden estudiar a tres niveles:

#### a) Estudio Cromosómico

##### a. 1. Cariotipo.

Una alta proporción de enfermedades genéticas son causadas por las anomalías cromosómicas, particularmente aneuploidías. Para la detección de dichas anomalías en células extraídas de embriones en sus primeras fases de división, se podría realizar un cariotipo que permite no sólo detectar la aneuploidía, sino también las anomalías estructurales como las deleciones, inserciones y translocaciones. Este análisis aunque posible no es muy eficaz porque requiere "detener" la célula en metafase y estudiar los cromosomas por uno de los métodos de coloración ya establecidos. A pesar de los numerosos intentos los éxitos siguen siendo parciales. La mayoría de los núcleos de los blastómeros de embriones humanos cultivados toda la noche en presencia de inhibidores, se detienen en metafase. Sin embargo los cromosomas son demasiado cortos para ser

separados en bandas y que pueda resultar efectivo su estudio. De esta forma aunque la aneuploidía pueda ser detectada, algunas veces, contando los cromosomas, sin embargo no pueden ser identificados.

Aún así se sabe que el porcentaje de anomalías cromosómicas en oocitos no fecundados es del 35% mientras en los embriones puede variar entre el 23-40%. Son errores producidos durante la fecundación o bien alteraciones de los gametos que se dan con más frecuencia en los casos de infertilidad, edad avanzada de la madre, la hiperestimulación ovárica o bien las condiciones artificiales en las que se realiza la FIV.

En humanos, después de la FIV se han llegado a encontrar anomalías del tipo trisomías y poliploidías hasta en el 62% de los fetos abortados espontáneamente. Los embriones obtenidos 2 días después de la FIV tienen una ratio de aneuploidías del 30%. En este estadio del desarrollo, la poliploidía es debida principalmente a embriones polipronucleares. Todo esto puede explicar el alto índice de pérdidas fetales en los programas de FIV.

#### a. 2. Hibridación "in situ" (HIS).

Otra técnica alternativa que no presenta problemas de contaminación, es la identificación de cromosomas específicos a través de la Hibridación "in situ" (HIS) con el uso de sondas génicas de DNA específico (West, 1989; Grifo et al. 1990; Griffin et al. 1991), que pueden ser usadas tanto con el núcleo en metafase como en interfase.

El uso de la HIS para determinar el sexo de los embriones humanos preimplantados se realizó por primera vez usando un marcador radioactivo específico del cromosoma Y, utilizando embriones enteros (Jones et al, 1987; West, 1988), en estos estudios, la detección de la hibridación fue por autorradiografía que tardaba varios días. La determinación por un método no radiactivo (con una sonda de Y-específico biotilada y un sistema de detección basado en fosfatasa alcalina unido a streptavidina) fue realizada en menos de un día (Penketh et al. 1989). La eficacia de la hibridación con el núcleo del embrión fue relativamente baja, debido a que se requieren, al menos tres células para realizar la identificación del sexo en el embrión.

Los métodos fluorescentes (FHIS) para detectar la hibridación "in situ" son más sensibles, han mejorado la eficacia y también pueden ser realizados el mismo día. Una ventaja que ofrece este método es que son identificados simultáneamente unos cuantos cromosomas marcando cada sonda con un fluorocromo específico. Griffin et al. (1991) usó el FHIS con sondas X e Y específicas aplicadas a blastómeros de embriones en sus primeros estadios de desarrollo. Más reciente es el desarrollo de un método de marcaje dobles en el que se detectan simultáneamente ambos cromosomas usando diferentes colores fluorescentes (Griffin et al. 1992). Este método representa un gran avance frente a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y frente a otras técnicas de HIS porque reduce el riesgo de errores diagnósticos. Se evitan potenciales errores debidos, por ejemplo, a fallos en la hibridación con una sola sonda Y, o a la inversa, con una sola sonda X, si el núcleo es tetraploide (como en ocasiones se ha observado); con el dual FHIS, sólo si se detectan dos señales X o una señal X y otra Y se predice el sexo como mujer o varón respectivamente. La única posible desventaja hasta el momento es que incluso si la hibridación ocurre en el 100% de las células, uno o dos blastómeros pueden ser insuficientes para realizar un diagnóstico citogenético adecuado (Roberts et al. 1990).

Un reciente estudio de Benkhalifa et al. (1993) utiliza la FHIS con sondas específicas para X, Y y el cromosoma n° 18 para valorar la poliploidía humana en mórulas y blastocistos obtenidos después de cultivarlos. Los valores obtenidos indican que la mixoploidía (mosaico de células diploides y poliploides) es similar a la ya observada en blastocistos de especies animales. La proporción de embriones con más de cinco células poliploides fue de 30,8% para las mórulas y de 29,3% para los blastocistos. Estos estudios suscitan la duda de si el DP de los errores genéticos en estos estadios a partir de una sola célula, puede ser o no, representativa de todo el embrión.

La cuestión que hay que dilucidar es qué método dará lugar a un diagnóstico más seguro si, el análisis de blastómeros cultivados o células trofoectodérmicas o más bien la dotación cromosómica será mejor analizada en el primer corpúsculo polar extraído por micromanipulación de un óvulo no fertilizado. (Dokras et al. 1990; Verlinsky et al. 1990). Parece que la tendencia actual es la del análisis de blastómeros.

b) Estudio de los productos genéticos.

Este tiene la ventaja de poder diagnosticar enfermedades hereditarias e incluso la mutación causante de la enfermedad; pero hasta el momento no se ha podido poner en práctica una técnica eficaz basada en este método para el DP en humanos. Hooper et al. (1987) y Monk et al.(1987) crearon un modelo de ratón deficiente en el enzima hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) y el DP se realizó con éxito, pero al trasladar la técnica a embriones humanos (Braude et al. 1989; Leese et al. 1991) resultó un fracaso. De igual forma, como anteriormente se dijo, Sermon et al.(1991) midieron el comienzo de la actividad del enzima  $\beta$ -hexosaminidasa en el embrión de ratones entre 2-4 células. Sin embargo en los oocitos humanos y en embriones preimplantados hasta el estadio de blastocisto tampoco se detectó ningún cambio de actividad de dicho enzima.

c) Estudio de los genes.

La técnica más usada hasta el momento corresponde al estudio de los defectos genéticos a nivel de una célula (blastómero). Basándose en la amplificación del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se determina el sexo o se identifican las mutaciones (Navidi y Arnheim, 1991) de los embriones que serán implantados en una mujer cuya descendencia tiene riesgos de padecer una enfermedad hereditaria ligada al sexo. Aunque este procedimiento técnicamente es más fácil que la biopsia del cuerpo polar requiere una extraordinaria habilidad en la micromanipulación y una precaución extrema para evitar que inadvertidamente se incluya en la extracción del blastómero parte del espermatozoide pegado a la zona pelúcida, ya que el DNA del espermatozoide podría ser también amplificado mediante la PCR con el consiguiente error diagnóstico.

Handyside et al.(1989) utilizaron inicialmente esta técnica para identificar el sexo de los embriones amplificando y repitiendo una secuencia específica para el cromosoma Y. Pero en el caso de una única secuencia se dan errores en el diagnóstico por fallos en la amplificación con similar frecuencia tanto para varones como hembras (5-15%) (Kontogianni et al. 1991). La amplificación intermitente falla, por tanto es necesario evitar las estrategias diagnósticas basadas simplemente en la presencia o ausencia de un fragmento amplificado. Para reducir estos fallos se intentó la co-amplificación de secuencias repetidas X e Y especifi-

cas (Kontogianni et al. 1991; Strom et al. 1991). Se usó una PCR múltiple con dos pares de oligonucleótidos fundamentales utilizados para producir fragmentos de diferentes tamaños que son fácilmente separados por electroforesis en gel. Este método no es del todo satisfactorio pues teóricamente, el fallo en la amplificación puede ocurrir independientemente en cada par fundamental. Más prometedor es el uso de un par simple de "primers" cuidadosamente utilizado para amplificar una secuencia presente en ambos cromosomas X e Y pero cuya parte de secuencia diferencie a los dos cromosomas preferiblemente de nuevo en longitud. Algunos grupos están ahora buscando "primers" que permitan este tipo de análisis en una simple célula.

Como ejemplo de la aplicación de esta técnica, es el trabajo presentado por Handyside et al. (1990) en 5 parejas con riesgo de transmitir enfermedades ligadas al sexo que a los 6 meses tenían un total de 10 tratamientos de FIV. Tras un régimen de superovulación después de supresión pituitaria produjeron 11,2 oocitos por ciclo de tratamiento de los cuales 6,3 fueron fertilizados normalmente. El 79% de los embriones normalmente fertilizados se desarrollaron entre 6-10 células al tercer día de la fecundación in vitro.

Para la biopsia, se perforó la ZP en el estadio de 8 células y por aspiración se obtuvieron dos blastómeros. La técnica de amplificación del DNA permitió estudiar los cromosomas X e Y, identificar adecuadamente el sexo entre 6-8 horas después de la biopsia y transferir los embriones biopsiados en menos de un día. La ratio del sexo en los 46 embriones biopsiados fue exactamente de 50:50. La ratio de embarazos después de la transferencia estuvo cercana al de embriones intactos transferidos a mujeres infértiles. En un periodo de 6 meses se establecieron dos embarazos (posiblemente 3) de las cinco mujeres tratadas, en cada caso después de uno o dos ciclos de tratamiento. Todos los fetos eran normales tras el examen detallado a las 22 y 20 semanas y de sexo femenino confirmado. Cuatro de los 17 embriones biopsiados transferidos (24%) se implantaron y llegaron a término.

Handyside et al. (1992) en su paradigmático trabajo "Birth of a normal girl after "in vitro" fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis" aunque ilustran de forma asequible y fácil la técnica, indican que no deja de tener sus riesgos. Uno de ellos es que la PCR no siempre se realiza con éxito, bien por cualquier pérdida de DNA o bien por cualquier fracaso en la amplificación.

Verlinsky 1991 aporta una tasa de fallos en la amplificación en el caso de la biopsia del cuerpo polar de 14 sobre 83 es decir 16,8%. Además, el fallo de la PCR puede ocurrir en un alelo específico con el consiguiente error diagnóstico. También pueden darse errores diagnósticos por contaminación de células ambientales o del DNA del esperma.

### INDICACIONES DEL DIAGNÓSTICO PREIMPLANTATORIO SEGÚN LA LITERATURA

Hasta la fecha el DP se ha utilizado "con éxito" para enfermedades hereditarias ligadas al sexo y fibrosis quística, pero las técnicas son adaptables en principio al creciente número de enfermedades genéticas en las que se conocen las oportunas secuencias de DNA.

Según Griffin et al. (1993) la aspiración del diagnóstico prenatal es dar a los padres la oportunidad de interrumpir los embarazos de fetos con anomalías. Para la mayoría de enfermedades hereditarias ligadas al sexo (más de 200) el diagnóstico específico (directo de la enfermedad) no es posible, por ello la única opción según su parecer, es abortar todos los fetos masculinos, la mitad de los cuales pueden no estar afectados. El DP ofrece "la alternativa" consistente en seleccionar los embriones femeninos obtenidos por FIV en parejas con riesgo de transmitir enfermedades hereditarias y solamente éstos ser transferidos a la madre.

La amplificación de los fragmentos de DNA desde una o varias células ha permitido el estudio del DP de variados defectos genéticos tales como:

- Fibrosis quística cuya incidencia en nacimientos vivos es de 1/1.600 para los Caucasianos.
- Distrofia muscular de Duchenne cuya incidencia en nacimientos vivos es de 1/3.000 varones (ligado al X).
- Enfermedad de Tay-Sachs cuyo gen mutado es el de la hexoaminidasa A y cuya incidencia es de 1/3.500 para los Judios Ashkenazi y de 1/35.000 para otros.
- Hemofilia A (factor VIII de la coagulación defectuoso) cuya incidencia es de 1/10.000 varones.
- Síndrome de Lesch-Nyham cuyo gen mutado es la hipoxantina fosforibosil transferasa.

## VALORACIÓN TÉCNICA DEL DIAGNÓSTICO PREIMPLANTATORIO

En la bibliografía utilizada, podemos encontrar varias críticas al DP tal como hoy se encuentra desarrollado. Así, si es verdad que el DP puede ser realizado, tendríamos que preguntarnos si es seguro y práctico. En USA sólo un 14% de mujeres dan a luz un niño vivo después de un ciclo de fertilización "in vitro" incluso aun transfiriendo 3 o más embriones, el porcentaje de nacidos vivos no es mayor de 1 de cada 10 embriones transferidos en los centros con los mejores records. Aunque sorprendentemente la biopsia de embriones no disminuye el porcentaje de embarazos con éxito tras la implantación, es necesario todavía adquirir una gran experiencia clínica para que este método pueda ser comparado con otros procedimientos ya establecidos como la amniocentesis o la muestra de vellosidad coriónica.

Quizás uno de los inconvenientes más grandes en una sociedad mercantilista para la implantación de esta técnica sea su elevado coste. Un ciclo de fertilización "in vitro" cuesta aproximadamente 5.000 dólares, con DP hay que añadir 2.000 dólares más. El DP con este coste seguramente no aparecería entre los procedimientos de alta prioridad en los cuidados de salud. La carga emocional que sufren las parejas sometidas a la fertilización "in vitro" también limita sus atractivos. Por otra parte algunos autores atribuyen al DP la ventaja de que excluye la necesidad de interrupción del embarazo (aborto).

Junto a esto, los requisitos previos para el DP incluyen un equipo altamente especializado en reproducción asistida, experiencia en obtener los embriones en un medio libre de DNA contaminante y la capacidad para realizar el necesario análisis de DNA en pequeñas cantidades (en este caso, en una célula).

Teniendo en cuenta las obligadas normas sobre la investigación en la FIV en la mayoría de los países, las técnicas de biopsia de embriones deberían ser perfeccionadas en animales y los métodos de diagnóstico ser verificados en células humanas no embrionales. Pero este obstáculo no existe en otros países como España, donde se puede experimentar con los embriones sobrantes de la FIV antes de los 14 días.

En el estado actual del DP la bibliografía parece estar de acuerdo en que una desmesurada aplicación clínica sería un auténtico desastre. Para unos como Trounson et al. (1992), porque los métodos que han sido desarrollados para la detección de los defectos genéticos en una simple célula son, por sí mismos, bastante propensos a

errores como los descritos por Handyside y Delhanty (1993) (error diagnóstico en la determinación del sexo) o Verlinsky et al. (1992) (error en diagnóstico en un caso de fibrosis quística). Sin embargo, otros como Handyside (1992) opinan que el mayor problema se deriva de que la mayoría de las clínicas de FIV están mal equipadas tanto en mano de obra como en recursos para aplicar estas sensibles técnicas. El DP es multidisciplinar y requiere los esfuerzos coordinados de un equipo con destreza y experiencia en medicina reproductiva, embriología, biología molecular y genética clínica. La contaminación de los reactivos de la PCR, son un alto riesgo en manos inexpertas. Por otro lado, es urgente una valoración justa del DP comparado con otros procedimientos diagnósticos ya establecidos para estadios más avanzados en el embarazo (Miedzybrodzka et al. 1993).

En los cuatro años desde que se establecieron los primeros embarazos, la experiencia en los dos mayores centros (Hammersmith y Chicago) es todavía muy limitada con menos de 100 ciclos de tratamientos y sólo 10 embarazos clínicos. Según Handyside (1992) se debería alentar a nuevos centros para que comiencen sus propios programas para, más tarde, hacer un estudio multicéntrico que reportaría más beneficios que muchos y breves estudios oportunistas. Tanto Trounson<sup>2</sup> (1992) como Handyside (1992) concluyen resaltando la idea de que es necesario y urgente poder acceder a los excedentes de embriones para la experimentación, no sólo para los estudios preliminares, sino también para ampliar el ámbito de los diagnósticos y las continuas valoraciones de la exactitud de los métodos. Pues para ellos la situación actual de algunos países es contradictoria en cuanto que aprueban el DP como tratamiento por un lado, mientras que por otro se prohíbe "la necesaria investigación en embriones humanos" para asegurar que las técnicas usadas sean seguras y fiables.

## IMPLICACIONES ÉTICAS

Aunque el DP esté todavía en su fase experimental ya suscita cuestiones éticas y legales que convendría estudiar en profundidad y quizás también observando los usos potenciales de esta técnica convendría una regulación más directa.

<sup>2</sup> En 1996 se habían realizado en todo el mundo diagnóstico preimplantatorio tanto para enfermedades ligadas al cromosoma X o monogénicas en 149 pacientes, con 197 ciclos iniciados, 171 transferencias, 50 embarazos, 28 partos y 54 niños nacidos. Estos datos indican que solo el 18,7 de la parejas después de acudir a esta técnica obtuvieron un niño o niños. Veiga, A. y Boada, M. *Una alternativa al diagnóstico prenatal*. Mundo Científico 170: 609-612, 1996.

Tal y como se encuentra hoy el diagnóstico genético preimplantatorio depende de la capacidad de aislar los embriones, extraer sus blastómeros y luego analizar su estructura genética, y cómo no, su eficacia depende de la capacidad de implantarse los embriones biopsiados con éxito. El aislamiento de los embriones se realiza a través de la FIV. Si los embriones pudieran ser obtenidos por lavado uterino, la necesidad de un ciclo de hiperestimulación y la recogida de los oocitos quirúrgicamente podría ser evitada. Los avances en las técnicas de micromanipulación han hecho posible la perforación de la zona pelúcida y la aspiración o biopsia de uno o más blastómeros. Por otra parte hay un rápido progreso en las técnicas para examinar directamente el DNA de los blastómeros biopsiados bien estudiando los genes o por medio de marcadores genéticos que indican algunas enfermedades genéticas. La amplificación del DNA mediante la PCR permite que rápidamente sea replicado y se obtengan cantidades de DNA que pueden ser leídas directamente o por sondas de DNA, de esta forma la necesidad de congelar los embriones biopsiados antes del diagnóstico genético no es necesaria. Como resultado del estudio genético, los embriones que carecen de defectos genéticos de interés se colocan en el útero para su posterior implantación. Mientras que si poseen uno de los genes no deseados los embriones pueden ser desechados o no transferidos. Quizás en el futuro se puedan tratar los embriones con alteraciones genéticas y de esta forma evitar que sean desechados.

Las objeciones éticas pueden ser fundamentalmente de dos categorías:

- 1) Unas centradas en el estatuto del embrión y las manipulaciones de embriones que conlleva el DP.
- 2) Las otras centradas en las posibles aplicaciones eugenésicas. Selección genética de la descendencia.

El mayor inconveniente ético es que el DP necesariamente conlleva actualmente la manipulación y destrucción de embriones, tanto en su realización, como en la investigación que se lleva a cabo para perfeccionar la técnica. Además, hoy por hoy, la transferencia de embriones no es una práctica segura para la supervivencia posterior de éstos. Desde una perspectiva personalista, el embrión debe ser respetado como persona desde el momento de la fecundación. Este axioma significa que el trato respetuoso debe presidir, como si de un adulto se tratara, toda intervención en

él. Por tanto, del mismo modo que en la Medicina postnatal no es tolerable una política de eliminar vidas poco valiosas, tampoco sería tolerable la destrucción sistemática de los embriones enfermos. El embrión es un nuevo paciente de la medicina, no un producto para la acción biomédica bajo principios utilitaristas. Esta afirmación tiene varias consecuencias que podríamos resumir de la siguiente manera:

- a) Todo diagnóstico realizado sobre el embrión debe ser utilizado en su propio beneficio. Además el peligro que suponga ese nuevo diagnóstico sobre su integridad para ser asumido debe estar en proporción a los beneficios que le pueda reportar.
- b) En la actualidad, por todo lo que hemos indicado en los apartados anteriores, el DP supone una técnica que no está encaminada a la curación del embrión y que además presenta unos riesgos desproporcionados a su integridad. Es más, la destrucción y pérdida de embriones no sólo se produce en relación a la FIV, viabilidad en cultivo de los embriones y destino incierto en la transferencia, sino que las propias técnicas suponen en mayor o menor medida todavía una pérdida de embriones.
- c) Para la eticidad de esta práctica clínica, deberían darse varias circunstancias:
  - 1) Que el embrión no sufriera consecuencias indeseables para su integridad y supervivencia durante su recogida en trompa y útero, posterior cultivo y desarrollo.
  - 2) Que la transferencia asegurara su posterior implantación.
  - 3) Por último, como ya indicamos, que exista una proporción entre los riesgos que hay que asumir, pues siempre existirán, y el resultado beneficioso del diagnóstico para el embrión, es decir, la consecuencia terapéutica que se deriva de ese diagnóstico.
- d) Está claro que la puesta a punto de estas técnicas se debe realizar, como ocurre con cualquier otro tipo de investigación humana, primero en animales y sólo puede realizarse una experimentación en embriones humanos cuando ésta sea la única forma terapéutica disponible -aunque esté en fase de experimentación, ante una enfermedad incurable- con el consentimiento de los padres. Es evidente que junto al perfeccionamiento del DP se requiere un perfeccionamiento de terapias adaptadas a los embriones.

- e) Es innegable que en la actualidad, sobre los embriones se están realizando todo tipo de investigación y experimentación sin haber llevado la puesta a punto al límite con animales (sobre todo con primates). El fácil uso de embriones sobrantes de la FIV ha generado la explotación de éstas como material de experimentación en la puesta a punto de unas técnicas para servir al deseo de los padres o de los científicos. Claramente se manifiesta en el estado actual del DP, la "veterinización" que ha sufrido el embrión preimplantatorio después de que semánticamente se le desposeyera de la cualidad de embrión al denominarlo preembrión y trasladarlo del mundo de los humanos al de las cosas.
- f) Junto a esta mentalidad de falta de respeto a la vida humana, el planteamiento actual del DP, es marcadamente eugenésico. Se está convirtiendo en un arma de selección por la que se sentencia después del diagnóstico a muchos embriones a ser "chatarra biológica" y no tener derecho a la existencia, incumpliendo así el principio de igualdad de todos los seres humanos.

Es evidente que frente a nuestra opinión, otros piensan que los embriones tienen un estatuto moral que les permite no destruirlos deliberadamente. Pero aceptan la congelación de embriones y el aborto por enfermedades genéticas y no tendrían serios problemas para admitir, por un lado, la biopsia de embriones (pues el daño que se produce es similar al de la congelación y descongelación) y por otro el que se desechen los embriones con defectos genéticos. También sabemos que, por desgracia, se está extendiendo en el mundo científico la idea de que los embriones no son personas ni sujetos morales con derechos por su rudimentario estado de desarrollo, basándose fundamentalmente en la indiferenciación celular de los primeros estadios. Para estos autores, los embriones podrían tener un cierto valor por la potencial humanidad que representan o simbolizan y de esta forma acordar arbitrariamente que se les tenga más respeto que a cualquier otro tejido humano, pero que de ningún modo se le tenga que tratar como a personas o sujetos morales con sus propios derechos (Robertson, 1992). Esta opinión está imponiéndose en las regulaciones de varios países: USA, Gran Bretaña, Francia, Canadá, España, Australia y permite un amplio abanico de manipulaciones con los embriones incluyendo el DP.

Sin embargo, pensamos que frente a una ética de calidad de vida, la ética de la inviolabilidad de la vida humana, supone no solo que el hombre no sea lobo para el hombre, sino también que el desarrollo armónico de la ciencia sea a la medida del hombre.

## CONCLUSIONES

- Según los partidarios del DP, los beneficiarios inmediatos, en la actualidad, podrían ser las parejas con riesgos genéticos en su descendencia que de esta forma evitan "la carga" del diagnóstico prenatal y del aborto en los fetos afectados. Pensamos que esta alternativa tiene también sus propias "cargas" puesto que técnicamente el embarazo no es de forma natural. La mujer ha de someterse a uno o más ciclos de estimulación y no hay seguridad de que los embriones seleccionados para transferir se implanten y lleguen a buen término. Además la selección de los embriones femeninos también hace que algunos embriones masculinos sin enfermedad alguna, puedan ser desechados.
- Si las técnicas para obtener los blastocistos por lavado uterino demuestran seguridad y fiabilidad, la concepción por vía natural (coital) podría llegar a ser posible y la "carga" y costes del DP serían más reducidos y éticamente más aceptable. Se debería investigar más en esta línea para evitar una mayor pérdida de embriones.
- El futuro de las aplicaciones del DP puede ser la selección genética y que esta se haga por razones cada vez de menor importancia, bien para enfermedades menores (colesterol, hipertensión, etc.) e incluso criterios no médicos como género, color de los ojos, del pelo etc.
- Es necesario adquirir mayor experiencia clínica en biopsia de embriones en animales puesto que existe una enorme pérdida de ellos durante el proceso diagnóstico. Su desarrollo en el futuro depende según nuestra opinión de una concepción ética diferente a la actual. Si verdaderamente se pretende que el DP sea útil a la medicina, debe abandonarse la actual utilización eugenésica de esta técnica y ponerla más bien al servicio de la curación de los embriones humanos a los que hay que respetar como pacientes (Herranz, 1994).

## REFERENCIAS

- Benkhalifa M, Janny L, et al. *Assessment of polyploidy in human morulae and blastocysts using co-culture and fluorescent in-situ hybridization*. Hum. Reprod. 8(6); 895-902. 1993.

- Brambati B, Tului L. *Preimplantation genetic diagnosis: a new simple uterine washing system*. Hum. Reprod. 5(4); 448-450. 1990.
- Braude PR, Monk M, et al. *Measurement of HPRT activity in the human unfertilized oocyte and pre-embryo*. Prenat. Diagn. 9(12); 839-850. 1989.
- Carson SA, Smith AL, et al. *Superovulation fails to increase human blastocyst yield after uterine lavage*. Prenat. Diagn. (11); 513-522. 1991.
- Chang My ; Song Yk ; Wang MI . *Preimplantation Diagnosis of alpha-thalassemia by blastomere aspiration an polymerase chain reaction : preliminary experience*. J.Formos.Med.Assoc. 95(3); 203-208. Mar, 1.996.
- Dokras A, Sargent IL, et al. *Trophectoderm biopsy in human blastocysts*. Hum. Reprod. 5(7); 821-825. 1990.
- Egozcue J. *Preimplantation diagnosis in older patients*. Of Course Not. Hum Reprod.11(10); 2077-2078, 1996.
- Formigli L, Roccio C, et al. *Non-surgical flushing of the uterus for pre-embryo recovery: possible clinical applications*. Hum. Reprod. 5(3); 329-335. 1990.
- Griffin DK, Handyside AH, et al. *Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes*. Hum. Reprod. (6); 101-105. 1991.
- Griffin DK, Wilton LJ, et al. *Diagnosis of sex in preimplantation embryos by fluorescent in situ hybridisation*. Br. Med. J. 10 (8). 1993.
- Griffin DK, Wilton LJ, et al. *Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei*. Hum. Genet. 89(1); 18-22. 1992.
- Grifo JA, Boyle A. et al. *Preembryo biopsy and analysis of blastomeres by in situ hybridization*. Am. J. Obstet. Gynecol. 163; 2013-2019. 1990.
- Handyside A. *Prospects for the clinical application of preimplantation diagnosis: the tortoise or the hare?* Hum. Reprod. 7(10); 1481-1483. 1992.
- Handyside AH, Delhanty JD. *Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive disease*. In Edwards RG. *Preimplantation Diagnosis of Human Genetic Disease*. Cambridge University Press. 1993.
- Handyside AH, Kontogianni EH, et al. *Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification*. Nature 344; 768-770. 1990.
- Handyside AH, Lesko JG, et al. *Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis [see comments]*. N. Engl. J. Med. 327(13); 905-909. 1992.
- Handyside AH, Pattinson JK et al. *Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification*. Lancet i; 347-349. 1989.

- Harper Jc ; Dawson K ; Delhanty Jd ; Wiston Rm. *The use of fluorescent in - situ hybridization (FISH) for the analysis of in- vitro fertilization embryos : a diagnostic tool for the infertile couple.* Hum. Reprod. 10(12) 3253- 3258, 1995.
- Harper Jc. Delhanty Jd. *Detection of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos using FISH.* J.Assist.Reprod.Genet. 13(2); 137-139, 1996.
- Herranz G. *Etica de la intervenciones sobre el embrión preimplantado.* Anuario Filosófico, (27); 117-135. 1994.
- Hooper M, Hardy K, et al. *HPRT-deficient (Lesh-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells.* Nature 326; 292-295. 1987.
- Jackson LG, Zachary JM, et al. *A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic-villus sampling.* N. Engl. J. Med. 327; 594-598. 1992.
- Jones KW, Singh L, et al. *The use of probes for the Y chromosomes in preimplantation embryo cells.* Hum. Reprod. 2; 439-445. 1987.
- Kontogianni EH, Hardy K, et al. *Coamplification of X-and Y-specific sequences for sexing preimplantation human embryos.* Preimplantation Genetics. Plenum Press, New York; 139-145. 1991.
- Leese HJ, Humppherson PG, et al. *Profiles of hyposanthine guanine phosphoribosyl transferase and adenine phosphoribosyl transferase activities measured in single preimplantation human embryos by high-performance liquid chromatography.* J. Reprod. Fertil. 91; 197-202. 1991.
- Liebaers I, Sermon K, et al. *Preimplantation diagnosis.* Hum. Reprod. 7 Suppl 1; 107-10. 1992.
- Lissens W. Sermon K. Staessen C. Assche Ev. Janssenswillen C. Joris H. Van-Steirteghem A. Liebaers I. *Preimplantation diagnosis of inherited disease.* J.Inherit.Metab.Dis. 19(6); 709-723. 1996.
- Miedzybrodzka Z, Templeton A, et al. *Preimplantation diagnosis or chorionic villus biopsy?. Women's attitudes and preferences.* Hum. Reprod. 8(12 ); 2192-2196. 1993.
- Monk M, Handyside A, et al. *Preimplantation diagnosis of deficiency of hypoxanthine phosphoribosyl transferase in a mouse model for Lesch-Nyhan syndrome.* Lancet ii; 423-425. 1987.
- Navidi W, Arnheim N. *Using PCR in preimplantation genetic disease diagnosis.* Hum. Reprod. 6(6); 836-849. 1991.
- Pellestor F. Girardet A. Andreo B. Lefort G. Charlieu Jp. *Preimplantation embryo chromosome analysis by primed in situ labeling method.* Fertil. Steril. 66(5); 781-786. 1996.

- Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andreo B, Charliuc. Jp. *Rapid chromosome detection in human gametes, zygotes, and preimplantation embryos using the PRINS Technique.* J.Assist.Reprod.Genet. 13(8); 675-680.1996.
- Penketh RJ, Delhanty JD, et al. *Rapid sexing of human embryos by non-radioactive in situ hybridization: potential for preimplantation diagnosis of X-linked disorders.* Prenat. Diagn. 9(7); 489-499. 1989.
- Pickering Sj, Taylor A, Johnson Mh, Braude. Pr. *An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos.* Hum Reprod. 10(7); 1912-1922.1995.
- Reubinoff B, Shushan A. *Preimplantation diagnosis in older patients, to biopsy or not to biopsy ?.*Hum.Reprod. 11(10); 2071-2075.1996.
- Roberts C, Lutjen J, et al. *Cytogenetic analysis of biopsied preimplantation mouse embryos: implications for prenatal diagnosis.* Hum. Reprod. 5(2); 197-202. 1990.
- Robertson JA, *Ethical and legal issues in preimplantation genetic escreening.* Fertil. Steril. 57(1); 1-11. 1992.
- Roudebush WE, Dukelow WR. *Embryonic biopsy by cell displacement maintains an intact isolated blastomere without disrupting development.* Zool. Sci. 8; 323-329. 1991.
- Sermon K, Nijs M, et al. *Beta-N-Acetylhexosaminidase activity in mouse oocytes and preimplantation embryos.* Hum. Reprod. 6; 280-283. 1991.
- Simpson JL, Carson SA. *Preimplantation genetic diagnosis [editorial]* N. Engl. J. Med. 327(13); 951- 953. 1992.
- Staessen C, Coonen E, Van-Assche E, Tournaye H, Joris H, Devroey P, Van -Steirteghem Ac, Liebaers I. *preimplantation diagnosis for x and y normality in embryos from three klinefelter patients.* Hum.Reprod. 11(8); 1650-1653.1996.
- Strom CM, Rechitsky S, et al. *Reliability of gender determination using the polymerase chain reaction (PCR) for single cells.* J. In Vitro Fert. Embryo Transf. 8(4); 225-229. 1991.
- Tarin JJ, Handyside AH. *Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis.* Fertil. Steril. 59(5); 943-952. 1993.
- Trounson AO, Wood C. *IVF and related technology. The present and the future .* Med. J. Aust. 158(12); 853-857. 1993.
- Trounson AO. *Editorial: Preimplantation genetic diagnosis counting chickens before they hatch?.* Hum. Reprod. 7; 583-584. 1992.
- Veiga, A. y Boada, M. *Una alternativa al diagnóstico prenatal.* Mundo Científico 170; 609-612.1996.
- Verlinsky Y, Kuliev A. *Preimplantation polar body diagnosis.* Biochem.Mol.Med. 58(1); 13-17. 1996.

- Verlinsky Y, Pergament E, et al. *The preimplantation genetic diagnosis of genetic diseases*. J. In Vitro Fert. Embryo Transf. 7(1); 1-5. 1990.
- Verlinsky Y. *Biopsy of human gametes*. In: Verlinsky Y, Kuliev A, eds. *Preimplantation genetics*. New York: Plenum Press; 39-47. 1991.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Freidline M, Cieslak J, Strom C, Lifchez A. *Birth of a healthy girl after preimplantation gender determination using a combination of polymerase chain reaction and fluorescent in situ hybridization analysis*. *Preimplantation genetics group*. Fertil.Steril. 65(2); 358-360.1996.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, et al. *Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis*. Prenat. Diagn. 12; 103-110. 1992.
- West JD, Angell RR, et al. *Sexing whole human pre-embryos by in-situ hybridization with a Y chromosome specific DNA-probe*. Hum. Reprod. 3; 1010-1019. 1988.
- West JD. *The use of DNA probes in preimplantation and prenatal diagnosis*. Molec. Reprod. Dev, 1; 138-145. 1989.