

Editorial sobre

DIAGNOSTICO PREIMPLANTATORIO DE HLA

Roberto Coco, Judith Mincman, Ivana Primost, Nicolás Neuspiller

Fecunditas-Instituto de Medicina Reproductiva-afiliado a la facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Larrea 790 ciudad autónoma de Buenos Aires 1030

www.Fecunditas.com

El proyecto Genoma Humano, sin lugar a dudas, afectará el curso de la medicina del siglo XXI, dando lugar al desarrollo de la medicina basada en los genes, la que permitirá conocer desde el nacimiento y aún antes de nacer, incluso desde antes de la concepción, las enfermedades que uno podría llegar a padecer, aún las más comunes como la hipertensión, diabetes, asma, Parkinson, Alzheimer, cáncer de mama y ovario, cáncer de próstata, cáncer de colón no polipósico, etc. La fecundación in vitro facilitó el desarrollo del diagnóstico genético preimplantatorio. Al presente se estima alrededor de 1000 nacidos alrededor del mundo, los cuales fueron biopsiados al estado preimplantatorio. La mayoría de ellos fueron realizados por riesgo genético aumentado y una minoría para ganar eficacia reproductiva en los tratamientos FIV/ICSI (PGD consortium de la ESHRE). Su desarrollo desde el año 92 fue tal que ya se lo considera como una alternativa de diagnóstico prenatal para evitar el nacimiento de niños con alteraciones genéticas desde el nacimiento o con presentación más tardía, con la ventaja de minimizar o evitar la probabilidad del aborto genético respecto de los que acceden a los diagnósticos prenatales convencionales. Si bien en su inicio las indicaciones eran similares a los diagnósticos prenatales convencionales, en la actualidad ha tomado un giro que lo diferencia sustancialmente al aumentar los PGDs sin razones genéticas, tales como la elección del sexo en no portadores de mutaciones ligadas al sexo, el tipificado de HLA para favorecer el establecimiento de un embarazo con HLA compatible a un nacido, afectado genéticamente o no, que necesita ser tratado con stem cells de cordón umbilical o de médula ósea para sobrevivir. De hecho, la tipificación de HLA se ha convertido en una de las indicaciones de PGD y más recientemente su utilización en casos de afecciones aparentemente sin genes causativos, que requieren reconstitución hematopoyética.

La primera documentación de tipificado de HLA preimplantatorio corresponde a de una pareja con riesgo genético para Anemia de Fanconi (Verlinsky et al, 2001). Esa nueva posibilidad resultó atractiva para las demás parejas con hijos afectados con enfermedades congénitas letales cuya única salvación es el trasplante de stem cells de cordón o de médula ósea. Posteriormente sucedieron más casos de PGD por Anemia de Fanconi, Talasemia mayor, síndrome Wiscott-Aldrich (enfermedad ligada al X), adrenoleucodistrofia (ligada al X), hiper IgM (ligado al X) y displasia hipohidrótica ectodérmica con deficiencia inmune también ligada al X. Más recientemente se ha usado para condiciones que no tienen indicaciones de diagnóstico prenatal, tales como leucemias y anemias aplásticas adquiridas.

En el presente año se realizó en Chipre el simposio internacional sobre preimplantatorio de HLA y trasplante de stem cells, cuyas conclusiones fueron publicadas en RBMonline 9(2):205-209,2004. En dicho simposio se comunicaron 147 ciclos de preimplantatorio de HLA. Además durante el presente año se comunicaron otros 23 ciclos. Sobre un total de 170 preimplantatorios de HLA, 39

fueron por anemia de Fanconi, 81 Talasemia Mayor, 5 Hiper IGM ligada al X, 3 Síndrome Wiscott-Aldrich ligado al X, 1 displasia hipohidrótica ectodérmica más inmunodeficiencia ligada al X, 1 adrenoleucodistrofia ligada al X, 4 anemias Diamond-Blackfan, 2 anemias aplásticas y 34 leucemias (Auerbach,2004, Fiorentino et al,2004, Kahraman et al,2004, Marshall et al, 2004, Rechitsky et al,2004, Van de Velde et al,2004, Verlinsky et al,2001-2004).

En la tabla I figuran los resultados de los ciclos de tipificado de HLA comunicados en la literatura.

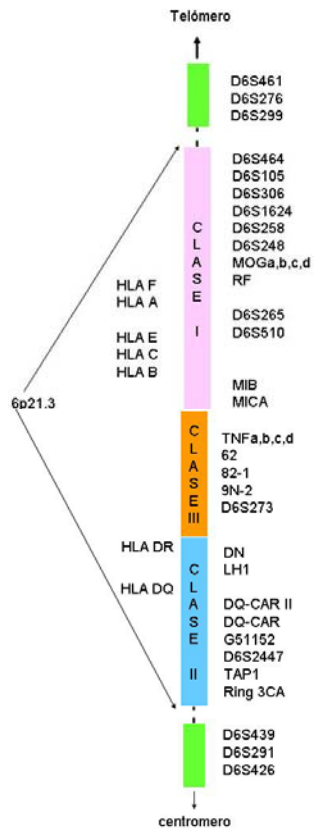
Tabla I: Preimplantatorio para HLA

Enfermedad	Ciclos	Embarazos
Fanconi	39	5
Talasemia	81	11
Hiper IgM	5	2
Wiscott-Aldrich	3	2
Displasia HE+Inmunodeficiencia	1	1
Adrenoleucodistrofia	1	0
Anemia diamond Blackfan	4	2
Anemia aplástica	2	0
Leucemia	34	7
Total	170	30

En general los PGDs combinados de HLA y genes causativos de enfermedades fueron resueltos con múltiples PCRs y digestión enzimática para conocer el status genético de los embriones. El tipificado de HLA en la mayoría de los casos fue resuelto con STRs (marcadores microsatélites) presentes en el locus HLA tal como lo describiera Foissac et al,2000, excepto el primer caso comunicado por Verlinsky et al, 2001 quienes amplificaron directamente los exones 2 y 3 del HLA A y B y Fiorentino et al que usaron minisequencia de las regiones A,B,C y DRB del HLA conjuntamente con los STRs que mapean en 6p.

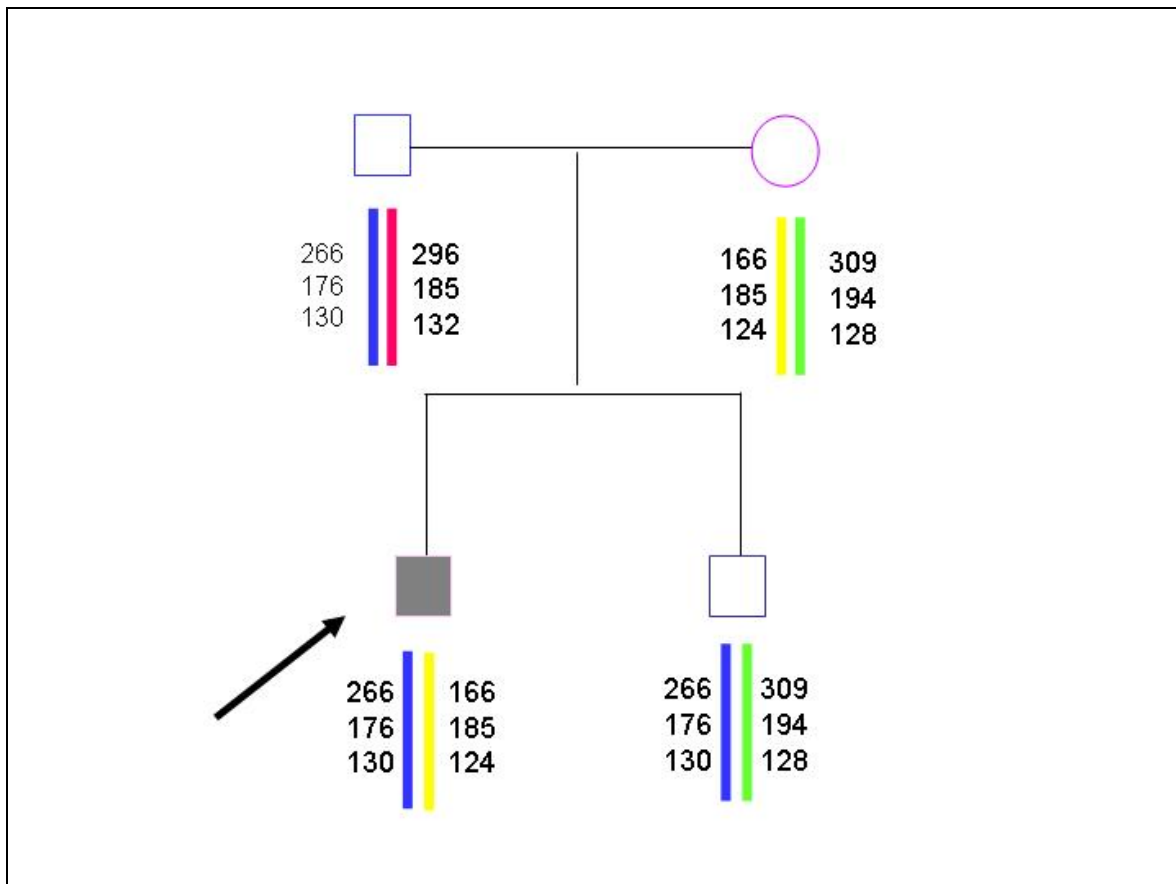
La utilización de los marcadores STRs provee información acerca del origen del cromosoma 6. El análisis del haplotipo del padre, madre e hijo afectado es realizado para cada familia antes de la realización del PGD de acuerdo con los microsatélites de la región HLA. En el figura I están enumerados los STRs utilizados en la elaboración de los haplotipos. El haplotipo informativo estará conformado por los STRs heterocigotas y que no se superpongan entre los progenitores. De esta manera una de las cuatro posibilidades será compatible con el HLA buscado. Desde lo teórico, para descartar las potenciales recombinaciones meióticas cuanto más STRs sean informativos, mayor será la seguridad diagnóstica. Pero a los fines prácticos, como se trabaja con el ADN de una o dos células, la cantidad de STRs a amplificar es limitada, con lo cual, uno debería optar por elegir al menos uno de cada región correspondiente a las clases de HLA. De esta manera se minimizaría el error por una potencial recombinación meiótica y el porcentaje de ADO (amplificación preferencial de

un solo alelo), además de su utilidad para detectar aneuploidías o isodisomías uniparentales.



En nuestro programa han consultado tres parejas para tipificado de HLA. Dos de ellas por tener hijos previos afectados con anemia de Fanconi y Talasemia, respectivamente. La tercera con un hijo con leucemia mieloide crónica. Este último caso debido a la inminente necesidad del trasplante de médula ósea o de stem cells, la pareja decidió ingresar al programa de PGD. Los padres, el niño afectado y el hermano no compatible fueron estudiados con 20 de los diferentes STRs que mapean a lo largo de 6p21.3. Se seleccionaron a los STRs RF, D6S510 y D6S273 por ser los más informativos. En la figura 2 figuran los haplotipos de los familiares del propósito afectado con leucemia mieloide crónica LMC.

Figura II



La mujer fue estimulada con agonistas Gn-Rh.+gonadotropinas de acuerdo al protocolo largo estandar. Se aspiraron 17 óvulos, 13 de ellos en metafase II. A los 13 maduros se les realizó ICSI. Fecundaron normalmente 10. Al tercer día se efectuó la biopsia de 9 embriones previo perforación de la membrana pelúcida con disparos de rayos láser. Uno de los 10 embriones (el # 5) no fue biopsiado por estar detenido en dos células. Cada una de las células fueron recogidas en buffer de PCR, congelados y lisados con proteinasa K. La primer ronda de PCR se efectuó con los tres primers de los tres STRs informativos no marcados. Una alícuota del producto amplificado se utilizó en la segunda ronda de PCR, pero

con los mismos primers de los STRs marcados con tres colores diferentes. El producto de la amplificación fue analizado por electroforesis capilar fluorescente con el ABI prism310. En la tabla II figuran los diferentes HLA de los embriones.

Tabla II

#embrión	STRs		
	RF	D6S510	D6S273
1	166/309/266	185/194/176	124/128/130*
2	166/266	185/176	124/132**
3	309/266	194/176	128/130
4	166/309/266	185/194/176	124/128/130*
6	309/266	194/176	128/130
7	309/266	194/176	128/130
8	309/296	194/185	128/132
9	166/296	185/185	124/132
10	166/266	194/185***	124/130

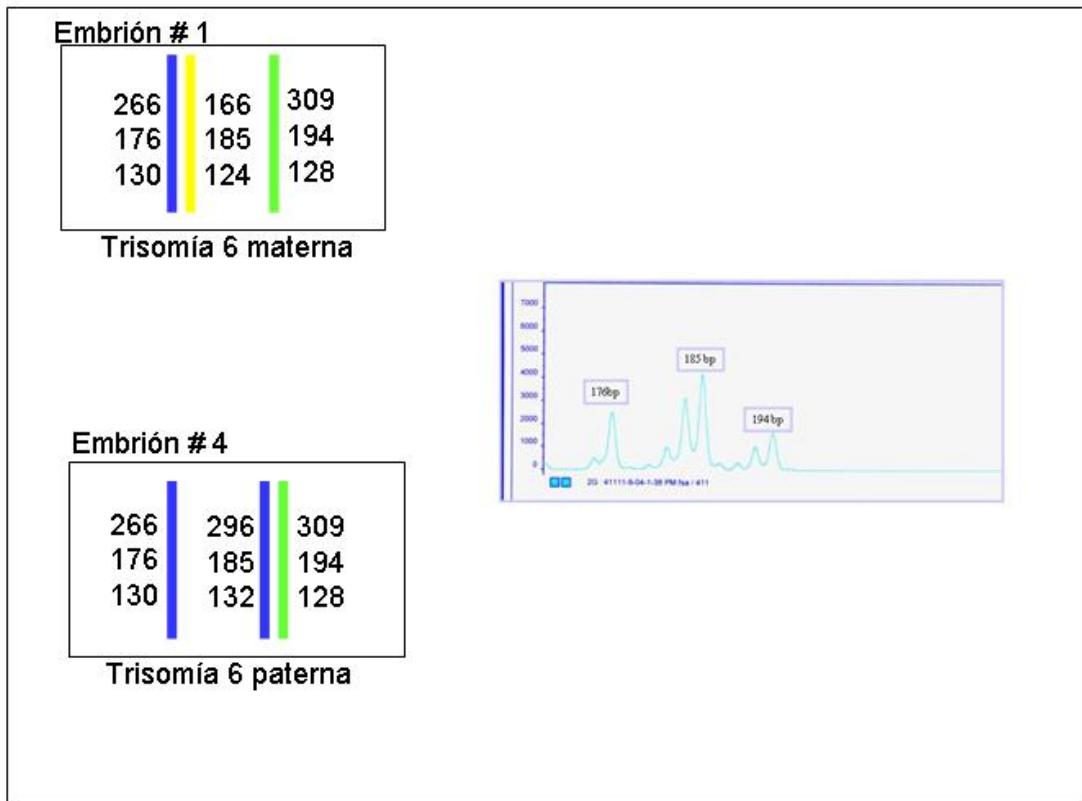
* Probable trisomía del #6 de origen materno (tres alelos).

** Crossing over entre los alelos paternos del STR #D6S273 entre 130/132

*** Crossing over entre los alelos maternos y paternos del STR #D6S510 entre 185/194 y 176/185.

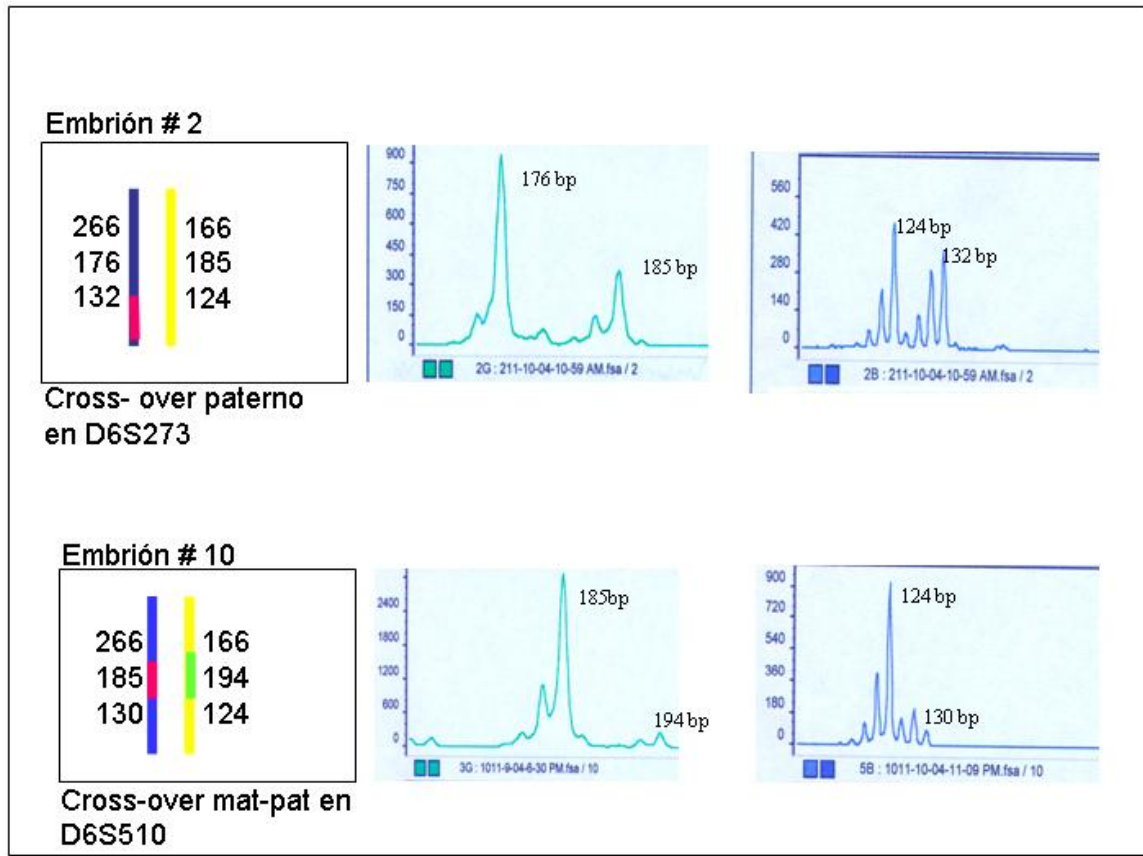
Ninguno de los embriones resultó compatible con el niño afectado con LMC, mientras que tres de ellos resultaron compatibles con el hermano sano (embriones #3, 6 y 7). En la figura III se esquematiza los resultados de los embriones #1 y 4 trisómicos para el cromosoma 6 y el electroferograma de uno de los STRs el D6S273 donde claramente se visualiza los tres picos alélicos que corroboran la trisomía 6.

Figura III



En la figura IV están esquematizados el cross-over ocurrido en los embriones #2 y 10 y los electroferogramas que permiten aseverar la ocurrencia de los mismos.

Figura IV



Está bien probado que los pacientes con desordenes hematológicos que requieren reconstituir la médula ósea logran curarse con el trasplante de médula ósea o stem cells de sangre de cordón HLA compatible. El trasplante de stem cells hemáticas SCH es la única opción curativa en los casos severos de desordenes hematopoyéticos. La mayor posibilidad de cura se asegura cuando el donante es HLA idéntico al receptor, ejemplo caso de hermanos histocompatibles, pero como solo uno de cada cuatro es compatible en general hay pocos afectados que se benefician con el trasplante familiar (Petersdorf et al,1998,). Cuando se usan otros donantes, los más compatibles-no idénticos en general la sobrevivencia es mala. La sangre de cordón umbilical de hermanos HLA idénticos es una excelente fuente de SCH (Frassoni et al,2003). Otra opción sería la utilización de médula ósea o SCH provenientes de bancos. Pero una cruel realidad en nuestro país y en otros también, es que en lista de espera tienen prioridad aquellos pacientes que no tienen enfermedades genéticas y si estuvieran genéticamente afectados, solo aquellos con mejores posibilidades de recuperación tendrían la opción del trasplante. Otra opción que se avecina es la obtención de stem cells embrionarias SCE propias obtenidas con técnicas de trasplante nuclear (clonado terapéutico) pero solamente aplicable en aquellos desordenes hematopoyéticos adquiridos no asociados a enfermedades genéticas. Para aquellas parejas que desean tener otro hijo, aprovechar que sea a "medida" del hermano afectado en cuanto a su HLA es una buena opción. De hecho, desde el año 2001 en que

Verlinsky et al comunicaron su utilidad en la obtención de stem cells proveniente del cordón umbilical de una gesta histocompatible a su hermano afectado con Anemia de Fanconi hasta el presente figuran 170 ciclos realizados con 30 gestas histocompatibles. Lamentablemente la posibilidad del establecimiento del embarazo deseable es baja fundamentalmente por la poca probabilidad de coincidencia en el HLA agravado cuando se realiza en combinación con una afección genética.

A pesar de la baja probabilidad esperada de seleccionar embriones compatibles no afectados, la cantidad de ciclos realizados demuestran que es el mejor camino para que las parejas con hijos afectados necesitados de reconstitución hematopoyética puedan conseguir stem cells en la sangre del cordón de la gesta del hijo a medida, para evitar la muerte del afectado y la curación definitiva (Grewal et al,2004). En nuestra primera experiencia de los 9 embriones genotipados ninguno resultó compatible con el niño afectado con leucemia mieloide crónica. Sin embargo tres fueron iguales al hermano sano. Este hecho entusiasmó a la pareja para volver a intentarlo. La no transferencia de embriones es bastante frecuente y más aún en los casos asociados a enfermedades dominantes, recesivas y ligadas al X debido a que la posibilidad de embriones libres de la afección y compatibles al nacido afectado es 12,5% y 18,75%, respectivamente. Si bien es verdad que la mayoría de estas parejas no tienen trastornos de fertilidad, la edad de las mujeres puede influir en el número de embriones a transferir. Con raras excepciones, la mayoría de las parejas que lograron su objetivo realizaron varios ciclos de PGD.

Si bien esta establecido que el locus HLA se segrega en bloque, y la posibilidad de recombinación meiótica es baja, la utilización de los STRs asociados al HLA ha evidenciado que es más alto que lo que se presuponía. En nuestro caso dos de nueve. Conjuntamente con la posibilidad de diagnosticar trisomías o isodisomías, la utilización de STRs de los cromosomas, en donde el gen causativo de la enfermedad está involucrado, se hace casi imprescindible para evitar diagnósticos erróneos.

Antes de finalizar no queremos dejar de mencionar que si bien en los diferentes tipos de leucemia uno no puede aseverar si subyace o no una predisposición genética, la mayoría de ellas son adquiridas y la recurrencia en la hermandad es sumamente rara. Esta fue otra de las razones que motivó la realización de este tipo de preimplantatorio.

Referencias:

- Auberbach AD, 2004: Preimplantation genetic diagnosis combined with HLA typing: the Fanconi Anemia experience as a model. Abstracts of International Seminar on Preimplantation HLA typing and stem cells transplantation, 27-28 March, 2004, Limassol, Cyprus p 13. www.pgdis.org
- Fiorentino F, Biricik A, Karadayi H, Berkil H, Karikaya G, Sertyel S, Podini D, Baldi, Magli MC, Gianaroli L, and Kahraman, 2004: Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single disorders combined with HLA matching. *Molecular Human Reproduction* 10(6):445-460.
- Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A, 2000: Microsatellite in the HLA region: 1999 update. *Tissue antigens* 55: 477-509.
- Frassoni F, Podestá M, Maccario R, Giorgiani G, Rossi G, Zecca M, Bacigalupo A, Piaggio G, Locatelli F, 2003: Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. *Blood* 102: 1138-1141.
- Grewal SS, Kahn JP, MacMillan ML, Ramsay NC, Wagner JE, 2004: Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA genotype identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. *Blood*, 103(3): 1147-1151.
- Kahraman S, Karlikaya G, Sertyel S, Karadayi H, Findikli N, 2004: Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing. *RBMonline*, 9(5):529-532; www.rbmonline.com
- Kuliev A, Verlinsky Y, 2004: Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation: report of International Meeting, Cyprus, 27-28 March, 2004. *RBMonline*, 9(2): 205-209; www.rbmonline.com
- Marshall J, Beaton A, deBoer K, 2004: Preimplantation HLA matching: Sidney's strategy. Abstracts of International Seminar on Preimplantation HLA typing and Stem Cells Transplantation, 27-28 March, 2004, Limassol, Cyprus, p 17. www.pgdis.org
- Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Wolfrey AE, and Hnasen JA, 1998: Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*, 92: 3515-3520.
- Petersdorf EW, Anasetti C, Servida P, Martini P and Hansen J, 1998: Effect of HLA matching on outcome of related and unrelated donor transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol clin North Am*, 12: 107-121.
- Rechitsky S, Kuliev A, Tur-Kaspa I, Morris R, Verlinsky Y, 2004: Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. *RBMonline*, 9(2): 210-221; www.rbmonline.com
- Van de Velde H, Georgiou I, De Rycke M, Schots R, Sermón K, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A and Liebaers I, 2004: Novel universal approach for preimplantation genetic diagnosis of beta-Thalassaemia in combination with HLA matching of embryos. *Human Reproduction*, 19(3): 700-708.

- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C and Kuliev A, 2001: Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. J Am Med Assoc, 285: 3130-3133.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Sharapova T, Morris R, Taranissi M and Kuliev A, 2004: Preimplantation HLA typing. Jama, 291(17): 2079-2085.
- www.ESHRE.com/genetic interest group.